

論 文 内 容 要 旨

PLK1-mediated phosphorylation of WDR62/MCPH2

ensures proper mitotic spindle orientation

(PLK1 による WDR62 のリン酸化を介した細胞分裂軸制御機構)

Human Molecular Genetics, 2017, in press.

主指導教員：松浦 伸也 教授

(原爆放射線医科学研究所 放射線ゲノム疾患)

副指導教員：岡本 哲治 教授

(医歯薬保健学研究科 分子口腔医学・顎顔面外科学)

副指導教員：浦邊 幸夫 教授

(医歯薬保健学研究科 スポーツリハビリテーション学)

副指導教員：戸田 常一 教授

(社会科学部)

副指導教員：静間 清 教授

(工学部)

Silvia Natsuko Akutsu

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

【背景と目的】 真性小頭症 (primary microcephaly: MCPH) は出生前からの顕著な頭囲の縮小を特徴とする常染色体劣性遺伝病である。現在までに原因遺伝子として 13 遺伝子が報告されており、ほぼ全ての遺伝子産物は中心体に局在することが知られている。中心体は細胞周期を通じて微小管重合活性をもち、分裂期には紡錘体の両極に位置して正確な染色体分配を担っている。しかし、分子・細胞レベルでの小頭症発症機序は不明な点が多い。本研究では、日本人真性小頭症 1 家系の全エクソーム解析により原因遺伝子変異を探索するとともに、ゲノム編集法を用いて本家系で同定した変異をノックインした疾患モデル培養細胞株を樹立しその機能解析により、小頭症発症機序を明らかにすることを目的とした。

【方法と結果】 日本人真性小頭症患者同胞 2 例とその両親の全エクソーム解析を行い、中心体に局在する足場タンパク質 WDR62 をコードする既知の小頭症原因遺伝子である *WDR62/MCPH2* 遺伝子の c.731 C>T, p.Ser 244 Leu ミスセンス変異と c.2413 G>T, p.Glu 805Xナンセンス変異の複合ヘテロ接合変異を同定した。次に、CRISPR/Cas9 発現ベクター (px459: addgene #62988) と *WDR62/MCPH2* c.731 C>T, p.Ser 244 Leu ミスセンス変異とノックインを簡便に検出するために制限酵素配列 BamHI を搭載した一本鎖オリゴデオキシヌクレオチド (ssODN) をヒト結腸癌細胞株 HCT116 細胞およびヒト胎児腎臓細胞株 HEK293T 細胞に共導入して、真性小頭症モデル細胞 (*WDR62*^{S244L/S244L} 細胞) を樹立した。中心体マーカー (抗 Pericentrin 抗体または抗 CDK5Rap2 抗体) と微小管マーカー (抗 α -tubulin 抗体) を用いて *WDR62*^{S244L/S244L} 細胞を免疫染色して、蛍光顕微鏡下で紡錘体極の X-Y 平面における距離と Z 方向 (高さ) の距離を計測して紡錘体の傾斜角度を評価したところ、野生型細胞では細胞接地面に対して水平に維持される細胞分裂軸が不安定化していた。また、*WDR62*^{S244L/S244L} 細胞では、紡錘体を細胞膜に係留するために、中心体から細胞膜に向かって発達する星状体微小管の形成が不全になっていることを見出した。

分裂期キナーゼ PLK1 は星状体微小管を発達させて細胞分裂軸を安定化する活性をもち、ショウジョウバエの神経発生では PLK1 と WDR62 が遺伝的に相互作用することが報告されている。そこで、本研究では PLK1 と WDR62 の物理的相互作用を免疫沈降法により評価した結果、PLK1

は PBD (polo-box domain) を介して WDR62 と相互作用することを見出した。次に、細胞分裂軸安定化を担う WDR62 の PLK1 リン酸化部位を同定する目的で、WDR62 に存在する 4 カ所の PLK1 リン酸化コンセンサス部位をアラニンに置換したリン酸化抗体を WDR62 欠損 HCT116 細胞にそれぞれ導入したところ、WDR62 S897A 変異体だけが細胞分裂軸の不安定化を回復させることができなかった。*in vitro* キナーゼ解析により、PLK1 キナーゼが WDR62 の 897 番目セリンを実際にリン酸化することを明らかにした。抗 WDR62 S897 リン酸化抗体を作製して免疫染色解析を行った結果、正常細胞の紡錘体極で検出された WDR62 S897 リン酸化シグナルが、PLK1 阻害剤 BI2536 処理により消失した。さらに、WDR62 S897 をグルタミン酸に置換した疑似リン酸化変異体 (WDR62 S897E) は、BI2536 を処理した HCT116 細胞においても、星状体微小管重合を促進して細胞分裂軸を安定化することを確認した。これらの結果から、PLK1-WDR62 分子経路は星状体微小管重合の活性化を介して細胞分裂軸を安定化する機構であることが示唆された。

【結論】 本研究では、全エクソーム解析により日本人真性小頭症1家系において WDR62/MCPH2 遺伝子の複合ヘテロ変異を同定した。さらに、ゲノム編集法を用いて作製した WDR62/MCPH2 遺伝子変異導入細胞の解析から、分裂期キナーゼ PLK1 による WDR62 の 897 番目セリンのリン酸化は、星状体微小管の重合促進を介した細胞分裂軸安定化に必須であることを明らかにした。

ヒトの神経発生初期には、神経幹細胞 (神経上皮細胞) は、脳室に対して水平な細胞分裂軸をもつことで均等分裂を保証して、神経幹細胞の数を増大させる。それに引き続いて、神経幹細胞の分裂軸が傾斜することによって、均等分裂から非対称分裂へと切り替わり、神経幹細胞から神経細胞が産生されることが知られている。WDR62/MCPH2 遺伝子変異により、神経幹細胞の早期な分裂軸傾斜が誘導され、神経幹細胞数の十分な増殖不全を介して小頭症が発症することが本研究から示唆された。