OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Direct binding of Lg12 to LGN during mitosis and its requirement for normal cell division
Author(s)	安見, 正人
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45432
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏名	安見正人（やすみまさと）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 19266 号
学位授与年月日	平成17年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Direct binding of Lg12 to LGN during mitosis and its requirement for normal cell division （Lg12とLGNの直接結合とその細胞分裂への関与）
論文審査委員	（主査） 教授 高井 義美 （副査） 教授 金倉 譲　教授 宮坂 昌之

論文内容の要旨

〔 目的 〕

Lethal giant larvae（Lgl）は、最初ショウジョウバエにおいてがん抑制遺伝子として発見されたが、その後 Lgl は極性制御タンパク質である Par-6 と aPKC の複合体と結合し、神経幹細胞の非対称分裂および上皮細胞における細胞の極性形成に重要な働きをすることが明らかになっている。一方、マウス Lgl のノックアウトマウスの研究から Lgl が紡錘体の位置決め、細胞周期、細胞分化の制御に必要であることが明らかとなっているが、その分子メカニズムについては不明であった。そこで本研究では Lgl の細胞分裂制御機構を明らかとするため、Lgl に結合する新たな分子の同定を試みた。

〔 方法ならびに成績 〕

Lgl に結合する新規タンパク質の同定

ヒト Lgl2 を bait としてヒト脳 cDNA ライブラリーを用いて酵母 two-Hybrid 法にて Lgl に結合するタンパク質の同定を試みた。その結果、LGN を同定した。LGN はショウジョウバエにおいて神経幹細胞の非対称分裂の極性形成に重要なタンパク質である partner of inscuteable（Pins）の哺乳類ホモログとして見出され、細胞分裂時に nuclear mitotic apparatus protein（NuMA）および三量体 G タンパク質の Gα サブユニットと三量体を形成し、染色体分離に重要な働きをすることが報告されている。

Lgl と LGN の結合部位の同定

Lgl と LGN の結合部位を同定するために HEK293 細胞に Lgl の各フラグメントを過剰発現させ、GST-LGN 融合タンパクを用いて pull-down アッセイを行ったところ、Lgl の C 末フラグメントが LGN の TPR モチーフを含む N 末フラグメントに結合した。また大腸菌から精製した Lgl の C 末フラグメントを用いてアフィニティークロマトグラフィーを行ったところ、Lgl の C 末フラグメントは GST-LGN に直接結合し、その Kd 値は約 56 nM であった。

Lgl と LGN の細胞周期依存的複合体形成

HEK293 細胞を Thymidine/nocodazole 処理し細胞周期を分裂期に同調させ、抗 Lgl2 抗体あるいは抗 LGN 抗体に

て免疫沈降を行った。Lgl、aPKC、Par-6 はLGN とともに共沈された。同様にLGN、aPKC、Par-6 はLgl2 とともに共沈された。この結合は細胞周期の分裂期に増加していた。また、分裂期に同調させた細胞を抗 Lgl2 抗体あるいは抗 LGN 抗体と抗 aPKC 抗体にて共染色を行ったところ、Lgl2 は分裂期の細胞膜近傍にて aPKC と共局在していた。同様にLGN も分裂期の細胞膜近傍にて aPKC と共局在していた。

Lgl と LGN の結合阻害による分裂期の紡錘体、LGN、NuMA の局在異常

LGN と NuMA の複合体は分裂期の紡錘体の位置決めに関与することが報告されており、HEK293 細胞にLGN の結合部位である Lgl の C 末フラグメントを過剰発現させ、抗 tubulin 抗体、抗 LGN 抗体、抗 NuMA 抗体にて免疫染色を行った。Lgl の C 末フラグメントの過剰発現により LGN は分裂期での細胞膜近傍への集積が阻害されていた。また NuMA、tubulin も正常な二極性の局在が阻害され多極性に局在していた。また RNA 干渉法により Lgl をノックダウンしても分裂期の LGN の細胞膜近傍への集積は阻害されていた。次に、HEK293 細胞に Lgl の各フラグメントを過剰発現させ、抗 LGN 抗体により免疫沈降を行ったところ、Lgl 完全長および C 末フラグメントが共沈され、LGN と NuMA との結合も増加した。

Lgl と LGN の結合阻害による微小核の惹起

HEK293 細胞に Lgl の各フラグメントを過剰発現させ、DAPI にて核を染色した。Lgl の C 末フラグメントを過剰発現させた細胞では、８％の細胞に微小核が認められた。RNA 干渉法により Lgl をノックダウンした細胞でも６％の細胞に微小核が認められた。

〔 総括 〕

本研究では Lgl の結合タンパク質として LGN を同定した。極性タンパク質である Lgl/Par-6/aPKC 複合体と LGN は細胞周期依存的に複合体を形成し、Lgl/Par-6/aPKC/LGN 複合体が染色体分離に関与することを明らかにした。LGN は分裂期の細胞膜近傍にて NuMA、Gα と三量体を形成し、星状紡錘糸を制御することが報告されており、Lgl と LGN の結合が極性タンパク質と紡錘糸とを連結し染色体の二極への正常な分離を制御している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

Lethal giant larvae（Lgl）は、最初ショウジョウバエにおいてがん抑制遺伝子として発見されたが、その後 Lgl は Par-6/aPKC と複合体を形成し、神経幹細胞の非対称分裂および上皮細胞における細胞の極性形成に重要な働きをすることが明らかになっている。

申請者は、本研究において、Lgl の哺乳類ホモログである mLgl-2 が染色体分離に重要な働きをする LGN に直接結合することを見出し、その細胞分裂における機能を検討した。HEK293 細胞において、mLgl-2 は LGN と共に Par-6/aPKC と複合体を形成し、この複合体形成は細胞周期の M 期に増加することを見い出した。また LGN との結合部位である Lgl の C 末フラグメントを過剰発現させると分裂期における紡錘体の正常な局在が阻害され、多数の微小核が出現することを見い出した。以上の結果から Lgl と LGN の結合は染色体の正常な二極への分離を制御していることを明らかとした。

本研究は、実験結果自体の意義もさることながら、今後の発展性にも期待できるものがあり、生命科学への貢献度が極めて高い研究であるといえる。したがって、学位授与に十分値すると考えられる。