

学位論文
Doctor' s Thesis

m-calpain の活性化は細胞分裂期における染色体整列に必要である
(Activation of m-calpain is required for chromosome alignment on the
metaphase plate during mitosis)

本田 志延
Shinobu Honda

熊本大学大学院医学研究科博士課程病理系専攻腫瘍医学

指導：佐谷 秀行 教授

小川 道雄 前教授

2005 年度

目次

1. 要旨	3
2. 発表論文リスト	7
3. 謝辞	9
4. 略語一覧	10
5. 研究の背景と目的	
5-1 分裂期における染色体の動き	11
5-2 細胞周期とカルシウムシグナリング	12
5-3 分裂期におけるカルパイン活性化の可能性	12
5-4 本研究の目的	12
6. 実験方法	
6-1 細胞培養・細胞周期同調	14
6-2 フローサイトメトリー・mitotic index	14
6-3 免疫染色・核異型	14
6-4 ウェスタンブロット	15
6-5 RNA interference	15
6-6 protease inhibitors	15
6-7 time-lapse fluorescence and differential interference contrast (DIC) video microscopy	16
6-9 in vitro proteolysis assay	17

7. 実験結果

7-1	m-calpain の蛋白量は細胞周期依存性に制御されており、G2-M 期に増加する	18
7-2	RNAi による m-calpain の抑制は、染色体不全整列を伴う分裂期異常を来たす	18
7-3	カルパイン阻害剤は、正常の双極性紡錘糸があるにもかかわらず、染色体不全整列をともなう分裂期遅延をもたらす	20
7-4	カルパイン阻害剤は Mad2 依存性の spindle assembly checkpoint を惹起する	21
7-5	カルパイン阻害剤は双極性紡錘体の形成には何ら影響しない	23
7-6	単極性紡錘体における染色体は、カルパイン活性の阻害により紡錘極に接近する	25
7-7	Kid は in vitro における m-calpain の特異的基質である	25
7-8	カルパイン活性は分裂期赤道面への染色体整列の維持に必要である	26
8.	考察	28
9.	結語	31
10.	参考文献	32

1. 要旨

細胞周期の中でも、分裂期は複製期に造られた母細胞 DNA のコピーを娘細胞へと正確に分配するという、いわば総仕上げともいえる段階である。この時期にはさまざまな生化学的反応が複雑に関与し合い、それらの見事な調和の中で細胞内現象の遂行がなされている。それらの各生化学反応系のわずかな狂いも、ひいては細胞の癌化や細胞死などの重大な異常を招くこととなる。

カルシウム依存性の細胞内システインプロテアーゼであるカルパインスーパーファミリーのなかでも、2つのアイソフォーム、すなわち、 μ -および m -calpain は汎組織性に発現しており、conventional calpains として知られている。分裂期において、一過性の細胞質カルシウム濃度の上昇により、カルパインが活性化されることは以前から示唆されていたが、カルパインの活性化が分裂期のどのような事象の遂行に寄与しているかは、長く未解明であった。我々は、RNA 干渉法 (RNAi) を用いて、分裂期におけるカルパインの役割を観察した結果、 m -calpain の発現レベルを抑制された細胞は分裂前中期 (prometaphase) で停止し、染色体整列の不全が見られ、 μ -calpain の RNAi ではそのような現象は見られないということがわかった。ペプチド系特異的カルパイン阻害剤でも、染色体不全整列を伴う分裂期異常が引き起こされたが、 m -calpain に対する RNAi とカルパイン阻害剤のどちらも、中心体の分離および双極性紡錘糸の形成には影響しなかった。整列できていない染色体のキネトコアには Mad2 染色が陽性であったことから、カルパイン阻害による prometaphase 停止は紡錘糸形成チェックポイント (spindle assembly checkpoint) の惹起によるものであるといえる。さらに、単極化した細胞においてカルパイン活性を抑制すると、染色体は紡錘極寄りに集合することから、カルパイン活性が metaphase での染色体整列に必要な polar ejection force に関与していることが示唆された。加えて、我々は、polar ejection force 創成の中心的役割を担っているモータータンパク質の一つであるクロモカインキネシン Kid が、in vitro における m -calpain の特異的基質であることを発見した。これらの結果に基づき、我々は、分裂期においてカルシウム濃度の上昇によって引き起こされた m -calpain の活性化は、polar ejection force を創成する分子を制御することにより、染色体

整列を遂行し分裂期を正しく進行させるために必要であると考えた。

Abstract

Mitosis is the final step of cell cycle, which divides the duplicated DNA into two daughter cells accurately. In this phase, various biochemical reactions are linked each other, resulting in the completion of faithful division of genetic materials as well as cytoplasmic components. Failures in these signal transductions lead to abnormal cell division which can be a cause of cell-death and transformation.

