

# 学位論文

## Doctor's thesis

癌抑制タンパク WARTS キナーゼは分裂期の進行と G<sub>1</sub> 期 4 倍体  
チェックポイントを制御することによりゲノム安定性を維持する  
(Tumor suppressor WARTS ensures genomic integrity by regulating both  
mitotic progression and G<sub>1</sub> tetraploidy checkpoint function)

飯田 伸一  
Shin-ichi Iida

指 導 教 官  
熊本大学大学院医学研究科博士課程外科学第一  
川筋 道雄 教授  
熊本大学大学院医学研究科博士課程腫瘍医学  
佐谷 秀行 教授

2004 年度

学 位 論 文  
Doctor's thesis

論文題名：癌抑制タンパク WARTS キナーゼは分裂期の進行と G<sub>1</sub>  
期 4 倍体チェックポイントを制御することによりゲノム安定性  
を維持する

(Tumor suppressor WARTS ensures genomic integrity by regulating both  
mitotic progression and G<sub>1</sub> tetraploidy checkpoint function)

筆者名： 飯田 伸一  
Shin-ichi Iida

指 導 教 官：外科学第一講座担当教授

氏名 川筋 道雄 教授

腫瘍医学講座担当教授

氏名 佐谷 秀行 教授

審査委員名：

組織制御学講座担当教授 氏名 山泉 克 教授

器官制御学講座担当教授 氏名 中尾 光善 教授

免疫識別学講座担当教授 氏名 西村 泰治 教授

機能病理学講座担当教授 氏名 伊藤 隆明 教授

2004 年度

## 目次

1. 要旨	3
2. 発表論文リスト	5
3. 謝辞	6
4. 略語一覧	7
5. 研究の背景と目的	8
5-1. 細胞周期チェックポイント	8
5-2. スピンドルチェックポイント (M チェックポイント)	9
5-3. G1 期 4 倍体チェックポイントと染色体不安定性	11
5-4. WARTS キナーゼと分裂期の関連性	13
5-5. 本研究の目的	16
6. 実験方法	17
6-1. 細胞培養とトランスフェクション	17
6-2. プラスミド	17
6-3. WARTS 安定発現 Rat1 細胞株の作製	17
6-4. Immune-complex kinase assay	17
6-5. ウェスタンブロット法	18
6-6. 蛍光免疫染色法および共焦点レーザー顕微鏡による観察	19
6-7. フローサイトメトリー	19
6-8. タイムラプスマイクロスコーピー	20
7. 実験結果	21
7-1. WARTS キナーゼは分裂期特異的に活性化する	21

7-2. キナーゼ不活性型 WARTS の過剰発現は染色体数異常 を引き起こす . . . . .	26
7-3. キナーゼ不活性型 WARTS の過剰発現によってスピンドル チェックポイントが遷延する . . . . .	29
7-4. キナーゼ不活性型 WARTS の過剰発現は mitotic slippage 後の新たな DNA 合成を許してしまう . . . . .	35
7-5. WARTS は G1 期 4 倍体チェックポイントにおける p53 タンパク誘導に関与する . . . . .	37
8. 考察 . . . . .	39
8-1. WARTS のキナーゼ活性について . . . . .	39
8-2. WARTS の不活化とスピンドルチェックポイント . . . . .	41
8-3. WARTS の不活化と G1 期 4 倍体チェックポイント . . . . .	41
8-4. WARTS の過剰発現と細胞死について . . . . .	42
8-5. WARTS キナーゼの特異性 . . . . .	43
9. 結語 . . . . .	45
10. 参考文献 . . . . .	46

## 1. 要旨

細胞分裂期における染色体や紡錘体の異常はスピンドルチェックポイントを活性化して分裂前中期で細胞周期を停止させる。スピンドルチェックポイントが遷延化すると、細胞はある期間分裂前中期で停止した後、分裂をおこなうことなく G1 期へ脱出し、4 倍体の染色体を持つ間期細胞となる。このような 4 倍体の細胞は通常、p53 や pRb に依存した監視機構によって次の DNA 合成期に入らないように G1 期に停止する。この機構を G1 期 4 倍体チェックポイントという。ショウジョウバエ癌抑制遺伝子産物 warts のヒトホモログ WARTS は進化上保存されたセリン・トレオニンキナーゼであり、近年ヒト腫瘍との関与も報告されている。我々は以前 WARTS がアクチンフィラメント形成の制御因子である zyxin と分裂装置上で会合し、分裂期の進行に重要な役割を持つことを報告した。しかしながら、WARTS がどの時期にキナーゼ活性を発揮し、また WARTS の不活性化が腫瘍の発生にどのように関与しているのか不明である。今回我々は WARTS が分裂期特異的に活性化することを見出し、ラット線維芽細胞にヒト WARTS のキナーゼ不活性型変異体を過剰発現させるとスピンドルチェックポイントの活性化をとまなう著しい分裂期の遅延を認めた。これらの細胞はしばしば分裂できないまま G1 期に進入し、さらに G1 期 4 倍体チェックポイントの破綻によって新たな DNA 合成をおこない 8N の多倍体細胞となった。また、この G1 期 4 倍体チェックポイントの破綻の原因として p53 タンパクの発現誘導が阻害されていることがわかった。このように WARTS は分裂期の進行および G1 期 4 倍体チェックポイントにおいて重要な役割を果たすことで染色体安定性の維持に働いていると考えられた。

## Abstract

Defects in chromosomes or mitotic spindles activate the spindle checkpoint, resulting in cell cycle arrest at prometaphase. The prolonged activation of spindle checkpoint generally leads to mitotic exit without segregation after a transient mitotic arrest and the consequent formation of tetraploid G<sub>1</sub> cells. These tetraploid cells are usually blocked to enter the subsequent S phase by the activation of p53/pRb-pathway, which is referred to as the G<sub>1</sub> tetraploidy checkpoint. A human homologue of the *Drosophila* warts tumor suppressor, WARTS, is an evolutionarily conserved serine-threonine kinase and implicated in development of human tumors. We previously showed that WARTS plays a crucial role in controlling mitotic progression by forming a regulatory complex with zyxin, a regulator of actin filament assembly, on mitotic apparatus. However, when WARTS is activated during cell cycle and how the loss of WARTS function leads to tumorigenesis have not been elucidated. Here we show that WARTS is activated during mitosis in mammalian cells, and that overexpression of a kinase-inactive WARTS in Rat1 fibroblasts significantly induced mitotic delay. This delay resulted from prolonged activation of the spindle assembly checkpoint and was frequently followed by mitotic slippage and the development of tetraploidy. The resulting tetraploid cells then abrogated the G<sub>1</sub> tetraploidy checkpoint and entered S phase to achieve a DNA content of 8N. This impairment of G<sub>1</sub> tetraploidy checkpoint was caused as a consequence of failure to induce p53 expression by expressing a kinase-inactive WARTS. WARTS thus plays a critical role in maintenance of ploidy through its actions in both mitotic progression and the G<sub>1</sub> tetraploidy checkpoint.

## 2. 発表論文リスト

### ①関連論文

Iida S, Hirota T, Morisaki T, Marumoto T, Hara T, Kuninaka S, Honda S, Kosai K, Kawasuji M, Pallas DC, Saya H.

The tumor suppressor WARTS ensures genomic integrity by regulating both mitotic progression and G1 tetraploidy checkpoint function.

*Oncogene.* 23: 5266-5274, 2004.

### ②その他の論文

Nishiyama Y, Hirota T, Morisaki T, Hara T, Marumoto T, Iida S, Makino K, Yamamoto H, Hiraoka T, Kitamura N, Saya H.

A human homolog of Drosophila warts tumor suppressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis.

*FEBS Lett.* 459: 159-165, 1999.

Morisaki T, Hirota T, Iida S, Marumoto T, Hara T, Nishiyama Y, Kawasuji M, Hiraoka T, Mimori T, Araki N, Izawa I, Inagaki M, Saya H.

WARTS tumor suppressor is phosphorylated by Cdc2/cyclin B at spindle poles during mitosis.

*FEBS Lett.* 529: 319-324, 2002.

### 3. 謝辞

本研究を遂行するにあたりご指導、ご支援くださいました熊本大学大学院医学研究科腫瘍医学講座 佐谷秀行教授、同外科学第一講座 川筋道雄教授、ならびに両教室の皆様に深く感謝いたします。また、熊本大学発生医学研究センター一再建医学部門器官制御講座 中尾光善教授、ならびに同教室の皆様にご支援いただきましたことを厚く御礼申し上げます。



#### 4. 略語一覽

BSA ; bovine serum albumin

cDNA ; complementary DNA

mRNA ; messenger RNA

EGTA ; ethyleneglycoltetraacetic acid

EDTA ; ethylenediaminetetraacetic acid

PBS ; phosphate buffered saline

DIC ; Differential Interference Contrast

PI ; propidium iodide

SDS ; sodium dodecyl sulfate

Tris ; tris(hydroxymethyl)aminomethane

FITC ; fluorescein isothiocyanate

## 5. 研究の背景と目的

### 5-1. 細胞周期チェックポイント

増殖能を持つ正常細胞は、複製・分裂の途上において遺伝子や染色体の異常が生じた場合、一時的に細胞周期を停止しその修復を試みる。そして、損傷が修復できた場合は細胞周期が再開し複製、分裂をおこなうが、修復不能な場合は細胞死を誘導することにより、損傷細胞を組織から除去する作業がおこなわれる。このステップを一般にチェックポイントと呼び、個体が正常な組織構築を維持するための重要な機構として機能している(Hartwell & Weinert, 1989)。細胞周期の各フェーズに設定されたチェックポイント(図1)は、様々な細胞内分子が関係することにより制御されており、それらの分子自身あるいは関係に異常が生じることにより、多発性の遺伝子変異や染色体の不均衡分配など「ゲノム不安定化」が発生し、細胞の腫瘍化ならびに悪性化が生じてくると考えられている(Hartwell, 1992)。

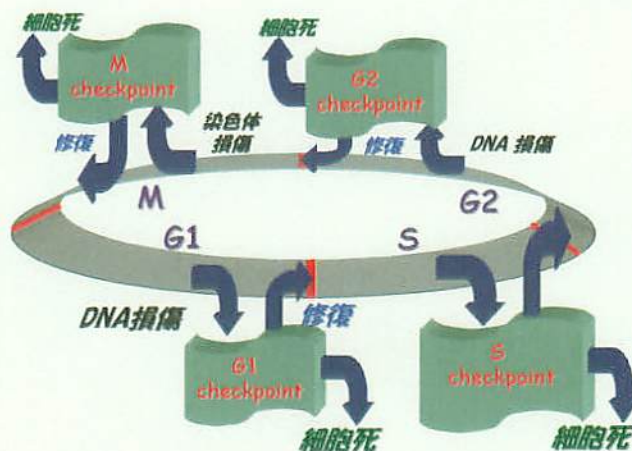


図1) 細胞周期チェックポイント

細胞周期の進行は G1 チェックポイント、S チェックポイント、G2 チェックポイントおよび M チェックポイントにより監視されている。

## 5-2. スピンドルチェックポイント (Mチェックポイント)

細胞は分裂期において、染色体凝縮、核膜崩壊、双極性紡錘体形成、染色体分離、細胞質分裂という非常にダイナミックな一連の形態変化を行う。母細胞がその遺伝情報を正確に二つの娘細胞へ継承することができるよう、これらのイベントの一つ一つがリン酸化反応や脱リン酸化反応などを含む一連の化学反応によって極めて巧妙に制御されている。スピンドルチェックポイントは細胞分裂の際に姉妹染色体が2つの娘細胞に正しく分配されるように、分裂中期において両極の中心体から伸びた紡錘系微小管(スピンドル)が全ての姉妹染色体の動原体(キネトコア)に結合していることを監視する機構であり、そのため、スピンドルに未接続のキネトコアが存在する場合、姉妹染色体が解離しないように分裂前中期で細胞周期の進行を停止させる。スピンドルチェックポイントの機能を失った酵母では染色体数が不安定化し、異数体、倍数体が高頻度に出現する。また、染色体数が不安定なヒト癌細胞では、スピンドルチェックポイントに関与する遺伝子に変異が起きていることが示され、スピンドルチェックポイントの機能が癌抑制に寄与している可能性が示唆されている(Cahill et al., 1998)。スピンドルチェックポイントに関与している遺伝子として *Mps1* (monopolar spindle)、*Bub1*、*Bub2*、*Bub3*(budding uninhibited by benimidazole)、*Mad1*、*Mad2*、*Mad3* (mitotic arrest defective) などが同定されており(Hoyt et al., 1991; Li & Murray, 1991)、これらの遺伝子産物はスピンドルと未接続のキネトコアやスピンドルダメージ(微小管重合阻害剤など)の存在下にチェックポイント活性化のシグナルを伝達していると考えられるが、最終的にはユビキチンリガーゼである後期促進複合体(Anaphase Promoting Complex: APC)と、そのコファクターであるCdc20の複合体(Cdc20-APC)によるユビキチン依存的

