

別記様式第 6 号（第 16 条第 3 項，第 25 条第 3 項関係）

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	Silvia Natsuko Akutsu
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目			
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)			
論文審査担当者			
主 査	教授	田 代 聡	印
審査委員	教授	丸 山 博 文	
審査委員	講師	金 本 聡 自	
〔論文審査の結果の要旨〕			
序論： 真性小頭症（primary microcephaly: MCPH）は出生前から顕著な頭囲の縮小に特徴づけられる常染色体劣性遺伝病である。現在までに真性小頭症の原因として 13 遺伝子が報告されており、ほぼ全ての原因遺伝子産物は非膜性細胞内小器官である中心体に局在する。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、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真性小頭症の原因遺伝子である WDR62/MCPH2 遺伝子の複合ヘテロ変異を同定した。ゲノム編集法を用いて本家系に見出され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て、分裂期細胞の形態学および生化学的解析を行い、WDR62/MCPH2 遺伝子変異による小頭症発症機序を明らかにすることを研究目的とした。			
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、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 805 X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 $\alpha$ -tubulin 抗体）を用いた免疫染色を行い、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。その結果、野生型細胞では細胞接地面に対して細胞分裂軸が水平に維持されるのに対して、WDR62 S244L/S244L 細胞の分裂軸は不安定化していた。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重合が低下することを見出した。			

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っており、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-like 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 か所の **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。また、*in vitro* キナーゼ解析により、**PLK1** キナーゼが **WDR62** の 897 番目セリンを直接的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ことから、**PLK1** が **WDR62** を中心体でリン酸化することが実証された。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ことが示された。

考察：

ヒト神経発生の初期には、神経幹細胞は、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。

結論：

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が、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。

本研究では、次世代シーケンサーによる変異探索からゲノム編集技術を用いた原因変異確定までのヒト遺伝病解析フローを確立しており、小頭症発症メカニズムの理解に大きく貢献した点で高く評価される。よって、審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士(医学)の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

別記様式第7号（第16条第3項関係）

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（医学）	氏名	Silvia Natsuko Akutsu
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目  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)			
最終試験担当者			
主査	教授	田代 聡	印
審査委員	教授	丸山 博文	
審査委員	講師	金本 聡自	
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成29年11月2日の第71回広島大学研究科発表会（医学）及び平成29年11月13日の本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。			
1 WDR62 タンパク質の細胞周期に依存した発現調節について			
2 WDR62 タンパク質のリン酸化と脱リン酸化の意義			
3 WDR62 遺伝子変異によるタンパク質の不安定化について			
4 ミスセンス変異により細胞分裂軸が傾く理由			
5 遺伝性小頭症の臨床症状について			
これらに対して極めて適切な回答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。			