Calpains are Ca^{2+} -dependent intracellular cysteine proteases and form a superfamily having various isoforms. Two isoforms, μ - and m-calpains, are ubiquitously expressed and known as conventional calpains. Although it has been previously shown that calpains are activated during mitosis by transient increases in cytosolic Ca^{2+} concentration, it is still unknown whether the activation of calpains contributes to particular events in mitosis or not. We investigated the roles of calpains in mitotic progression with the use of RNA interference (RNAi), and revealed that cells reduced the levels of m-calpain, but not μ -calpain, arrested at prometaphase and failed to align their chromosomes at the spindle equator. Although specific peptidyl calpain inhibitors also induced aberrant mitosis with chromosome misalignment, both m-calpain RNAi and calpain inhibitors affected neither the separation of centrosomes nor the assembly of bipolar spindles. Mad2 was detected on the kinetochores of the misaligned chromosomes, indicating that the prometaphase arrest induced by calpain inhibition is due to activation of the spindle assembly checkpoint. Furthermore, when calpain activity was inhibited in cells having monopolar spindles, chromosomes were clustered adjacent to the centrosome, suggesting that calpain activity is involved in a polar ejection force for metaphase alignment of chromosomes. In addition, we found that chromokinesin Kid, which plays a leading role in generating polar ejection force, is a specific substrate of m-calpain in vitro. Based on these findings, we propose that activation of m-calpain during mitosis is required for cells to establish the chromosome

alignment by regulating some molecules, which generate polar ejection force.

2. 発表論文リスト

- (1) Shinobu Honda, Tomotoshi Marumoto, Toru Hirota, Masayuki Nitta, Yoshimi Arima, Michio Ogawa, and Hideyuki Saya
Activation of m-Calpain Is Required for Chromosome Alignment on the Metaphase Plate during Mitosis
J. Biol. Chem. 279: 10615-10623, 2004.

- (2). Tomotoshi Marumoto, Shinobu Honda, Toshihiro Hara, Masayuki Nitta, Toru Hirota, Eiji Kohmura Kohmura, and Hideyuki Saya
Aurora-A Kinase Maintains the Fidelity of Early and Late Mitotic Events in HeLa Cells
J. Biol. Chem. 278: 51786-51795, 2003.

- (3). Hiroaki Kuwahara, Norie Araki, Keishi Makino, Norio Masuko, Shinobu Honda, Kozo Kaibuchi, Kohji Fukagawa, Eishichi Miyamoto, Michio Ogawa, and Hideyuki Saya
A novel NE-dlg/SAP102-associated protein, p51-nedasin, related to the amidohydrolase superfamily, interferes with the association between NE-dlg/SAP102 and N-methyl-D-aspartate receptor
J. Biol. Chem. 274: 32204-32214, 1999

- (4). Shin-ichi Iida, Toru Hirota, Tetsuro Morisaki, Tomotoshi Marumoto, Toshihiro Hara, Shinji Kuninaka, Shinobu Honda, Ken-ichiro Kosai, Michio Kawasuji, David C Pallas and Hideyuki Saya
Tumor suppressor WARTS ensures genomic integrity by regulating both mitotic progression and G₁ tetraploidy checkpoint function

Oncogene. 2004 Jul 8;23(31):5266-74.

- (5). Masayuki Nitta, Osamu Kobayashi, Shinobu Honda, Toru Hirota, Shinji Kuninaka, Tomotoshi Marumoto, Yuktaka Ushio, and Hideyuki Saya
Spindle checkpoint function is required for mitotic catastrophe induced by
DNA-damaging agents

Oncogene. 2004 Aug 26;23(39):6548-58

3. 謝辞

本研究を行うにあたり御指導、御支援下さいました熊本大学大学院医学薬学研究部腫瘍医学分野 佐谷 秀行 教授ならびに研究室の皆様に深く感謝致します。とくに直接御指導頂きました 桑原 博昭 先生に心より感謝致します。