タンパク分解反応を阻害することによって分裂期の停止が誘導される(Hwang et al., 1998; Visintin et al., 1997)。

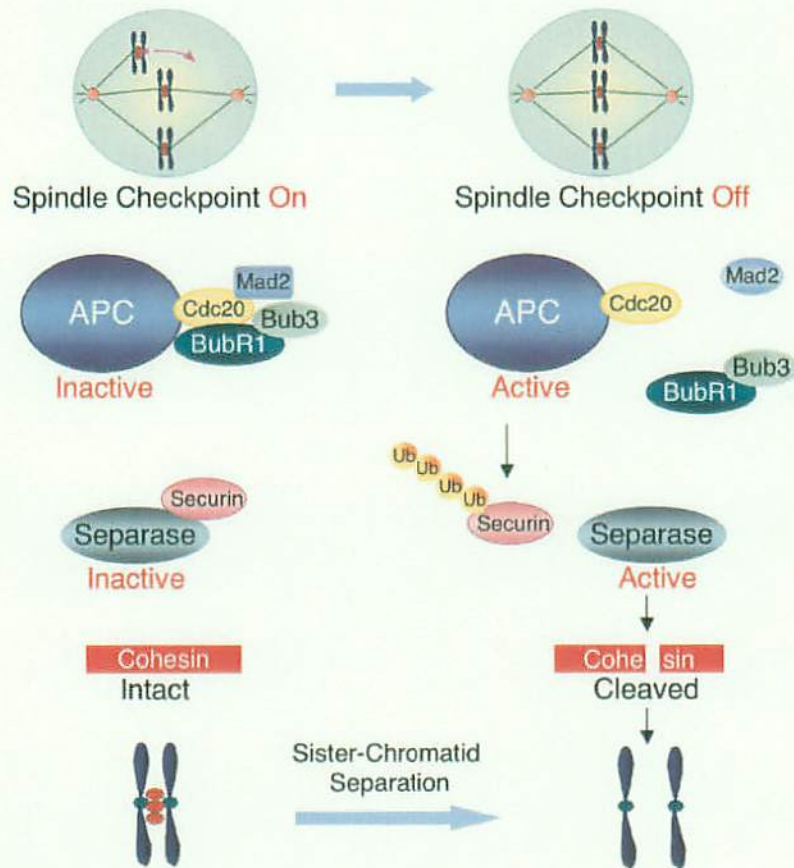


図2) 染色体分離の分子メカニズム

分裂中期から後期への移行時に Cdc20-APC 複合体が Securin をユビキチン化する。Securin の分解は Separase を活性化する。活性化した Separase は Cohesin の Scc1 サブユニットを切断し、染色体の分離が起こる。両極からのスピンドルが正しく結合していないキネトコアが存在するとチェックポイントタンパク複合体の形成が促進され、これが Cdc20-APC 複合体を阻害することにより Securin の安定化、姉妹染色体間の接着保持、分裂後期開始の遅延が起こる。((Bharadwaj & Yu, 2004)より引用)

スピンドルチェックポイントタンパクのひとつである Mad2 は間期には核膜上に存在し、分裂前期から分裂前中期にかけてスピンドルの結合していないキネトコア上に局在する。このとき Mad2 は Mad1、Mad3、Bub1、Bub3 タンパクと複合体を形成し、この Mad2 複合体は Cdc20-APC 複合体に結合しこれを不活性化するために、Securin のユビキチン化・分解が阻害され分裂中期で停止する。そして両極からのスピンドルがすべてのキネトコアに結合し (bipolar attachment)、すべての染色体が赤道面上に整列すると、Mad2 複合体が Cdc20-APC 複合体からはずれ、Cdc20-APC 複合体が活性型となり Securin のユビキチン化・分解がおこなわれる。この Securin の分解により活性化された Separase が姉妹染色分体間の Cohesin を分解して分裂後期が始まる (図 2) (Cohen-Fix et al., 1996; Stemmann et al., 2001; Waizenegger et al., 2000)。Mad2 タンパクは bipolar attachment に伴いキネトコアから消失することから、Mad2 タンパクのキネトコア上への局在はスピンドルチェックポイントの活性化の指標となっている (Chen et al., 1996; Li & Benezra, 1996; Shah & Cleveland, 2000)。

### 5-3. G1 期 4 倍体チェックポイントと染色体不安定性

上述したようにスピンドルチェックポイントの活性化により細胞周期は分裂前中期で停止するが、チェックポイントの活性化が長期におよぶと姉妹染色体の分離や細胞質分裂をスキップして分裂期を脱出し、4 倍体のまま G1 期に進入する細胞が出現する。この現象は 'mitotic slippage' あるいは 'adaptation' と呼ばれている (Di Leonardo et al., 1997; Rieder & Palazzo, 1992)。通常は、このような細胞が次の DNA 複製を開始しないように p53 および pRb 経路に依存し



た監視機構がはたらき、G1 期停止が誘導される（図 3）。

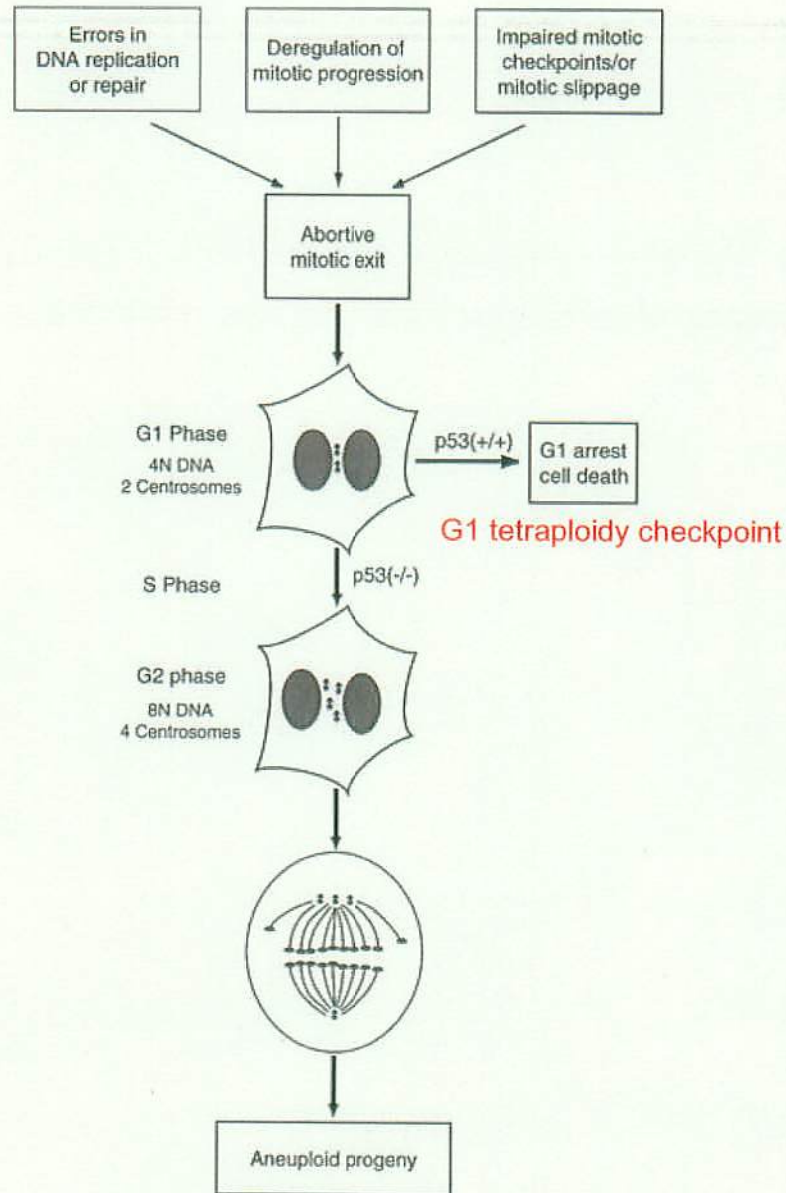


図 3) G1 期 4 倍体チェックポイントの概要

G1 期 4 倍体チェックポイントは正常な細胞分裂の遂行を妨げるいろいろな原因によって誘導され、p53 に依存する。(Meraldi et al., 2002) より引用) 図には示していないが、pRb の欠損によってもチェックポイントが破綻する。

この監視機構のことを G1 期 4 倍体チェックポイント (G1 tetraploidy checkpoint) という (Margolis et al., 2003)。G1 期 4 倍体チェックポイントが破綻した細胞は G1 期に停止できずに S 期に進入し DNA 合成をおこない、結果として 8N あるいはそれ以上の DNA 量を有する細胞の出現を見ることになる。またこのような多倍体 (polyploidy) 細胞は中心体の数もその複製によって増加しているため、次の細胞分裂の際に多極性紡錘体 (multipolar spindle) を形成する可能性が生じ、これにより染色体数の不均等分配が引き起こされ、異数体 (aneuploidy) 出現の原因となりうる。

このように、癌発生過程にしばしば見られる特徴の一つである異数体の前駆状態 (Shackney et al., 1989) ともいえる多倍体を形成するためには、分裂期の異常により分裂を失敗するだけでは不十分で、それに加えて G1 期 4 倍体チェックポイントが破綻していることが必要な条件であると考えられる。

#### 5-4. WARTS キナーゼと分裂期の関連性

*warts* (または *lats*) はショウジョウバエの癌抑制遺伝子として同定された遺伝子であり (Justice et al., 1995)、その遺伝子産物は human myotonic dystrophy protein kinase (DM-PK) family と相同性の高いセリン・トレオニンキナーゼドメインを持っているタンパクである (図 4)。この DM-PK family キナーゼは様々な分裂期のイベントに関与していることが報告されている (Toyn & Johnston, 1994; Yasui et al., 1998)。のちに *warts* のヒトホモログである *WARTS* (または *LATS1*) が同定され (Nishiyama et al., 1999; Tao et al., 1999)、マウスにおける *WARTS* のノックアウトでもショウジョウバエと同様に悪性腫瘍を形成することから、*WARTS* は哺乳動物細胞においても癌抑制タンパクとして機能している

ことが示唆された(St John et al., 1999)。さらに最近、ヒトの軟部組織肉腫において *WARTS* のミスセンス変異が発見され、*WARTS* タンパクの機能変化がヒトの腫瘍発生過程においても病理学的な意義を持つ可能性が示唆された(Hisaoka et al., 2002)。

*WARTS* は 1130 アミノ酸からなる分子量約 165kDa のタンパクで、カルボキシル基側末端 (705-1010 番アミノ酸) に保存されたキナーゼドメインを有する(図 4)。

