The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	In vivo dynamics and kinetics of pKi-67 : Transition from a mobile to an immobile form at the onset of anaphase
Author(s)	才脇, 卓也
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46215
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

【22】

氏　　名	才（さい）脇（わき）　卓（たく）　也（や）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　１９８０２　号
学位授与年月日	平成 17 年 9 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学　位　論　文　名	In vivo dynamics and kinetics of pKi-67 : Transition from a mobile to an immobile form at the onset of anaphase （生細胞における pKi-67 分子の細胞内動態の可視化とクロマチン相互作用の測定）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　米田　悦啓 （副査） 教　授　近藤　寿人　　教　授　田中亀代次

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

核小体はリボソームの生合成を行う核内構造体であり、増殖活性に依存して顕著に認められる。また核小体は分裂期に消失し、分裂終了後再構築されるという動的な一面を有している。核小体の内部は、形態学的に繊維状成分、電子密度の高い繊維状成分、顆粒状成分からなっており、それぞれ rRNA 転写、rRNA 修飾、リボソームの構築過程に関与することが知られている。一方で、核小体の周囲には、rDNA の繰り返し配列由来のクロマチン構造とセントロメア DNA 配列由来のヘテロクロマチン構造が高度に濃縮した特徴的な核小体内コンパートメントが認められる。ヘテロクロマチン構造が濃縮した核小体内コンパートメントは増殖活性に比例して認められ、本構造構築の動的メカニズムを知ることが、細胞増殖における核小体ヘテロクロマチン構造の理解に繋がるのではないかと考えた。本研究では、増殖細胞の分子マーカーであり、唯一、核小体部のヘテロクロマチン領域に局在する Ki-67 抗原（pKi-67）の局在化機構ならびに生細胞における細胞周期中の動的な変化を測定し、増殖細胞における核小体ヘテロクロマチン構造の構築原理を解明することを目的とした。

〔　方法ならびに成績　〕

pKi-67 は分子量約 350 kDa の巨大蛋白質であり、間期には核小体ヘテロクロマチン領域に局在し、分裂期には染色体の周囲に局在することが知られている。一次構造上は、N 末端領域に FHA ドメイン、中央領域に 121 アミノ酸からなる Ki-67 モチーフが 16 回繰り返して現れる Ki-67 repeat ドメインを有している。また上述のドメインに加えて、異なる生物種間で保存度の高い領域 Conserved ドメイン（CD）ならびにロイシンとアルギニンの対が不定間隔で複数回現れる LR ドメインが存在する。本研究では、HeLa 細胞 mRNA より RT-PCR 法によって pKi-67 全長、上述の各ドメインをクローニングし、GFP 発現ベクターを用いて細胞内で pKi-67 の局在化を担うドメインの検討をおこなった。CD 領域は核小体全体への局在化に、LR ドメインは核内のヘテロクロマチン部への局在化に必須であり、CD 領域－LR ドメインが共に存在すると核小体ヘテロクロマチン領域に局在することが明らかとなった。同様に、分裂期染色体の周囲への局在化について検討したところ、LR ドメイン単独では分裂期染色体全体に局在したが、Ki-67

repeat ドメイン内に存在する Ki-67 モチーフの数を増加させることによって、染色体周囲への局在が顕著に観察された。上述の結果より、LR ドメインはクロマチン構造あるいは DNA に強い親和性をもつと考えられる。このことは、pKi-67 がクロマチン画分に濃縮されることや LR ドメインと heterochromatin protein 1（HP1）が相互作用することと矛盾なく、LR ドメインは、pKi-67 の局在化機構の中心的役割を担っていると考えられ、間期には CD 領域によって核小体部に濃縮し、分裂期には Ki-67 repeat ドメインによって染色体表層領域へ顕在化すると考えられた。

次に細胞周期を通じて起こる局在の変化と、クロマチン構造との相互作用の変化について検討した。本研究で作製した GFP-pKi-67 を用いて、一細胞内で pKi-67 とヘテロクロマチン構造の結合親和性を計測する手法として、共焦点レーザー顕微鏡を用いた FRAP（Fluorescence Recovery After Photobleaching）法を導入した。FRAP 法は細胞内に存在する一部の GFP 分子の蛍光をレーザーにより非可逆的に消光し、消光されていない部分の GFP 分子が消光された場所に流入する速度を計測する手法である。この方法では流入速度が遅い場合、消光された部位の GFP 分子がとどまっていることを示し、構造体と強固に結合していると考えられ、反対に流入速度が速い場合、分子と構造体との結合親和性は小さいと考えられる。また FRAP 法を生細胞イメージング技術と組み合わせることによって、同一細胞において細胞周期の各ステージでの結合親和性を検討することが可能である。この計測により、pKi-67 は間期においてクロマチン構造と強固に結合し、間期から分裂中期にかけて、核小体が崩壊する時を同じくして、結合親和性が低下することが明らかとなった。pKi-67 とクロマチンとの結合親和性は、分裂終期に核小体が再構築される際に再び強まることから、pKi-67 とクロマチンの相互作用は核小体構造構築に依存すると考えられた。

〔 総　　括 〕

本研究では、約 350 kDa の巨大核小体蛋白質である pKi-67 を GFP 融合蛋白質として発現することに成功した。これにより、これまで不明であった pKi-67 の細胞内局在化機構を担うドメインが明らかになるとともに、生細胞イメージング技術を用いて細胞周期を通じた局在変化およびクロマチン結合親和性変化のダイナミズムを明らかにした。また、核小体部におけるヘテロクロマチン構造の生理的役割の解明には至らなかったが、本研究で作製した pKi-67 全長発現ベクターを用いることによって、分子基盤などのより詳細な解析が可能であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究では、増殖細胞の分子マーカーとして汎用されている Ki-67 抗原（pKi-67）の機能を解析するために、生きた細胞内における動態の解析をおこなった。pKi-67 は分子量約 320 kDa の巨大タンパク質であるが、GFP との融合蛋白質として発現することに成功し、領域欠失変異体を用いた pKi-67 の細胞内局在化に必要なドメイン構造の決定、および生細胞イメージング技術による細胞周期における局在変化のダイナミズムを明らかにした。さらにイメージング技術を応用して pKi-67 のクロマチンとの相互作用が分裂中期において急激に変化し、間期に向けてクロマチン構造と強く結合することが明らかにされた。

本研究では、分裂期終了後の核小体再構築過程において、pKi-67 がヘテロクロマチン部の構築に強く関与することが示唆され、長い間、機能が不明のまま増殖細胞の指標として知られている pKi-67 の生理的意義の解明に繋がることが期待され、以上の理由から、申請者の研究は博士（医学）の学位に値すると認められる。