4. 略語一覧

Ab: antibody

DIC: differential interference contrast

DTB: double thymidine block

DTT: dithiothreitol

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

EGTA: ethylene glycol bis (beta-aminoethylether)-N.N.N9.N9-tetraacetic acid

FACS: fluorescence activated cell sorter

GST: glutathione s-transferase

PAGE: polyacrylamide electrophoresis

PBS: phosphate buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

PI: propidium iodide

SDS: sodium dodecyl sulfate

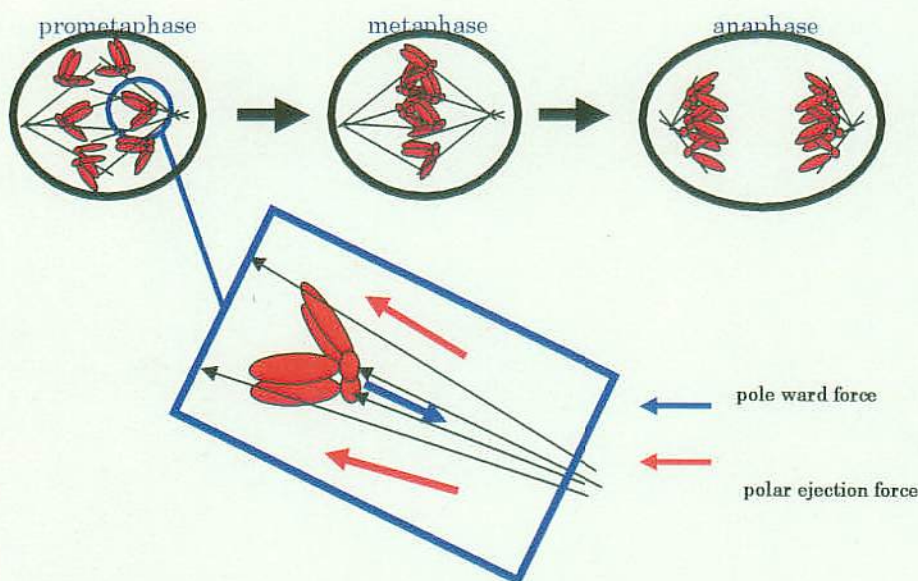
Tris: tris (hydroxymethyl) aminomethane

5. 研究の背景と目的

5-1 分裂期における染色体の動き

紡錘体赤道面への染色体整列あるいは会合は、分裂期の中でも大変際立った現象であり、細胞周期の中で **metaphase** を定義づけるものである。この染色体の紡錘体赤道面への動きは、植物、昆虫、そして哺乳類と種は異なっても、複製された DNA の正確な分離のために必要である(1)。Metaphase での安定した染色体の位置取りとそれに先駆けた prometaphase での染色体の動きは、極方向と反極方向への動きの均衡・不均衡の結果である。どちらか一方の極付近に位置するいくつかの染色体にとっては、紡錘体赤道面へと移動して metaphase の整列を完成するために、それらを極から離れるように押す力である **polar ejection force** が必要である(図1)。この一連の現象に関して、最近になり、染色体整列において重要な役割を果たすモータータンパク質、つまりクロモカイネシンである Kid (kinesin like DNA binding protein) が、**polar ejection force** を創出する中心的な役割を担う分子として単離された(2-7)。しかしながら、染色体の整列を完成させ、**anaphase** に先駆けて整列を維持するための **polar ejection force** の制御にかかわるメカニズムについて、多くは未知のままである。

図1



5-2 細胞周期とカルシウムシグナリング

細胞周期の進行は、リン酸化・脱リン酸化酵素反応系、蛋白分解系、セカンドメッセンジャーによるシグナル伝達系やその他の複雑な機序により制御されている。これらのメカニズムは、細胞周期のさまざまなイベントを遂行するために相互作用的に機能している。最近、細胞内シグナリングのセカンドメッセンジャーであるカルシウムの細胞内濃度の変化が、細胞周期進行の重要な役割を担っていることがよく解ってきている。特に、カルシウム振動が、G1-S 境界と G2-M 移行付近でおこっており、これらの時にカルシウムシグナリングの下流分子は活性化されていると考えられる(8, 9)。しかしながら、カルシウムシグナリングを介した細胞周期進行に関与する標的分子などの詳細は不明である。

5-3 分裂期におけるカルパイン活性化の可能性

カルパイン(calpain)類は、カルシウム依存性の細胞内システインプロテアーゼ・スーパーファミリーで、そのメンバーは、汎組織性あるいは組織特異的に発現している。また、無脊椎動物から哺乳類までたくさんのアイソフォームが知られており、酵母や細菌類にさえホモログが見つかっている。それらの中で、哺乳類の μ -および m -calpain (いわゆる conventional calpains) が最も詳しく解析されており、細胞運動(10, 11)・アポトーシス(12)・細胞増殖(13, 14)・細胞周期進行(8, 9, 15, 16)といったさまざまな生理的な役割を持つことが示されてきている(8, 9)。いくつかの証拠から、calpain が分裂期進行に決定的に関与していることが示唆される。第一に、focal adhesion 蛋白である paxillin が、focal adhesion が離れる時期である分裂期に、活性化した m -calpain に特異的に切断を受ける(17)。第二に、calpain とその細胞内阻害蛋白であるカルパスタチン(calpastatin)は分裂期に局在を変える(18)。第三に、減数分裂の prophase で停止した starfish 卵子核に calpain を打ち込むと、減数分裂を再開する(8)。これらの報告は、calpain の活性化がその特異的基質の分解を介して、分裂期進行に寄与していることを我々に推測させるものである。しかしながら、calpain 類が分裂期の具体的にどのような現象に関与しているのかということに関しては、ほとんどわかっていない。

5-4 本研究の目的

我々は calpain の分裂期における具体的な役割を明らかにすることを主な目的と

して本研究を行った。conventional calpains の、それぞれの役割の違いを明らかにした研究報告はほとんどなく、我々はそれぞれの calpain アイソフォームに特異的な siRNA を用いることによって、両者の間の役割の違いを検討した。それと並行に、特異的ペプチド型 calpain 阻害剤を用い、主に分裂期を標的として即時的に calpain 活性を阻害して実験をおこない、calpain が分裂期にどのような役割を持つかの検討を行った。これらの実験から、分裂期において m-calpain が染色体整列に重要な役割を持つことがわかり、さらにそのなかでどのように染色体の動きに関与しているかを、中心体分離を阻害して単極化した細胞を用いて検討した。