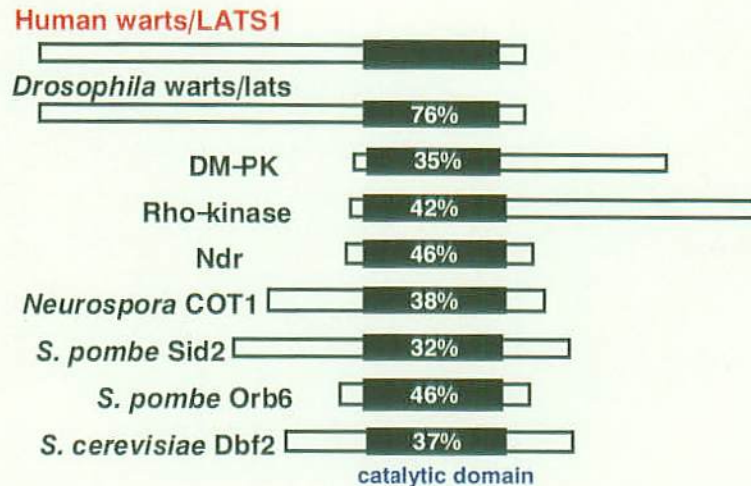


図 4) DM-PK family キナーゼと *WARTS*

*WARTS* の mRNA は肺、腎以外のほとんどのヒト成人臓器で検出され、ウェスタンブロットで見るとそのタンパク量は細胞周期を通じてほぼ一定であるが、分裂期特異的にリン酸化を受けてシフトしているのが観察され(図 5)、のちに Cdc2 キナーゼによるリン酸化部位を持っていることがわかった。(Morisaki et al., 2002; Nishiyama et al., 1999)。



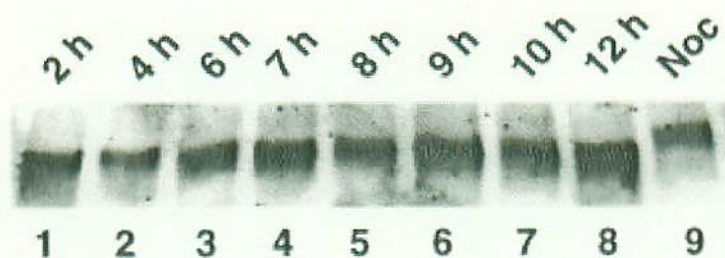


図5) WARTS は分裂期特異的にリン酸化される

HeLa 細胞をダブルサイミジン法で G1/S 移行期に同調、リリースしたものを経時的に(2~10h)回収し WARTS のウェスタンブロットをおこなった。分裂期(8~12h)において泳動度が遅くなっている。右端はノコダゾール処理で分裂前中期に同調したもの。(Nishiyama et al., 1999)

WARTS の細胞内局在は細胞周期依存的に変化することが知られ、間期細胞においては中心体 (centrosome) および細胞質に局在し、分裂期に入ると紡錘体極 (spindle poles) および紡錘体 (spindle) 上に局在するようになり、分裂終期には midbody へとダイナミックな局在変化を見せる(Nishiyama et al., 1999)。さらに WARTS は分裂期特異的にアクチンフィラメントの制御因子である zyxin と分裂装置上で会合することがわかり、この WARTS と zyxin の分裂期特異的な会合が分裂期の進行に重要な役割を持つことが報告されている(Hirota et al., 2000)。これらのことから、WARTS は哺乳動物細胞における分裂期のイベントに何らかの重要な役割を果たしており、WARTS の機能が欠損すると分裂期制御の異常が生じ、染色体の不安定性ひいては癌の発生を引き起こすことが想像される。しかしながら、現在に至るまで WARTS のキナーゼ活性を見出した報告

がないために、細胞周期における、または癌抑制タンパクとしての WARTS の機能に関しては不明なことが多い。

#### 5-5. 本研究の目的

WARTS キナーゼはその機能の欠損によって、ハエから哺乳動物に至るまで腫瘍の発生をみることから、腫瘍を抑制する機能を有することが想像される。また、WARTS の細胞周期依存的な翻訳後修飾（リン酸化）および中心体や分裂装置上への局在などからは、WARTS が細胞周期の制御、特に分裂期の制御に関わっていることが想像される。これらをあわせて考えると、WARTS キナーゼは細胞周期のおそらく分裂期を制御していて、WARTS が不活化することで細胞分裂に異常が生じ、染色体不安定性が惹起され、癌化しやすい環境になるという仮説が成り立つ。そこで本研究では、未だ報告されていない WARTS のキナーゼ活性を見出し、それが細胞周期の制御においてどのような役割を持つのか、また、その役割に基づいて WARTS の不活化が腫瘍の発生にどのように関連するかを明らかにすることを目的とした。そのために、ヒト WARTS のキナーゼ不活性型変異体をラット線維芽細胞に過剰発現させ、WARTS の機能阻害によって引き起こされる表現型の変化を解析することとした。

## 6. 実験方法

### 6-1. 細胞培養とトランスフェクション

すべての培養細胞は DMEM/F-12 培地 (GIBCO BRL 社) に最終濃度 10% の牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum, BLOWITTAKER 社) を加えたもので、37°C の 5% CO<sub>2</sub> 培養器にて継代培養した。Rat1 細胞のトランスフェクションには FuGene 6 Transfection Reagent (Roche 社) を用いた。

### 6-2. プラスミド

ヒト野生型 WARTS の発現ベクター pCGN HA-h-warts (Hirota et al., 2000) を鋳型とし、Pfu turbo DNA polymerase (Takara 社) を用いて 734 番アミノ酸の Lys を Ala に置換 (AAA→GCA) する site directed mutagenesis をおこない、cDNA の配列をシークエンスにて確認し、キナーゼ不活性型 WARTS の cDNA を得た。つぎに野生型、キナーゼ不活性型 WARTS とともに cDNA を pCGN ベクターより制限酵素にて切り出し、アミノ基側末端に Myc タグを付加した pUHG 10-3 ベクター (Marumoto et al., 2002) に組み込んだ。

### 6-3. WARTS 安定発現 Rat1 細胞株の作製

pUHG10-3 Myc-WARTS (野生型 or キナーゼ不活性型) ベクターと tetracycline transactivator および Hygromycin 耐性遺伝子を有する ptTA-Hyg<sup>R</sup> ベクターを Rat1 細胞にコトランスフェクションし 48 時間培養後、200 µg/ml Hygromycin B (Wako 社) および 10 ng/ml Doxycycline (Sigma 社) を含む培養液に置換。一週間培養ののち Hygromycin 耐性クローンを単離し、ウェスタンブロットにて外来性タンパクの発現を確認した。

### 6-4. Immune-complex kinase assay

細胞抽出液はいずれも細胞溶解液 (0.5% NP-40, 100 mM NaCl, 2 mM EDTA, 5 mM EGTA, 50 mM HEPES-KOH (pH7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 5 mM KCl, 100 µM leupeptin, 1 µM pepstatin, 100 µM Tosyl Lysine Chloromethyl

Ketone (TLCK), 100 nM okadaic acid, 2 mM benzamidine, and 1 mM dithiothreitol) にて細胞を氷上で 20 分間溶解し 18,000 × *g*、4°C で 20 分間遠心後、上清を回収して得た。この細胞抽出液に先ず protein G–Sepharose beads (Amersham Pharmacia 社) を加えインキュベート (4°C、30 分間) し、非特異的なビーズ結合タンパクを除去した (preclear)。preclear した細胞抽出液に抗 Myc 抗体 (9E10; Roche 社) あるいは抗 WARTS 抗体 (G3; (Hirota et al., 2000)) を加え、氷上で 2 時間インキュベートののち protein G–Sepharose beads を加え、さらに 4°C、90 分間インキュベートした。ビーズは遠心して回収し細胞溶解液にて 3 回洗浄、さらに 500mM NaCl を含む細胞溶解液にて 1 回洗浄し、一部をウェスタンブロット用に分注、残りを *in vitro* kinase assay に用いた。キナーゼ反応は 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 μCi of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (3000 Ci/mmol) (Amersham Pharmacia 社), および 1 μM microcystin を含む 30μl の反応系で 30°C、30 分間おこなった。キナーゼ反応は SDS サンプルバッファー (2% SDS, 10% glycerol, 50mM Tris pH6.8) を加え 95°C、5 分間煮沸し終了させ、ビーズより溶出したタンパクを 5-15% パジェル (ATTO 社) を用いて電気泳動で展開した。電気泳動後、ゲルをゲルドライヤーにて乾燥し、オートラジオグラフィーを行ないリン酸化反応を検出した。

#### 6-5. ウェスタンブロット法

細胞抽出液または免疫沈降反応後のビーズを SDS サンプルバッファーとともに 95°C、5 分間煮沸し、タンパクをポリアクリルアミドゲル電気泳動にて展開。ゲル上に展開されたタンパクをニトロセルロースメンブレン (Amersham Biosciences 社) に 140mA、2 時間で転写した。タンパク転写後のメンブレンはブロッキングバッファー (5% スキムミルク入り PBS 溶液) で室温、1 時間ブロッキングした後、各種 1 次抗体を 4°C で 1 ~ 2 時間反応させた。使用した抗体は次の通り: 抗 WARTS 抗体 (G3、500 倍; (Hirota et al., 2000))、抗 Myc 抗体 (9E10、1000 倍; Roche 社)、抗  $\alpha$ -tubulin 抗体 (B5-1-2、5000 倍; Sigma 社)、抗 p53 抗体 (R-19、1000 倍; Santa Cruz 社)。1 次抗体反応後、2 次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗 IgG 抗体 (ラット: G3、マウス: 9E10 および B5-1-2、

ヤギ：R-19) を室温で 40 分間反応させ、最後に化学蛍光発色検出システムによってタンパクの発現を可視化した。

#### 6-6. 蛍光免疫染色法および共焦点レーザー顕微鏡による観察

35mm 培養ディッシュに培養した各種細胞を PBS にて洗浄後、4% パラホルムアルデヒドにて室温で 15 分間固定。PBS にて洗浄後、0.2% ToritonX-100/PBS 溶液にて室温、5 分間インキュベート。PBS にて洗浄後、3% BSA/PBS 溶液にて室温で 1 時間ブロッキング。ブロッキング後、0.03% Tween20/PBS 溶液で希釈した 1 次抗体と室温で 1 時間反応させた。使用した抗体は次の通り：抗 $\gamma$ -tubulin 抗体（ラビットポリクローナル、200 倍；Sigma 社）、抗 Myc 抗体（9E10、200 倍；Rche 社）、抗 $\alpha$ -tubulin 抗体（ラットポリクローナル、200 倍；Novus Biologicals 社）、抗 $\alpha$ -tubulin 抗体（B5-1-2、1000 倍；Sigma 社）、抗 Mad2 抗体（ラビットポリクローナル、200 倍；(Marumoto et al., 2003)）。1 次抗体反応後、PBS にて洗浄、それぞれ対応する 2 次抗体と室温で 50 分間反応させた。2 次抗体はいずれも 0.03% Tween20/PBS 溶液で 200 倍希釈し、希釈液には最終濃度 1mg/ml の RNaseA を加えた。使用した 2 次抗体は次の通り：fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗マウス IgG 抗体、fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識抗ラビット IgG 抗体（以上、Amersham Pharmacia 社）、Alexa 568 標識抗ラビット IgG 抗体、Alexa 568 標識抗ラット IgG 抗体（以上、Molecular Probes 社）。2 次抗体反応後、0.2 $\mu$ g/ml propidium iodide にて DNA 染色を室温で 5 分間おこない PBS にて洗浄、80% グリセロールでマウントした。観察および画像の記録には Olympus 社の共焦点レーザー顕微鏡 FV300 を使用した。

#### 6-7. フローサイトメトリー

細胞をトリプシン/EDTA 処理にて回収、PBS で洗浄し 70% エタノールにて固定（12~24 時間）した。固定後の細胞を PBS で洗浄、1mg/ml RNaseA (Sigma 社) 30 分間処理ののち 25 $\mu$ g/ml propidium iodide (Sigma 社) にて DNA 染色（5 分間）した。DNA 含有量の解析には FACScaliber (Becton Dickinson 社) および解析ソフト Cell Quest (Becton Dickinson 社) を使用した。

## 6-8. タイム・ラプスマイクロスコピー

細胞は専用の $\Delta T$  ディッシュ (Biopteches 社) で培養。培養液は観察の直前に最終濃度 10% の牛胎児血清 (Fetal Bovine Serum, BLOWITTAKER 社) を加えた pH 7.2 の L-15 培養液 (Sigma 社) に置換し、乾燥を防ぐため培養液の表面をミネラルオイルで完全に覆った。 $\Delta T$  ディッシュは  $\Delta T$  Culture Dish System (Biopteches 社) にて 37°C に維持した。画像は SenSys-1401E CCD カメラ (Roper Scientific 社) をオリンパス IX70 顕微鏡 (Olympus 社) に装着し、DIC 画像を 10x Uplan Apo 対物レンズ (Olympus 社) を使用し撮影した。カメラ、シャッターおよびフィルターの設定には MetaMorph 画像取得ソフト (Universal Imaging 社) を使用した。画像は 50msec の露出時間で 5 分間ごとに撮影した。一回の撮影ごとに 3 枚ずつ Z 軸方向の焦点を変えた画像を取り込み、適切な焦点の画像を選択して保存した。

## 7. 実験結果

### 7-1. WARTS キナーゼは分裂期特異的に活性化する

細胞周期における内因性 WARTS のキナーゼ活性の変化を調べるために、ヒト乳癌細胞株 HeLa の非同調培養細胞および微小管重合阻害剤ノコダゾール処理による分裂前中期同調細胞の細胞抽出液よりそれぞれ WARTS に対する抗体を用いて免疫沈降をおこない、免疫沈降複合体による *in vitro* kinase assay をおこなった。図 1 a の下段に示すように、免疫沈降複合体中にはほぼ同量の WARTS タンパクが含まれていたが、非同調培養細胞 (Asyn) では WARTS の活性はほとんど検出されなかったのに対して、分裂期同調細胞 (M phase) では自己リン酸化と思われるキナーゼ活性の著明な上昇がみられた (図 1 a)。

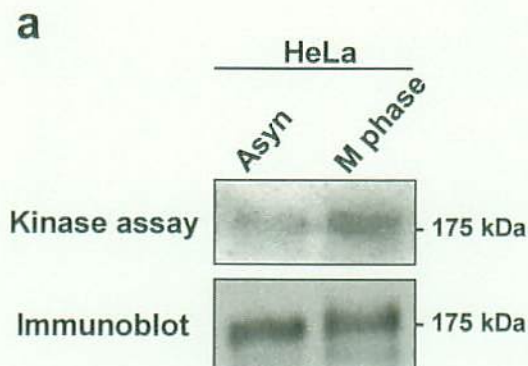


図 1 a) 内因性 WARTS の自己リン酸化活性

HeLa 細胞の非同調培養細胞およびノコダゾール処理 (50ng/ml, 10hr) による分裂期同調細胞の細胞抽出液より WARTS に対する抗体(Hirota et al., 2000) を用いて内因性 WARTS を免疫沈降し、ウェスタンブロット (下段) にて WARTS の沈降を確認ののち、同免疫複合体による *in vitro* kinase assay (上段: オートラジオグラフィー) をおこなった。分子量マーカーを右側に示す。



このリン酸化反応が免疫沈降物に混入した WARTS 以外のキナーゼによる可能性を除外するために、ラット線維芽細胞株 Rat1 を用いてヒト WARTS の野生型およびキナーゼ不活性型変異体それぞれの安定発現細胞株を樹立し、キナーゼ活性の確認を行うこととした。野生型 WARTS 発現細胞株を WTW1、キナーゼ不活性型 WARTS 発現細胞株を KDW1 と名づけた。



図 1 b) WARTS 安定発現 Rat1 細胞株における Myc-WARTS タンパクの発現示された細胞株の細胞抽出液を SDS 化、6% ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて展開し、抗 Myc 抗体（上段）、抗 WARTS 抗体（中段）、抗 $\alpha$ -tubulin 抗体（下段）を用いてウェスタンブロットをおこなった。分子量マーカーを右側に示す。

WARTS のキナーゼ不活性型変異体は ATP 結合ドメインの機能に重要な役割を持つ 734 番目の lysine を alanine に置換したものであり(Hanks et al., 1988)、この置換によりキナーゼ活性を失うことが報告されている(Hanks et al., 1988; Xia et al., 2002)。野生型 WARTS およびキナーゼ不活性型 WARTS それぞれにアミノ基末端に Myc エピトープタグを付加しており、抗 Myc 抗体を用いたウェスタンブロットにより図 1 b に示すような外来性のヒト WARTS タンパク（以下 Myc-WARTS）の発現を確認した。また、野生型 Myc-WARTS およびキナーゼ



不活性型 Myc-WARTS いずれも間期の細胞においては細胞質および中心体に局在し、分裂期の細胞においては分裂装置上に局在した (図 1 c)。

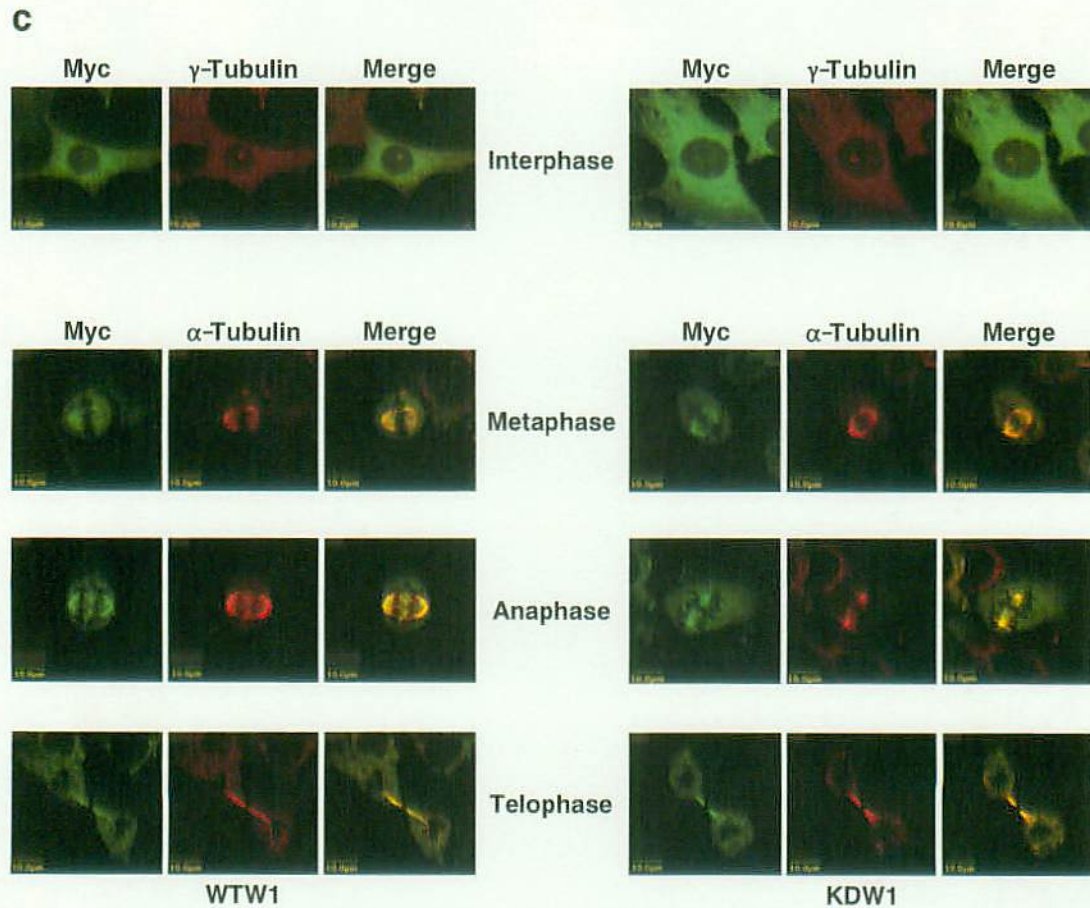


図 1c) WARTS 安定発現 Rat1 細胞株における Myc-WARTS タンパクの細胞内局在  
WTW1 細胞および KDW1 細胞の非同調培養細胞に対し免疫染色をおこなった。間期  
(Interphase) 細胞は抗 Myc 抗体 (FITC、緑色) および抗  $\gamma$ -tubulin 抗体 (Alexa 568、  
赤色) にて染色。分裂中期 (Metaphase)、分裂後期 (Anaphase)、分裂終期 (Telophase)  
の細胞は抗 Myc 抗体 (FITC、緑色) および抗  $\alpha$ -tubulin 抗体 (Alexa 568、赤色) に  
て染色した。

この所見は以前に報告された内因性 WARTS の細胞周期依存的な局在と一致する所見であった(Nishiyama et al., 1999)。つぎに、この野生型 Myc-WARTS が内因性 WARTS と同様に分裂期においてキナーゼ活性を発揮するか検討した。



図 1d) WARTS は分裂期特異的に活性化する

WTW1 細胞の非同調細胞 (Time: 0) およびノコダゾール処理 (50ng/ml, 10hr) による分裂前中期同調からリリースし経時的に回収した細胞 (Time: 5-30) の細胞抽出液より抗 Myc 抗体で Myc-WARTS を免疫沈降し、*in vitro* kinase assay をおこなった (上段)。同免疫沈降複合体の一部を用い、抗 WARTS 抗体にてウェスタンブロットをおこない免疫複合体中の WARTS の存在を確認した (下段)。分子量マーカを右側に示す。

WTW1 細胞をノコダゾール処理 (50ng/ml, 10hr) にて分裂前中期に同調し、つぎに通常培養液に置換することで同調からリリースさせ 5 分おきに細胞を回収、これらの細胞抽出液より Myc タグに対する抗体を用いて野生型 Myc-WARTS を免疫沈降し *in vitro* kinase assay をおこなった。すると、Myc-WARTS と同レベルの泳動度を呈するリン酸化バンドが分裂期の進行に伴って出現し、分裂前中



期同調からリリース後 10 分から 15 分の時点で活性のピークを示した(図 1 d)。  
 このリン酸化反応は KDW1 細胞から同様に免疫沈降して得られたキナーゼ不活性型 Myc-WARTS の反応系ではみられなかったことから (図 1 e)、このリン酸化が野生型 Myc-WARTS 以外の混入したキナーゼによるものではなく、Myc-WARTS 自身による自己リン酸化反応であることが明らかとなった。

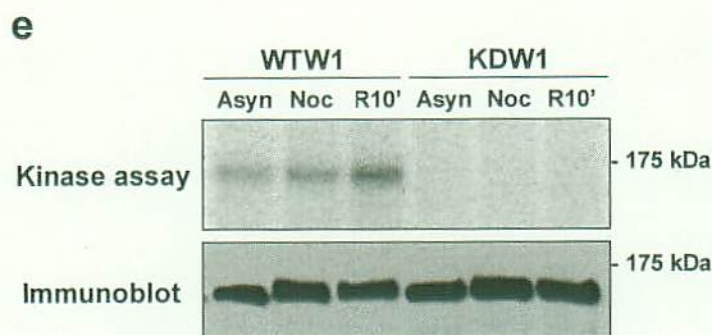


図 1e) WARTS の自己リン酸化反応

WTW1 細胞および KDW1 細胞の非同調培養細胞 (Asyn)、ノコダゾール処理 (50ng/ml, 10hr) による分裂前中期同調細胞 (Noc)、および同調からリリースし 10 分後に回収した細胞 (R10') の細胞抽出液よりそれぞれ抗 Myc 抗体で Myc-WARTS を免疫沈降し、*in vitro* kinase assay をおこなった (上段: オートラジオグラフィー)。同免疫沈降複合体の一部を用い、抗 WARTS 抗体にてウェスタンブロットをおこない免疫複合体中の WARTS の存在を確認した (下段)。分子量マーカーを右側に示す。