6. 実験方法

6-1 細胞培養と同調

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, BIOWITTAKER 社) を加えたもので、37°C の 5%CO₂ 培養器にて継代培養した。細胞周期の同調は、目的に応じて、double thymidine block 法 (2mM thymidine 存在下で 22 時間の培養後、正常メディウムにて 8 時間培養、その後さらに 2mM thymidine 存在下で 16 時間培養)、thymidine/nocodazole 法 (2mM thymidine 存在下で 22 時間の培養後、正常メディウムにて 6-7 時間培養、その後 100ng/ml nocodazole 存在下で 8-12 時間培養)、または thymidine/butyrolactone 1 法 (2mM thymidine 存在下で 22 時間の培養後、50μM butyrolactone 1 存在下で 8 時間培養) を用いておこなった。分裂期の細胞は、上記の thymidine/nocodazole 法を用いて、mechanical shake-off にて回収した。回収された細胞は、PBS にて洗浄後、それぞれの薬剤を含むメディウム中にリリースされ、それぞれの時間でサンプルとして回収された。

6-2 RNA 干渉法

ヒト m-および μ-calpain 大サブユニット mRNA を特異的に標的とする small interfering RNA (siRNA) の配列はそれぞれ、5'-CCAGGACUACGAGGCGCUGdTdT-3' および 5'-GCUAGUGUUCGUGCACUCUdTdT-3' である。ヒト Mad2 mRNA を特異的に標的とする siRNA の配列は、5'-ACCUUUACUCGAGUGCAGAdTdT-3' である。コントロールとして、luciferase mRNA を標的とする siRNA (GL-2: 5'-CGUACGCGGAAUACUUCGAdTdT-3') を用いた。21 核酸対の RNA-DNA キメラは Japan Bioservice (Asaka, Japan) より購入した。siRNA の 2 本鎖のアニーリングと Oligofectamine (Invitrogen) を用いたトランスフェクションは、いずれも文献に従った。

6-3 flow cytometry と mitotic index

細胞周期の解析と DNA 含有量の評価のために、細胞を -20°C の 70% エタノールで数時間固定した (20)。固定した細胞は、2000rpm で遠沈後、0.1 mg/ml RNase A (Sigma) 含有の PBS 中に再浮遊させた。37°C で 15 分間整置し、propidium iodine を最終濃度

25µg/ml となるように添加した。サンプルは、FACSscanibur flow cytometer と CellQuest software (いずれも Becton Dickinson)を用いて解析した。

Mitotic index は、全細胞中における分裂期細胞数をパーセンテージで表した。分裂期の凝集した染色体は、文献に従い、アセトオルセイン(Merck)-60%酢酸液による染色で可視化し、顕微鏡的観察により解析した(21)。

6-4 抗体

本研究に用いた抗体は下記の如くである：抗 m-calpain ドメイン III ウサギ・ポリクローナル抗体 (Sigma)；抗 µ-calpain ドメイン III マウス・モノクローナル抗体 (RBI)；抗 Cyclin B マウス・モノクローナル抗体 (Transduction Lab.)；抗 m-calpain アミノ末端ペプチド ヤギ・ポリクローナル抗体；抗 securin ヤギ・ポリクローナル抗体；抗 p53 マウス・モノクローナル抗体 (DO-1) (以上 Santa Cruz)；抗 α-tubulin ラット・モノクローナル抗体 (Harlan Sera Lab.)；抗ヒト Mad2 ウサギ抗血清 (GST-hsMad2 リコンビナント融合タンパクを rabbit に注射免疫して作製した。)

6-5 阻害剤

本研究で使用した膜透過性カルパイン阻害剤は、Calbobenzoxy-Leucyl-Leucyl aldehyde (Z-LLal: ペプチド研究所、大阪)、プロテアソーム阻害剤は Carbobenzoxy-Leucyl-Leucyl-Leucinal (MG132: Calbiochem)、Eg5 阻害剤は 4-(3-Hydroxyphenyl)-6-methyl-2-thioxo-1, 2, 3, 4-tetrahydro-4H-pyrimidin-5-carboxylic acid ethyl ester (monastrol: Calbiochem)である。これらの薬剤は、dimethyl sulfoxide (DMSO)にて、10mM: Z-LLal、10mM: MG132、100mM: monastrol の濃度に調整し、-20°Cに保存した。

6-6 Immunoblotting

cyclin B、securin、および p53 のタンパク発現レベルを知るために、Hela 細胞を直接 Laemmli buffer に溶解し、音波破碎した。SiRNA の効果判定には、細胞を氷温の TBS-EDTA で注意深く洗い、lysis buffer を加えスクレイパーにて回収し、氷温にて1時間かけて融解し、4°Cで 14000rpm15 分間遠心分離した。その後、上清を回収し、Laemmli

buffer を加え、BCA 法にて定量後、最終タンパク濃度が 2mg/ml となるように調整した。等量のサンプルを SDS-PAGE で展開し、ニトロセルロースメンブレン (Amersham Pharmacia Biotech) に転写した。転写後のメンブレンを 5% の脱脂ミルク・PBS を用い室温で 30-60 分間ブロッキングし、室温にて 0.03% Tween-20/PBS 中で一次抗体と反応させた。抗原抗体反応により結合しなかった一次抗体は、0.3% Tween-20/PBS で 5 分間を 4 回の洗浄で除去し、結合した一次抗体は HRP-結合型の Ig (Amersham Pharmacia Biotech) を用いて検出した。メンブレンは 0.3% Tween-20/PBS で 5 分間を 4 回の洗浄後、chemiluminescence にて検出した。

6-7 免疫蛍光顕微鏡、核異型の判定、および染色体または細胞質領域の算定方

Lab-Tek II chamber slide (Nalge Nunc international) 上で 70% 程の confluency で培養した HeLa 細胞を、PHEM にてリンスし、そこで 37°C の 4% パラホルムアルデヒド・PHEM によるリンスで半固定し、37°C の 0.5% Triton-X100-PHEM で 5 分間の permeabilize をおこない、最終的に 4% パラホルムアルデヒド・PHEM で 15 分間固定した。洗浄後、1% BSA・0.03% tween-20-PBS でブロッキングし、一次抗体と反応させた。一次抗体を洗い流した後、一次抗体の種に合わせた 200 倍希釈の FITC 付 IgG (Biosource)、1000 倍希釈の TOTO-3 iodide (Molecular Probes) および 100 倍希釈の RNase cocktail (Ambion) と反応させた。

6-8 タイムラプス蛍光・DIC ビデオ顕微鏡

m-calpain に対する RNAi の効果を調べるために、GFP タグ付きのヒストン H2B 蛋白安定発現株 HeLa 細胞 (HeLa/H2B-GFP) を \angle T dish (Bioprotechs. Inc) 上で培養し、2mM の thymidine の添加と同時に m-calpain を標的とした siRNA をトランスフェクションした。これらはトランスフェクションから 22 時間後に通常のメEDIUM にリリースされ、タイムラプス蛍光・DIC ビデオ顕微鏡で分析された。

Z-LLal の分裂期進行に対する影響を調べるために、 \angle T dish 上の HeLa/H2B-GFP を thymidine/butyrolactone 1 法で培養し、その後 Z-LLal 50 μ M を含むメEDIUM 中にリリースし、タイムラプス蛍光・DIC ビデオ顕微鏡で分析した。

染色体の分裂期赤道面上への整列維持に対する Z-LLal の影響を調べるために、HeLa/H2B-GFP 細胞を MG-132 存在下で 3.5 時間培養後、タイムラプス蛍光・DIC ビデオ顕微鏡による記録を開始し、さらに記録開始から 1.5 時間後に、MG132 と Z-LLal 両方を含むメEDIUM中での培養を開始し記録を続けた。

画像の記録・解析は Metamorph (Universal Imaging Corp.) で行った。

6-9 in vitro proteolysis assay

分裂期モーター蛋白 Kid が m-calpain の特異的基質であるかどうかを調べるために、精製ブタ m-calpain (CALBIOCHEM) と、その基質として GST-Kid 融合リコンビナントタンパクを用い、この実験を行った。40 μ l の proteolysis buffer (CaCl₂ 4mM, DTT 5mM) 中で、GST 融合タンパクと m-calpain を 30°C で反応させ、40 μ M の 4XSDS buffer を添加して反応を停止させ、さらに 85°C で 5 分間ボイルした。これらサンプルは SDS-PAGE で展開し、CBB 染色を行った。

7. 結果

7-1 m-calpain の蛋白量は細胞周期依存性に制御されており、G2-M 期に増加する

conventional calpains の分裂期進行への関与を観察するため、まず我々は、細胞周期中の conventional calpains の蛋白レベルの変動を評価した。HeLa 細胞を double thymidine block 法にて S 期初期に同調した。リリースしてからさまざまな経過時間で細胞を回収し、immunoblot で分析した (図 2)。m-calpain の全長および自己切断型ともに、サイクリン B と同様に、G2-M 期に増加した。対照的に、 μ -calpain は全長・自己切断型ともに細胞周期を通じて、劇的な変化は見られなかった。これらの結果から、 μ -calpain ではなく、m-calpain が G2-M 期のイベントに関与している可能性が浮上した。