また、WTW1 細胞の非同調培養細胞より同様に免疫沈降した野生型 Myc-WARTS がほとんどキナーゼ活性を示さないことから (図 1 e)、WARTS が分裂期特異的に活性化することが明らかとなった。

## 7-2. キナーゼ不活性型 WARTS の過剰発現は染色体数異常を引き起こす

つぎに、野生型 WARTS およびキナーゼ不活性型 WARTS の過剰発現が Rat1 細胞の表現型に及ぼす影響について検討した。通常の培養条件において WTW1 細胞は Parent の Rat1 細胞に比べて増殖が遅い傾向がみられたが、KDW1 細胞は WTW1 細胞よりもさらに増殖が遅い傾向にあった (図 2 a)。

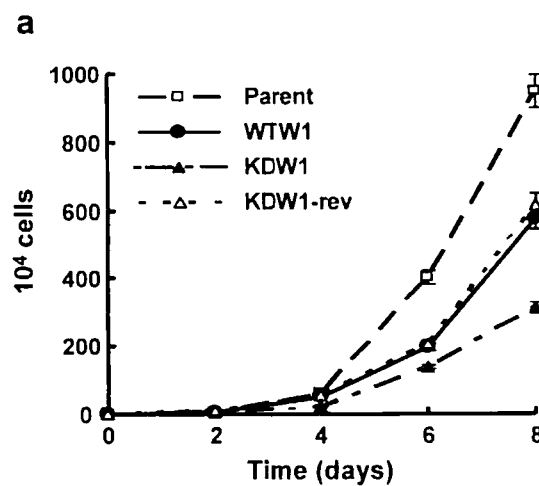


図 2a) WARTS の高発現による増殖速度の変化

10cm の細胞培養ディッシュに各々の細胞株を  $1 \times 10^4$  個播き、通常培養液にて培養し、2 日間おきに細胞数をカウントした。3 回の独立した実験を行い平均をプロットした。横軸は時間 (日数) を、縦軸は細胞数を示す。

興味深いことに、KDW1 細胞を長期にわたって継代していくと、およそ 23 代目以降からキナーゼ不活性型 Myc-WARTS の発現が減弱し、ついには Myc-WARTS の発現を失った細胞が見られるようになった (図 1 b, 2 c)。この revertant KDW1 細胞 (以下 KDW1-rev 細胞) をクローニングし表現型を比較すると、WTW1 細

胞とほぼ同じ増殖速度を呈するようになっていた（図 2 a）。非同調培養細胞のフローサイトメトリーによる解析では、WTW1 細胞および KDW1-rev 細胞は Parent Rat1 細胞と同様に DNA 量が 2N および 4N の二つのピークを呈するのに対して、KDW1 細胞は 2N の比率が減少し、かわって 4N および 8N に該当する細胞の比率が増加していることがわかった（図 2 b）。

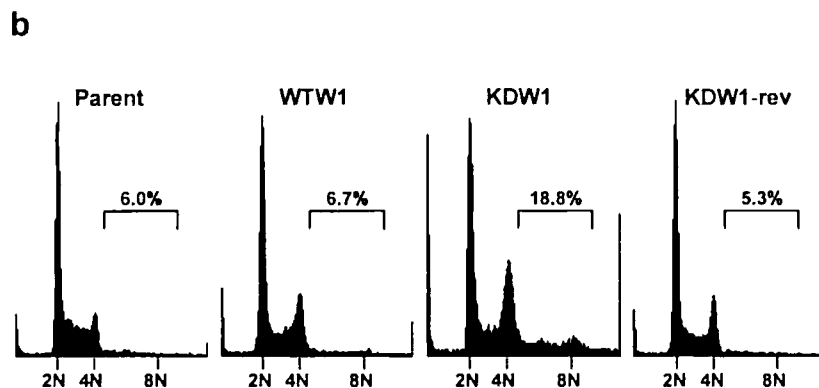


図 2b) 非同調培養細胞のフローサイトメトリー解析

非同調培養細胞をトリプシン処理にて回収、70% エタノール固定ののち DNA を propidium iodide で染色し FACScaliber にて解析した。横軸は DNA 含有量を、縦軸は細胞の数を示す。図中のパーセント表示は 4N を超える DNA 含有細胞の割合を示している。

さらに図 2 c に示すように、それぞれの細胞株の DNA を PI 染色して核の形態を観察すると、WTW1 細胞および KDW1-rev 細胞の核は Parent Rat1 細胞の核と比較して著しい変化は見られなかったのに対して、KDW1 細胞の核は概して大きく、巨核や多核、分葉核などの核型の異常を有する細胞が高頻度にみられた。

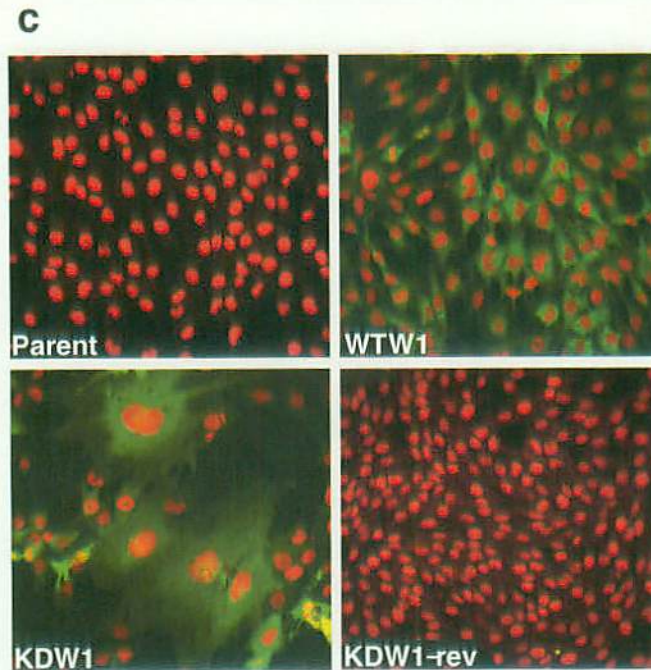


図 2c) 不活性型 WARTS の高発現による細胞核の形態変化  
 非同調培養細胞を 4% パラホルムアルデヒド固定ののち免疫染色をおこなった。  
 抗 Myc 抗体 (FITC、緑色) にて Myc-WARTS タンパクを、propidium iodide (赤  
 色) にて DNA を染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

これらの細胞株の染色体数を計測したところ、WTW1 細胞および KDW1-rev 細胞は Parent Rat1 細胞と同様にすべて 2 倍体であるのに対して、KDW1 細胞においては 4 倍体に相当する数の染色体を持つ細胞が 30% もみられた (図 2 d)。2 倍体および 4 倍体以外の染色体数分布がみられないのが特徴であり、KDW1 細胞における 4 倍体出現の原因として分裂期における姉妹染色体の分離異常あるいは細胞質分裂の異常が示唆された。キナーゼ不活性型 Myc-WARTS の発現を失った KDW1-rev 細胞が Parent Rat1 細胞や WTW1 細胞とほぼ同じ表現型を

呈することからも、核の形態異常や4倍体出現を特徴とする染色体数の異常といったKDW1細胞の表現型がキナーゼ不活性型 Myc-WARTS の過剰発現に起因しているものと考えられた。

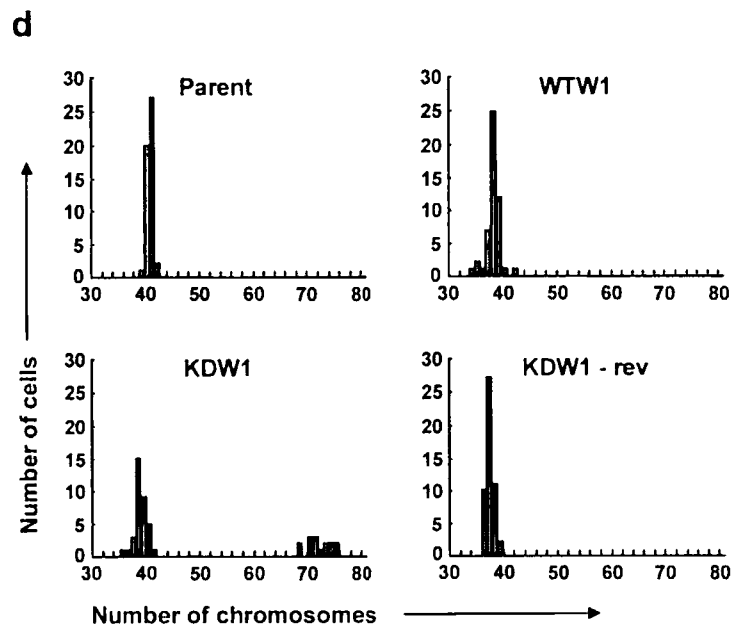


図 2d) 不活性型 WARTS の高発現による染色体数分布の変化  
非同調培養において染色体が凝縮し同定可能な分裂中期の細胞 50 個の染色体数をカウントし、グラフ化した。横軸は染色体の数を、縦軸は細胞の数を示す。

### 7-3. キナーゼ不活性型 WARTS の過剰発現によってスピンドルチェックポイントが遷延する

これまでの KDW1 細胞の表現型から分裂期異常の存在が疑われるため、キナーゼ不活性型 WARTS の過剰発現が分裂期の進行に与える影響について検討した。はじめにタイムラプスマイクロスコピーを用いて非同調培養時の分裂期細

胞の観察をおこなった。微分干渉モードで5分おきに観察をおこなうと、分裂期の細胞はまず平坦な間期細胞様の形態のものが周囲基質と離れ球状に変形することで同定され、姉妹染色体の分離とともに赤道面がくびれて細胞質が2つに分離し、最後には球状から元の平坦な間期細胞の形態をとるというように観察された。この球状になった時点から平坦に戻る時点までを分裂期所要時間として計測した (図 3 a)。ほとんどすべての Parent Rat1 細胞が分裂を終える30分間以内を正常範囲として計測すると、WTW1 細胞は90%の細胞が30分以内で分裂を終えるのに対して、KDW1 細胞では30分以内で分裂を終えたものはわずか4%であった。一方で、キナーゼ不活性型 WARTS タンパクの発現を失った

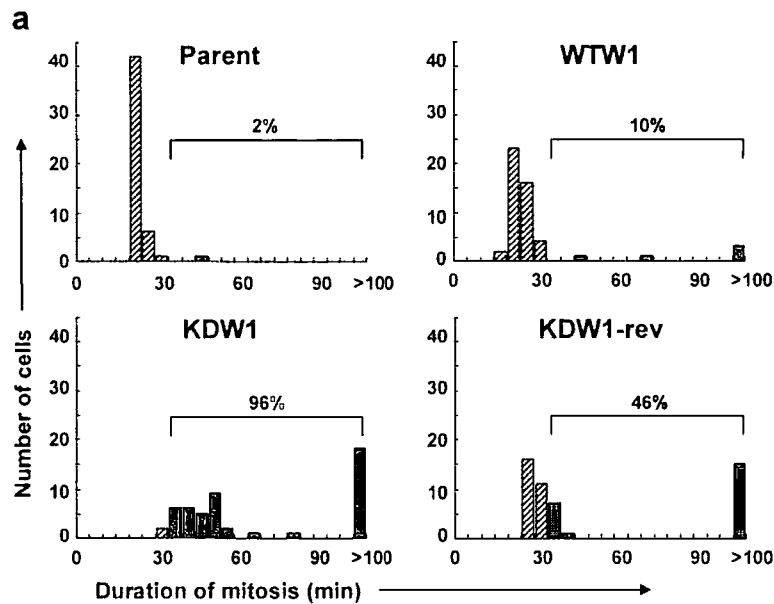


図 3a) 不活性型 WARTS の高発現による分裂期所要時間の変化

非同調培養細胞をタイムラプスマイクロスコープにて5分間隔で観察。分裂期細胞が球状になってから再び付着するまでの時間を分裂期所要時間として計測した。横軸は分裂に要した時間を、縦軸は細胞の数を示す。図中のパーセント表示は分裂期所要時間が30分を超えたものの割合を示している。



KDW1-rev 細胞では 30 分以内に分裂を終える細胞が 54%まで増加していた(図 3 a)。分裂期が遅延している細胞の形態上の特徴としては、球状になったままというものがほとんどであり、いったん赤道面にくびれが生じるとその後のプロセスには目立った遅延は見られなかった。このことから分裂期が遅延している細胞では分裂後期への進入が滞っていることが示唆された。さらに分裂期所要時間が 100 分を超えるような KDW1 細胞のなかには細胞質分裂をおこなうことなく分裂期を脱出してしまう(形態が平坦になる)ものがみられ、これらが図 2 d において 4 倍体として検出されている細胞である可能性が考えられた。また、KDW1 細胞の増殖速度が遅い(図 2 a) 理由として分裂期そのものの遅延に加え、細胞質分裂を失敗する細胞があることで見かけ上の細胞数が少なく計測されることが考えられた。

KDW1 細胞において分裂後期への進入が滞っている可能性をさらに検討すべく、紡錘体微小管の蛍光免疫染色をおこない分裂期の進行を詳細に観察した。WTW1 細胞および KDW1 細胞をノコダゾール処理(50ng/ml, 10hr)にて分裂前中期に同調し、その後通常培養液に置換し同調からリリースさせ 5 分おきに細胞を回収、 $\alpha$ -tubulin の免疫染色、DNA の PI 染色をおこない共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。WTW1 細胞はリリース後 15 分には姉妹染色体の分離が始まり、25 分には多くの細胞が分裂終期に達しているのが観察されたのに対し、KDW1 細胞はリリースから 25 分後においても分裂中期にとどまっているのが観察された(図 3 b)。これらの細胞を分裂期の各フェーズに分類しカウントすると KDW1 細胞は WTW1 細胞に比べて分裂後期への進入が遅延していることが明らかとなり(図 3 c)、さきのタイムラプスマイクロスコープでの形態観察の結果と一致した。

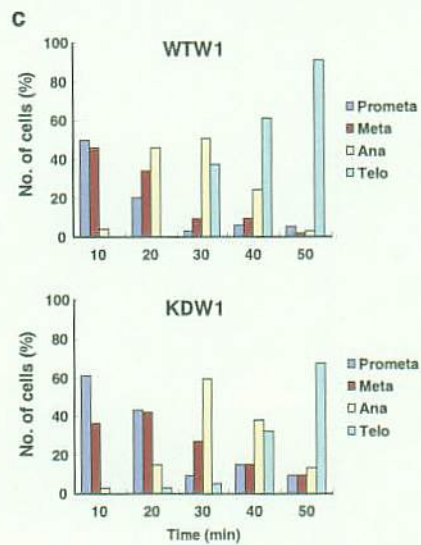
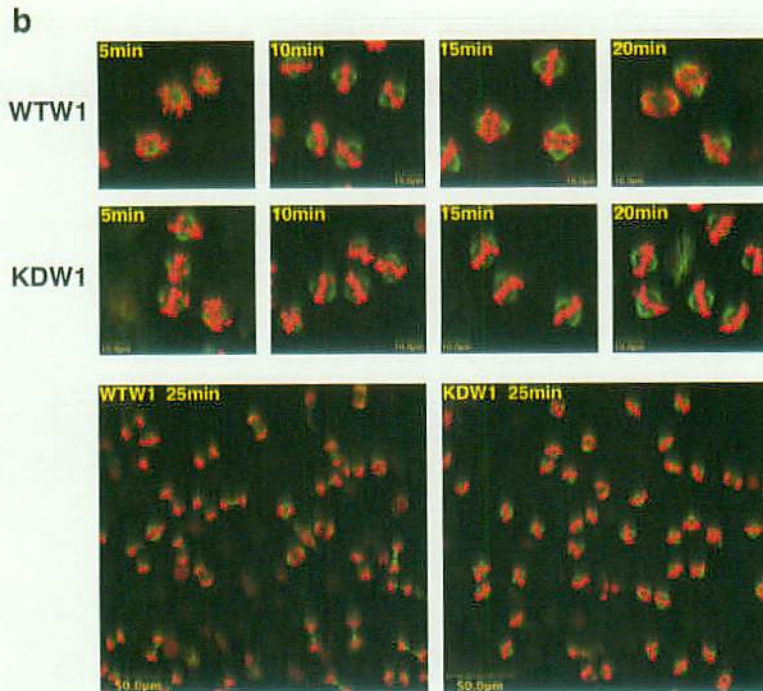


図 3b, c) 不活性型 WARTS 発現細胞における分裂前中期進行の遅延

b) WTW1 細胞および KDW1 細胞をノコダゾール処理 (50ng/ml, 10hr) で分裂前中期に同調し、通常培地にリリース後 5 分おきに回収、蛍光免疫染色をおこなった。抗 $\alpha$ -tubulin 抗体 (FITC、緑色) で微小管を、propidium iodide (赤色) にて DNA を染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。c) 上記観察にもとづいて分裂期の各 phase の細胞をカウントし、グラフ化したもの。

分裂後期への進入遅延の原因としてスピンドルチェックポイントの活性化あるいは後期促進複合体 (Anaphase Promoting Complex: APC) によるユビキチン依存的タンパク分解機構の破綻が考えられるが(Amon, 1999; King et al., 1995; Tugendreich et al., 1995)、図 3 b で分裂中期に停滞している KDW1 細胞の染色体を観察すると、赤道面上への整列が不完全なものが多く、KDW1 細胞においてスピンドルチェックポイントの活性化が起きている可能性を考え、スピンドルチェックポイントの構成タンパクである Mad2 の蛍光免疫染色を行うこととした。Mad2 はスピンドルが結合していないキネトコア (動原体) 上にリクルートされるタンパクで、スピンドルチェックポイントの活性化シグナルの指標とされているタンパクである(Shah & Cleveland, 2000)。WTW1 細胞および KDW1 細胞をノコダゾール処理 (50ng/ml, 10hr) にて分裂前中期に同調し、その後通常培養液に置換し同調からリリースさせ 20 分後に細胞を回収、Mad2 の免疫染色、DNA の PI 染色をおこない共焦点レーザー顕微鏡にて観察した (図 3 d)。図 3 b と同様にこの時点において WTW1 細胞ではすでに姉妹染色体が分離しているか、あるいは分離しないまでも全ての染色体が赤道面上に整然と並んでおり、Mad2 の蛍光シグナルもほんのわずかに認めるのみであった。これに対し、KDW1 細胞ではしばしば赤道面に整列できていない染色体がみられ、そのような染色体のキネトコアと思われる部位に Mad2 の強い蛍光シグナルが検出された。また KDW1 細胞では赤道面上に並んでいる染色体についても WTW1 細胞に比べてまとまりが悪く、しばしば Mad2 の蛍光シグナルが検出された。Mad2 陽性の染色体がひとつでも存在するとスピンドルチェックポイントの活性化に十分であることから(Nicklas, 1997)、スピンドルチェックポイントの活性化が遅延していることが KDW1 細胞の分裂期遅延の原因と考えられた。

d

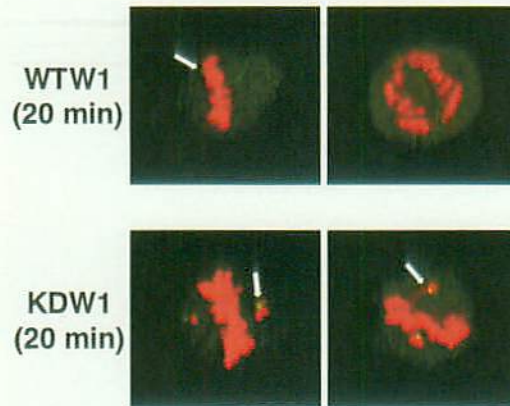


図 3d) 不活性型 WARTS 発現細胞におけるスピンドルチェックポイントの活性化 3b)と同様に WTW1 細胞 (上段) および KDW1 細胞 (下段) をノコダゾール処理 (50ng/ml、10hr) で分裂前中期に同調させ、通常培地にリリースし 20 分後に回収、蛍光免疫染色をおこなった。抗 Mad2 抗体 (FITC、緑色) で Mad2 タンパクを、propidium iodide (赤色) にて DNA を染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

このようにキナーゼ不活性型 WARTS の過剰発現はキネトコアの機能あるいはスピンドルの形成に異常をきたしスピンドルチェックポイントを活性化し、分裂前中期の遅延を引き起こすことが考えられた。分裂期に WARTS がスピンドル上に局在すること(Nishiyama et al., 1999)、および WARTS のキナーゼ活性のピークが分裂前中期から分裂中期に一致することから (図 1 d)、WARTS のキナーゼ活性はスピンドルのキネトコアへの結合や姉妹染色体の赤道面への整列に関するイベントを制御する重要な役割を果たしていることが示唆された。

#### 7-4. キナーゼ不活性型 WARTS の過剰発現は mitotic slippage 後の新たな DNA 合成を許してしまう

癌細胞が異数体となる過程には少なくとも2つのステップが必要であると考えられている。1つめのステップは分裂期に異常が生じ姉妹染色体の分離あるいは細胞質分裂に失敗し4倍体のまま分裂期を出てしまう過程 (mitotic slippage) で、2つめのステップはその4倍体の細胞をG1期に停止させるために働くべき p53 や pRb に依存した監視機構 (G1期4倍体チェックポイント) が機能しなくなることである(Margolis et al., 2003)。ここまでのところ KDW1 細胞においてスピンドルチェックポイントの遷延によって著しい分裂期の遅延をきたし、その結果分裂することなく4倍体のままG1期に入る細胞がみられることを示してきたが、一方で、少ないながらも WTW1 細胞や KDW1-rev 細胞においても分裂期の遅延した細胞 (図3a) がみられるうえに分裂せずG1期に入るものが観察されている (data not shown)。しかしながら、WTW1 細胞や KDW1-rev 細胞には4倍体は出現せず2倍体の細胞しかみられていない(図2d)。そこで WTW1 細胞、KDW1 細胞および KDW1-rev 細胞にノコダゾールの長時間処理をおこないスピンドルチェックポイント遷延状態を再現することによって、分裂せずにG1期に入った細胞に対してG1期4倍体チェックポイントが機能するかを検討した。これらの細胞にノコダゾール処理 (50ng/ml) を12時間おこない、形態が球状になった分裂前中期 (4N) の細胞のみを 'shake off' し回収、新しい培養ディッシュに移し引き続きノコダゾール存在下で18時間培養した。18時間培養後、まだ分裂前中期に停止している球状の細胞や浮遊した死細胞を 'shake off' し除去、そのあとに残った (ノコダゾール処理で分裂できないままG1期に入ったとみられる) 付着細胞のみを回収し、フローサイトメトリーに