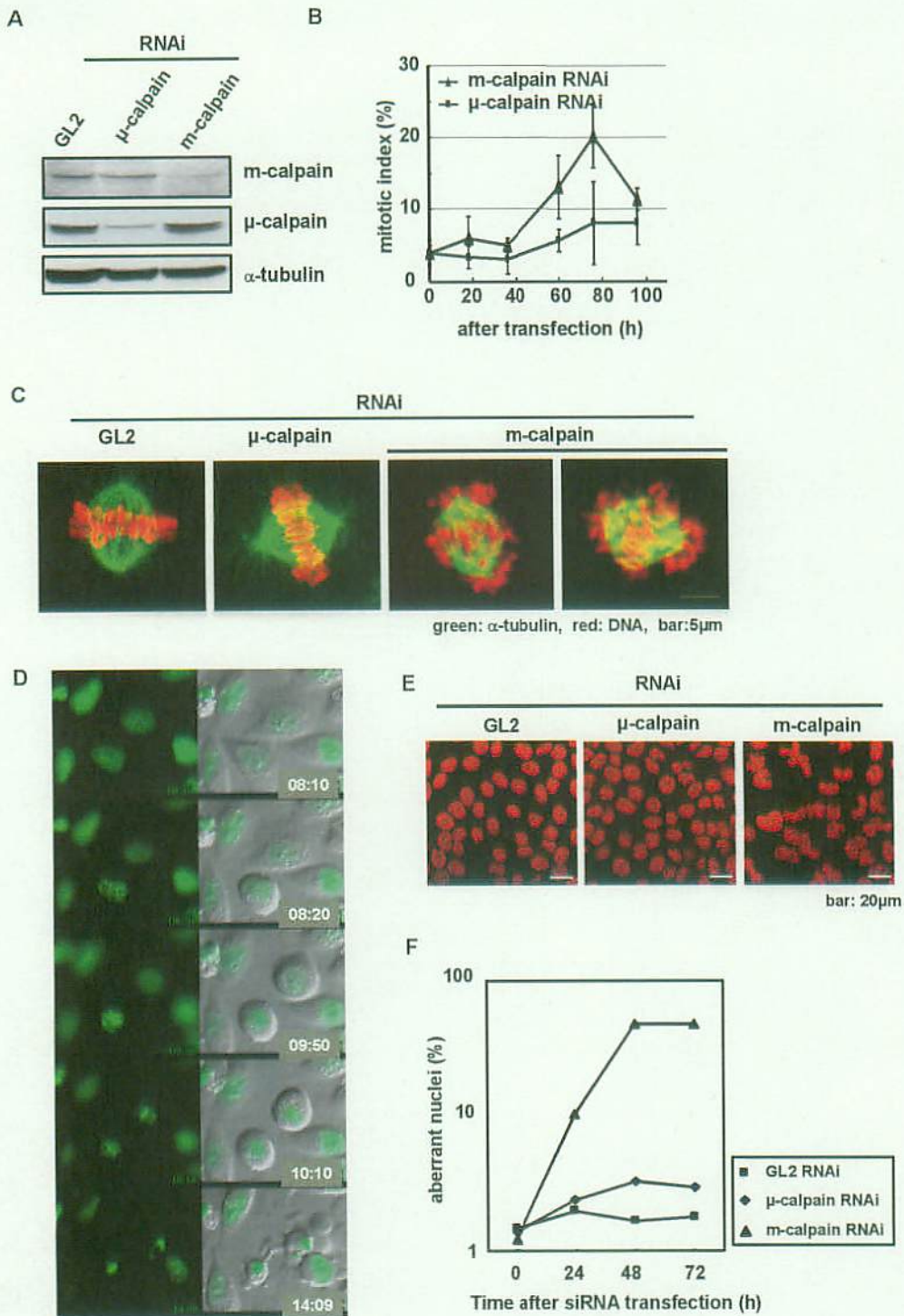
図 2



7-2 RNAi による m-calpain の抑制は、染色体不全整列を伴う分裂期異常を来たす

細胞周期進行における conventional calpains の役割を評価するために、我々は μ -calpain および m-calpain の mRNA を標的とする siRNA を用いた。これらの siRNA のトランスフェクションにより、 μ および m-calpain の蛋白レベルは効果的に抑制された (図 3A)。m-calpain 発現量の抑制により、mitotic index の有意な上昇が認められ (図 3B)、正常に双極性紡錘糸を形成しているにもかかわらず、染色体不全整列を伴う異常な分裂期が引き起こされた (図 3C)。しかしながら、 μ -calpain の抑制は、mitotic index (図 3B) と染色体整列 (図 3C) のどちらにも影響しなかった。