よる解析を行った。その結果 KDW1 細胞において 8N 細胞の著明な増加をみとめ、ノコダゾール存在下で分裂できずに G1 期に入った 4N 細胞の多くが S 期に進出し、新たな DNA 合成を行い 8N となったことが示された (図 4 a)。

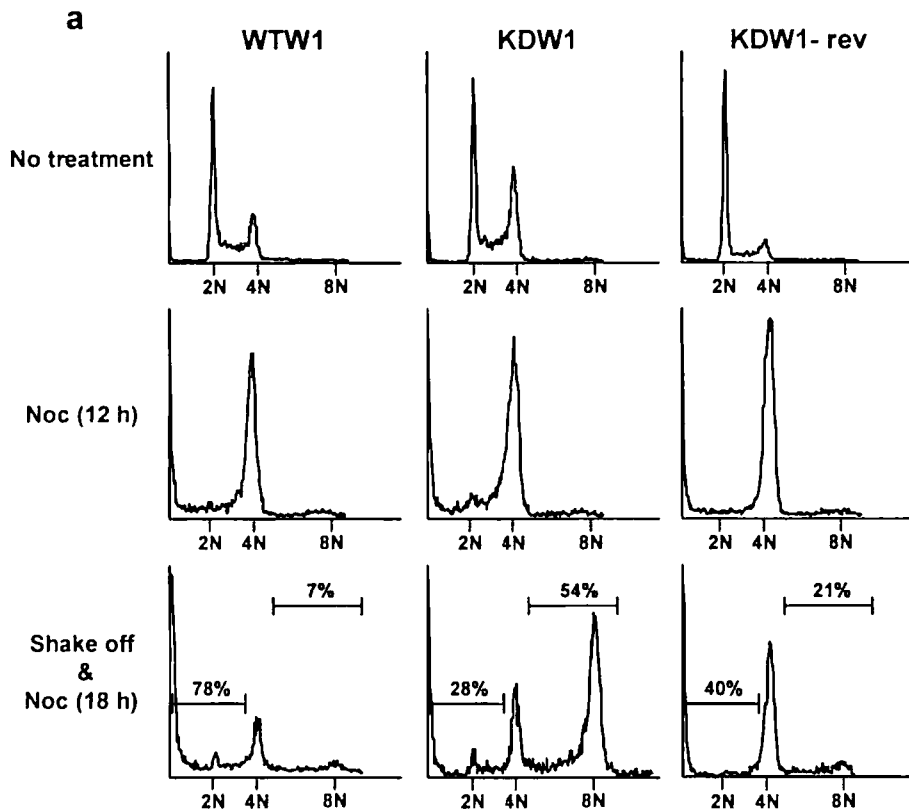


図 4a) 不活性型 WARTS 発現細胞における G1 期 4 倍体チェックポイントの破綻  
非同調培養の WTW1 細胞、KDW1 細胞および KDW1-rev 細胞 (上段) をノコダゾール処理 (50ng/ml、12hr) で分裂前中期に同調し (中段)、球状の分裂前中期細胞のみを 'shake off' して回収。回収した分裂前中期細胞を引き続きノコダゾール存在下で 18 時間培養。培養ディッシュに平坦に付着した間期細胞のみを回収しフローサイトメトリーで解析した (下段)。DNA 量が 4N 未満あるいは 4N を超えるものの比率をパーセント表示した。

それに対して、KDW1-rev 細胞は 4N のピークがそのまま保たれており、G1 期に停止していることが考えられた。一方で WTW1 細胞では 4N のピークが減少し、それに伴い sub-G1 に相当する 4N 未満の細胞の増加をみとめ、細胞死が誘導されていることが考えられた。このことから、スピンドルチェックポイントの遷延化に伴い 4N のまま G1 期に入った細胞に対してキナーゼ不活性型 WARTS の過剰発現は G1 期 4 倍体チェックポイントの破綻をきたすこと、それに対し野生型 WARTS の過剰発現は G1 期 4 倍体チェックポイントによる G1 期停止よりもむしろ細胞死を誘導することが示唆された。

#### 7-5. WARTS は G1 期 4 倍体チェックポイントにおける p53 タンパク誘導に関与する

以前より p53 が欠損した細胞においては G1 期 4 倍体チェックポイントが機能しないという現象が報告されており、p53 タンパクは G1 期 4 倍体チェックポイントにおいても重要な役割を果たしていると考えられている (Andreassen et al., 2001; Lanni & Jacks, 1998; Minn et al., 1996)。そこで KDW1 細胞において、分裂をスキップした 4 倍体の細胞が G1 期停止できない理由について検討するため、それらの細胞における p53 タンパクの発現を調べた。KDW1 細胞および KDW1-rev 細胞を図 4 a と同様にノコダゾール処理 (合計 26 時間) して、分裂できないままディッシュに付着した細胞を回収。その細胞抽出液を用いて p53 のウェスタンブロットをおこなったところ、KDW1 細胞は KDW1-rev 細胞に比べて p53 タンパクの発現量が著しく低いことがわかった (図 4 b)。WTW1 細胞については図 4 a に示すとおり細胞死の誘導が優位であったために、解析に適するサンプルが得られなかった。



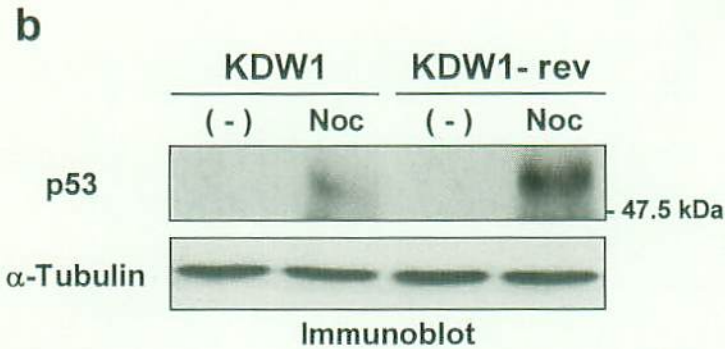


図 4b)不活性型 WARTS 発現細胞では p53 タンパクの誘導が減弱する  
 KDW1 細胞および KDW1-rev 細胞をノコダゾール処理 (50ng/ml、12hr) で分裂前中期に同調し、球状の分裂前中期細胞のみを 'shake off' して回収。回収した分裂前中期細胞を引き続きノコダゾール存在下で 14 時間培養。培養ディッシュに平坦に付着した間期細胞のみを回収、その細胞抽出液を SDS 化してウェスタンブロットをおこなった。上段は抗 p53 抗体、下段は抗 $\alpha$ -tubulin 抗体による。分子量マーカーを右側に示す。

この結果から、KDW1 細胞における G1 期 4 倍体チェックポイントの破綻は、分裂できずに G1 期に入ってしまった異常な細胞において十分な p53 タンパクの誘導ができないことによるものと考えられた。このようにキナーゼ不活性型 WARTS の過剰発現はスピンドルチェックポイントを活性化させるだけでなく、さらに G1 期 4 倍体チェックポイントも破綻させることによって多倍体形成の誘引となっていることが明らかとなった。以上の結果から、WARTS のキナーゼ活性は分裂期の適正な進行および G1 期 4 倍体チェックポイントにおいて重要な役割を果たしているものと考えられる。



## 8. 考察

本研究は初めて WARTS のキナーゼ活性を見出し、それが分裂期特異的に発揮され、スピンドル形成に関与することを報告するものであり、さらに WARTS が G1 期 4 倍体チェックポイントも制御することによって染色体安定性の維持に寄与していることを明らかにした。

### 8-1. WARTS のキナーゼ活性について

WARTS は保存されたセリン・トレオニンキナーゼドメインを有しているにもかかわらず、その活性についてはまだ報告がなかった。ひとつの理由として、内因性 WARTS の免疫沈降複合体による *in vitro* kinase assay では WARTS 以外のキナーゼの混入によるリン酸化反応の存在を否定できないことが挙げられる。本研究でも HeLa 細胞の間期と分裂期の細胞抽出液での内因性 WARTS のキナーゼ活性を検討して、分裂期において活性の有意な上昇が認められたが、上述した可能性が否定できないため、それが WARTS の真の活性だと断定できなかった (図 1 a)。そこでネガティブコントロールの必要性を感じ、WARTS のキナーゼ不活性型変異体を発現する細胞株を作製し、ネガティブコントロールとして比較検討することとなった。

今回は、比較検討に耐えうるキナーゼ不活性型 WARTS 発現細胞株が 1 クローンしか得られなかったため、この変異体 WARTS の過剰発現が本当に Rat1 細胞の内因性 WARTS の機能を特異的に阻害して KDW1 細胞の表現型に寄与しているのかという疑問が当然生じた。しかしながら、その細胞内局在をみると野生型 WARTS と一致しており、この変異体 WARTS が野生型 WARTS とは異なる何か予期せぬターゲットタンパクと会合することはないと考えられる。さら

に、この変異体 WARTS の発現を失った KDW1-rev 細胞が Parent Rat1 細胞とほぼ同じ表現型を呈することからも、変異体 WARTS が内因性 WARTS に対してドミナント・ネガティブ効果を発揮しているものと考え、実験に使用した。

結果として、キナーゼ不活性型 WARTS を免疫沈降した反応系では活性が見られず、WARTS が分裂期特異的に活性化することが確認された (図 1 d, e)。しかしながら、HeLa 細胞の場合 (図 1 a) と違い、ノコダゾール処理で分裂前中期に同調させたまま (図 1 e, Noc) の WTW1 細胞における WARTS の活性は、非同調培養 WTW1 細胞における活性 (図 1 e, Asyn) とあまり変わらない。この違いは、WARTS を免疫沈降するために HeLa 細胞では内因性 WARTS に対する抗体を使用しているのに対し、WTW1 細胞では Myc タグに対する抗体を使用しているためと思われる。つまり、内因性 WARTS に対する抗体での免疫沈降反応では WARTS 以外のキナーゼが混入しているか、または WARTS そのものを活性化させるようなタンパクが混入しているか、あるいは抗体のアクセスが WARTS の構造変化を起こしているなどの可能性が考えられる。

興味深いことに、WARTS はノコダゾール処理による分裂前中期同調からリリースして初めてそのキナーゼ活性のピークが見られた (図 1 d)。これは、WARTS のスピンドルへの局在と併せて考えると、ノコダゾール処理でスピンドルが破綻している間は WARTS は活性化できず、あるいは活性化する必要がなく、ノコダゾール処理からリリースされてスピンドルが形成され始めると WARTS が活性化するようになると思われる。さらに、分裂後期に向かって WARTS の活性が低下することから、WARTS のキナーゼ活性は分裂中期に至るまでの (キネトコア機能も含めた) スピンドルの形成に重要な役割を果たしていると考えられる。そして、それを裏付けるように WARTS の不活化によってスピンドルチ

ェックポイントの遷延化が引き起こされている（図3、後述）。

## 8-2. WARTS の不活化とスピンドルチェックポイント

スピンドルチェックポイントは元来、細胞が分裂を遂行するにあたって、スピンドルが正しく形成され、姉妹染色体が均等に分配されることを保障するシステムであるが、細胞によってはチェックポイントで停止できる時間が様々であり(Kung et al., 1990)、スピンドルチェックポイントが長期化すると染色体分離や細胞質分裂をおこなわずにチェックポイントを乗り越えて分裂期を脱出してしまう ‘mitotic slippage’ あるいは ‘adaptation’ といわれる現象が起こる(Di Leonardo et al., 1997; Rieder & Palazzo, 1992)。本研究においても、キナーゼ不活性型 WARTS 発現細胞 (KDW1 細胞) で分裂期に要する時間が有意に延長し、その中にしばしば分裂しないまま分裂期を脱出する細胞がみられ、結果として4倍体細胞となることが観察された。詳細な観察によってこの分裂期の延長は分裂中期までの進行が遅延している結果であることが分り、しかも Mad2 染色がこれらの細胞で陽性であったことから、スピンドルチェックポイントの活性化が遷延していることが判明した（図3）。この所見は上述したように、WARTS のキナーゼ活性がスピンドルの形成に重要な役割を果たしていることを支持するものである。しかしながら、今のところ WARTS キナーゼのリン酸化のターゲットとなる基質は不明であり、この基質を同定することが WARTS の機能を解明する上で最も重要な課題といえる。

## 8-3. WARTS の不活化と G1 期 4 倍体チェックポイント

以前より、ノコダゾールなど微小管重合阻害剤処理で活性化したスピンドル

チェックポイントを、分裂しないまま乗り越えた細胞は、p53 に依存した G1 期停止をきたすことが知られている(Lanni & Jacks, 1998; Minn et al., 1996)。一方、アクチンフィラメントの阻害剤で処理すると、スピンドルの形成や姉妹染色体の分離は正常であるにもかかわらず、細胞質分裂ができないために 4N のまま分裂期を脱出した細胞が、やはり p53 依存的な G1 期停止をきたした。このことから、活性化したスピンドルチェックポイントを乗り越えることよりもむしろ、染色体数が 4 倍体の状態にあることが G1 期停止の誘引であると示唆され、G1 期 4 倍体チェックポイント (G1 tetraploidy checkpoint) という概念が提唱された(Andreassen et al., 2001)。本研究では、KDW1 細胞において、ノコダゾール長時間処理によるスピンドルチェックポイントを乗り越えた細胞の多くが 8N の DNA 含有を示し、4N 細胞での G1 期停止が誘導されていないことが判明した (図 4 a)。このことからキナーゼ不活性型 WARTS の過剰発現は G1 期 4 倍体チェックポイントを破綻させていることが示唆された。実際、これらの細胞における p53 タンパクの発現が対照群と比べて著しく低いことから、G1 期 4 倍体チェックポイントの破綻の原因として p53 タンパクの誘導不全が考えられた。言い換えれば、WARTS のキナーゼ活性は G1 期 4 倍体チェックポイントにおける p53 タンパクの発現誘導に重要な役割を果たしていると考えられる。もちろん、WARTS のキナーゼ活性がどのように p53 の発現誘導に貢献しているのかは、今後検討すべき課題の一つである。

#### 8-4. WARTS の過剰発現と細胞死について

ヒト癌細胞において WARTS を過剰発現させると、G2 期停止や、BAX タンパクの上昇、アポトーシスの誘導が見られるという報告がある(Xia et al., 2002;

Yang et al., 2001)。これに対して、本研究では Rat1 線維芽細胞にヒト野生型 WARTS を過剰発現させても、通常培養のもとでは細胞周期の停止、アポトーシスのいずれも起きなかった。一見、矛盾しているように見えるこれらの現象は、ベースとなる環境が癌細胞であるか非癌細胞であるかという違いに起因すると思われる。図 4a に示したように、ノコダゾール処理によってスピンドル・ダメージが存在する場合には、野生型 WARTS の過剰発現は Rat1 細胞 (WTW1 細胞) を細胞死へ導くが、KDW1-rev 細胞は細胞死が誘導されなかった。この両者のノコダゾールに対する感受性の違いは野生型 WARTS タンパクの発現レベルの違いによるものと考えられる。これらの所見から、スピンドル・ダメージや DNA ダメージなどの細胞毒性ストレスや発癌のシグナルが存在する場合に限って、WARTS の過剰発現が細胞死を優位に導くことが示唆される。そうであれば、WARTS キナーゼの活性化あるいは過剰発現を利用して、癌細胞や種々のストレスによりダメージを受けた不安定な細胞を特異的にターゲットとする治療に応用できる可能性がある。

#### 8-5. WARTS キナーゼの特異性

他の分裂期キナーゼ (Polo-like kinase 1, Aurora-A, Aurora-B) の過剰発現によっても分裂期の制御が不安定になり、細胞分裂の失敗から多核細胞や中心体数の増加した細胞の出現を見るが、この表現型は p53 タンパクの欠如した細胞において著しく増悪するとの報告がある (Meraldi et al., 2002)。つまり、これらの分裂期キナーゼ単独の異常が起きても、p53 の機能が保たれていれば、G1 期 4 倍体チェックポイントによって多倍体細胞の分裂・増殖を抑えることができ、異数体の出現も回避できると考えられる。それに対して、WARTS は分裂期の進

行だけでなく、p53 タンパクの発現誘導に関与することで G1 期 4 倍体チェックポイントをも制御するという特異な性質を持った分裂期キナーゼであるといえる。このため WARTS キナーゼ単独の不活化で、分裂期の異常に加え G1 期 4 倍体チェックポイントの破綻をきたし、異常細胞の生存を許してしまうことによって、染色体の不安定性、ひいては癌の発生が導かれる可能性がある。



## 9. 結語

本研究において、WARTS キナーゼが分裂期特異的に活性化することが明らかとなり、WARTS のキナーゼ活性がスピンドルの形成において重要な役割を果たすことが示唆された。さらに WARTS は G1 期 4 倍体チェックポイントの制御にも関与していることが示され、WARTS の不活化は分裂期の異常に加え G1 期 4 倍体チェックポイントの破綻をきたし、多倍体細胞の増殖を許してしまうことがわかった。以上のことより、WARTS は分裂期制御と G1 期 4 倍体チェックポイントの制御によって染色体安定性の維持に働いていると考えられた。

興味深いことにスピンドル・ダメージの存在下では野生型 WARTS の過剰発現が細胞死を誘導する現象がみられており、今後 WARTS の活性化機序およびリン酸化ターゲットを含む下流カスケードを解明し、WARTS の機能を明らかにすることで、WARTS の活性化経路をターゲットとする癌治療への応用も期待される。

## 10. 参考文献

- Amon, A. (1999). *Curr Opin Genet Dev*, 9, 69-75.
- Andreassen, P.R., Lohez, O.D., Lacroix, F.B. & Margolis, R.L. (2001). *Mol Biol Cell*, 12, 1315-28.
- Bharadwaj, R. & Yu, H. (2004). *Oncogene*, 23, 2016-27.
- Cahill, D.P., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G.J., Willson, J.K., Markowitz, S.D., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1998). *Nature*, 392, 300-3.
- Chen, R.H., Waters, J.C., Salmon, E.D. & Murray, A.W. (1996). *Science*, 274, 242-6.
- Cohen-Fix, O., Peters, J.M., Kirschner, M.W. & Koshland, D. (1996). *Genes Dev*, 10, 3081-93.
- Di Leonardo, A., Khan, S.H., Linke, S.P., Greco, V., Seidita, G. & Wahl, G.M. (1997). *Cancer Res*, 57, 1013-9.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. & Hunter, T. (1988). *Science*, 241, 42-52.
- Hartwell, L. (1992). *Cell*, 71, 543-6.
- Hartwell, L.H. & Weinert, T.A. (1989). *Science*, 246, 629-34.
- Hirota, T., Morisaki, T., Nishiyama, Y., Marumoto, T., Tada, K., Hara, T., Masuko, N., Inagaki, M., Hatakeyama, K. & Saya, H. (2000). *J Cell Biol*, 149, 1073-86.
- Hisaoka, M., Tanaka, A. & Hashimoto, H. (2002). *Lab Invest*, 82, 1427-35.
- Hoyt, M.A., Totis, L. & Roberts, B.T. (1991). *Cell*, 66, 507-17.
- Hwang, L.H., Lau, L.F., Smith, D.L., Mistrot, C.A., Hardwick, K.G., Hwang, E.S., Amon, A. & Murray, A.W. (1998). *Science*, 279, 1041-4.
- Justice, R.W., Zilian, O., Woods, D.F., Noll, M. & Bryant, P.J. (1995). *Genes Dev*, 9, 534-46.
- King, R.W., Peters, J.M., Tugendreich, S., Rolfe, M., Hieter, P. & Kirschner, M.W. (1995). *Cell*, 81, 279-88.

- Kung, A.L., Sherwood, S.W. & Schimke, R.T. (1990). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 9553-7.
- Lanni, J.S. & Jacks, T. (1998). *Mol Cell Biol*, 18, 1055-64.
- Li, R. & Murray, A.W. (1991). *Cell*, 66, 519-31.
- Li, Y. & Benezra, R. (1996). *Science*, 274, 246-8.
- Margolis, R.L., Lohez, O.D. & Andreassen, P.R. (2003). *J Cell Biochem*, 88, 673-83.
- Marumoto, T., Hirota, T., Morisaki, T., Kunitoku, N., Zhang, D., Ichikawa, Y., Sasayama, T., Kuninaka, S., Mimori, T., Tamaki, N., Kimura, M., Okano, Y. & Saya, H. (2002). *Genes Cells*, 7, 1173-82.
- Marumoto, T., Honda, S., Hara, T., Nitta, M., Hirota, T., Kohmura, E. & Saya, H. (2003). *J Biol Chem*, 278, 51786-95.
- Meraldi, P., Honda, R. & Nigg, E.A. (2002). *Embo J*, 21, 483-92.
- Minn, A.J., Boise, L.H. & Thompson, C.B. (1996). *Genes Dev*, 10, 2621-31.
- Morisaki, T., Hirota, T., Iida, S., Marumoto, T., Hara, T., Nishiyama, Y., Kawasaki, M., Hiraoka, T., Mimori, T., Araki, N., Izawa, I., Inagaki, M. & Saya, H. (2002). *FEBS Lett*, 529, 319-24.
- Nicklas, R.B. (1997). *Science*, 275, 632-7.
- Nishiyama, Y., Hirota, T., Morisaki, T., Hara, T., Marumoto, T., Iida, S., Makino, K., Yamamoto, H., Hiraoka, T., Kitamura, N. & Saya, H. (1999). *FEBS Lett*, 459, 159-65.
- Rieder, C.L. & Palazzo, R.E. (1992). *J Cell Sci*, 102 ( Pt 3), 387-92.
- Shackney, S.E., Smith, C.A., Miller, B.W., Burholt, D.R., Murtha, K., Giles, H.R., Ketterer, D.M. & Pollice, A.A. (1989). *Cancer Res*, 49, 3344-54.
- Shah, J.V. & Cleveland, D.W. (2000). *Cell*, 103, 997-1000.
- St John, M.A., Tao, W., Fei, X., Fukumoto, R., Carcangiu, M.L., Brownstein, D.G., Parlow, A.F., McGrath, J. & Xu, T. (1999). *Nat Genet*, 21, 182-6.
- Stemann, O., Zou, H., Gerber, S.A., Gygi, S.P. & Kirschner, M.W. (2001). *Cell*, 107, 715-26.

- Tao, W., Zhang, S., Turenchalk, G.S., Stewart, R.A., St John, M.A., Chen, W. & Xu, T. (1999). *Nat Genet*, 21, 177-81.
- Toyn, J.H. & Johnston, L.H. (1994). *Embo J*, 13, 1103-13.
- Tugendreich, S., Tomkiel, J., Earnshaw, W. & Hieter, P. (1995). *Cell*, 81, 261-8.
- Visintin, R., Prinz, S. & Amon, A. (1997). *Science*, 278, 460-3.
- Waizenegger, I.C., Hauf, S., Meinke, A. & Peters, J.M. (2000). *Cell*, 103, 399-410.
- Xia, H., Qi, H., Li, Y., Pei, J., Barton, J., Blackstad, M., Xu, T. & Tao, W. (2002). *Oncogene*, 21, 1233-41.
- Yang, X., Li, D.M., Chen, W. & Xu, T. (2001). *Oncogene*, 20, 6516-23.
- Yasui, Y., Amano, M., Nagata, K., Inagaki, N., Nakamura, H., Saya, H., Kaibuchi, K. & Inagaki, M. (1998). *J Cell Biol*, 143, 1249-58.