図 3



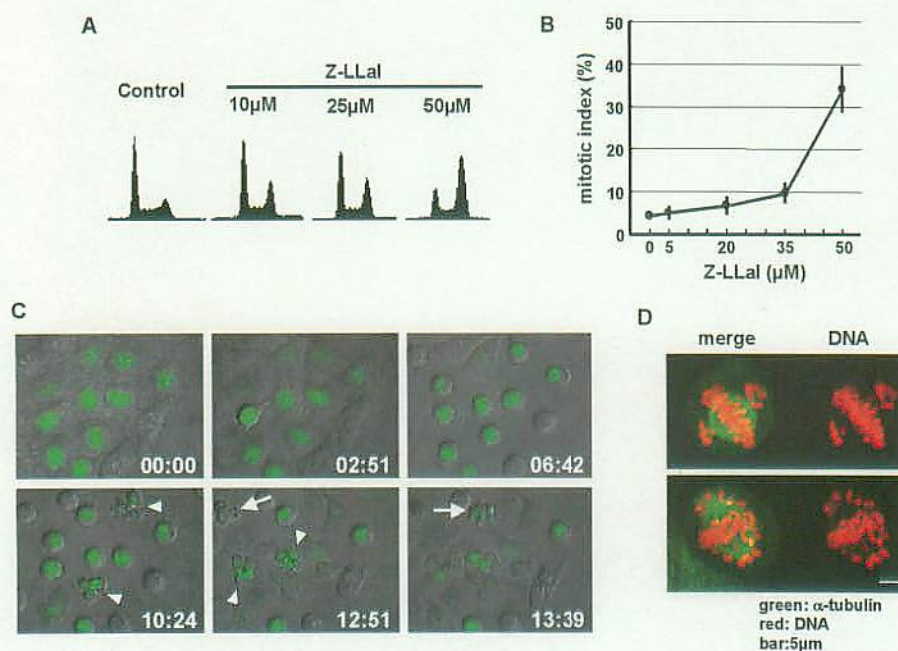
GFP とヒストン H2B の融合タンパク (H2B-GFP) を安定発現させた HeLa 細胞に、m-calpain に対する siRNA をトランスフェクションし、核の動態をタイムラプス蛍光・微分干渉ビデオ顕微鏡にて観察した (図 3D)。m-calpain の発現を抑制された細胞は、染色

体の不全整列を伴う分裂期の遅延を呈したのち、異常な細胞分裂を来たした。さらに、m-calpain の消失は、有意に、巨核や多分葉核といった核型の異常を、時間依存性に引き起こした(図 3E、F)。これらは、異常な分裂後に aneuploid 化したものと思われる。対して、コントロール siRNA (GL2) や μ -calpain に対する siRNA では、異常な核型は認められなかった (図 3E、F)。これらの結果は、m-calpain が染色体整列や正確な染色体分離のための重要な役割を持っていることを示唆する。

7-3 カルパイン阻害剤は、正常の双極性紡錘系があるにもかかわらず、染色体不全整列をともなう分裂期遅延をもたらす

さらにカルパインの分裂期の現象への関与を理解するために、我々は HeLa 細胞をペプチド系特異的カルパイン阻害剤 Z-LLal で処理した。蛍光励起細胞分離装置 (FACS) による、Z-LLal で 8 時間処理した HeLa 細胞の分析では、濃度依存性に DNA 含有量が 4 N の細胞の集積が見られた (図 4A)。我々はアセトオルセイン染色により染色体の状態の顕微鏡的な観察も行い、分裂期の細胞の割合 (mitotic index) が Z-LLal 処理後に増加していることがわかった(図 4B)。

図 4



ヒストン H2B-GFP 安定発現株 HeLa 細胞を、G2 期に同調し、その後 Z-LLal 含

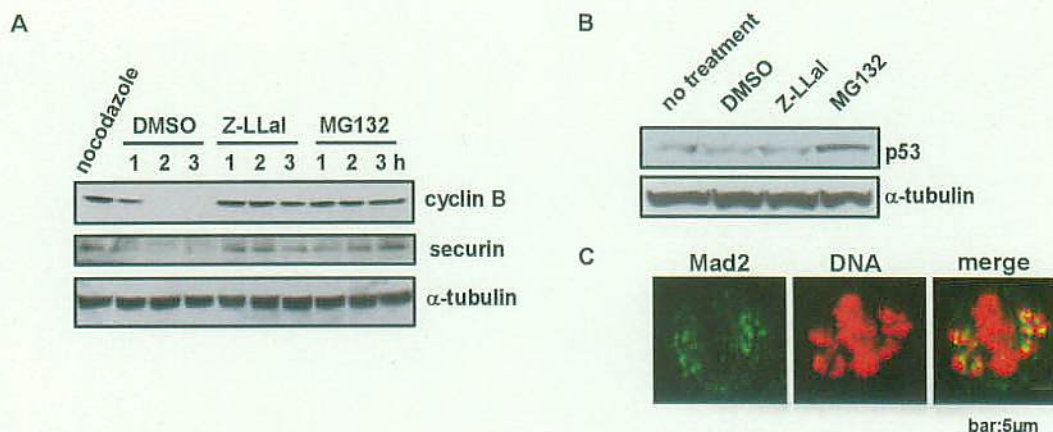
有培地中で培養し、タイムラプス顕微鏡で核の動態を観察した (図 4C)。6-10 時間の分裂期遅延が見られ、細胞は最終的には異常に分裂するか細胞死へと進んだ (図 4C)。これら Z-LLal 処理細胞では、metaphase plate への染色体整列は著しく障害されていたが、一方では染色体凝集と核膜崩壊は正常に起こった。これらの分裂期細胞の多くでは、双極性紡錘糸は正常に形作られているにも関わらず、いくつかの染色体は分裂期赤道面近くに集合せず、紡錘体極の近くあるいは後方にとどまっていた (図 4D)。この結果は、m-calpain に対する siRNA で処理した細胞で得られたものと合致した。その他のカルパイン阻害剤、MDL28170、Z-LLY-CH₂F、SJA6017 を用いて、HeLa 細胞、HCT116 細胞、HEK293T 細胞を処理した場合も、類似の結果が得られた。

7-4 カルパイン阻害剤は Mad2 依存性の spindle assembly checkpoint を惹起する

metaphase から anaphase への移行は、anaphase promoting complex (APC) により推進されるユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク分解反応の活性化によりおこる。Spindle assembly checkpoint は、すべての染色体が分裂期赤道面上に整列し、紡錘糸との両極性の結合を完遂するまでの間、APC 活性を阻害することによって、metaphase から anaphase への移行を抑止する。カルパイン阻害による分裂期停止が spindle assembly checkpoint によるものかどうか観察するために、我々はまず、カルパイン阻害剤にて処理した細胞中でのカルパイン活性を調べた。HeLa 細胞を “thymidine/nocodazole プロトコール” にて同調し、DMSO、Z-LLal、または MG132 (proteasome 阻害剤) いずれかを含むメディウム中にリリースした。Nocodazole から正常のメディウム (DMSO) 中にリリースされた細胞では、APC の基質として知られる cyclin B と securin は両方とも速やかに分解された。それとは対照的に、Z-LLal または MG132 を含むメディウム中にリリースされた細胞では、cyclin B と securin はいずれも nocodazole からリリースされて 3 時間は変化せず、APC がカルパイン阻害によって不活性な状態におかれている事が示唆された (図 5A)。我々は、Z-LLal が直接的に proteasome を阻害している可能性を除外するために、Z-LLal の p53 蛋白の安定性に対する影響を調べた。P53 は Mdm2 を介したユビキチン-プロテアソーム系によって分解されるが、APC 依存性の経路では分解されないことが知られている。

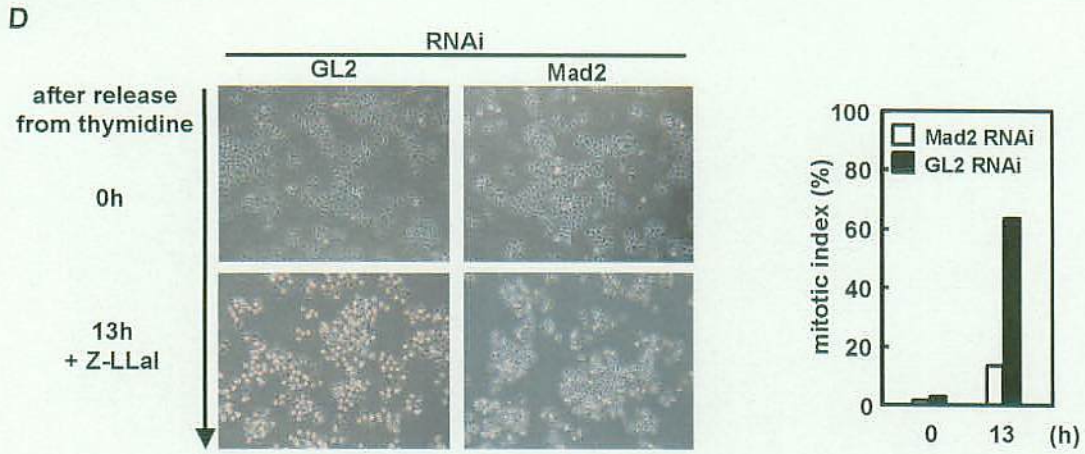
結果は、P53 は MG132 処理では安定化した、Z-LLal 処理では安定化しなかった (図 5B)。

図 5



APC 活性は spindle assembly checkpoint の賦活化によって抑制される。(22) この checkpoint 賦活化が、カルパインを阻害された細胞の prometaphase 停止に関与しているかどうかを突き止めるため、我々はキネトコアへの Mad2 蛋白の集積を調べた。Mad2 蛋白のキネトコアへの集積は、紡錘糸と結合していないキネトコアで起こり、spindle assembly checkpoint の維持に必要と考えられている。Z-LLal 処理により prometaphase に停止した細胞では、Mad2 は多くの整列できていない染色体のキネトコアに、一対の点状に染まったが、一方整列している染色体には Mad2 染色は陰性であった (図 5C)。整列できていない染色体は Mad2 陽性のキネトコアを有していることから、これらのキネトコアが双極性紡錘糸により正しく捕らえられていないことが示唆された。さらに、Mad2 特異的な siRNA を細胞にトランスフェクションすると、Z-LLal による prometaphase arrest がおこらなくなった (図 5D) ; 細胞は分裂期に入り速やかに分裂期から出た。対照的に、コントロール siRNA をトランスフェクションした細胞は Z-LLal により prometaphase に停止した。これらの結果は、カルパインの活性化が、未整列の染色体のキネトコアに微小管の正確な接着がなされるために必要であり、そのため、カルパイン阻害が Mad2 依存性の spindle assembly checkpoint を惹起し、prometaphase 停止を来たすことを示唆する。

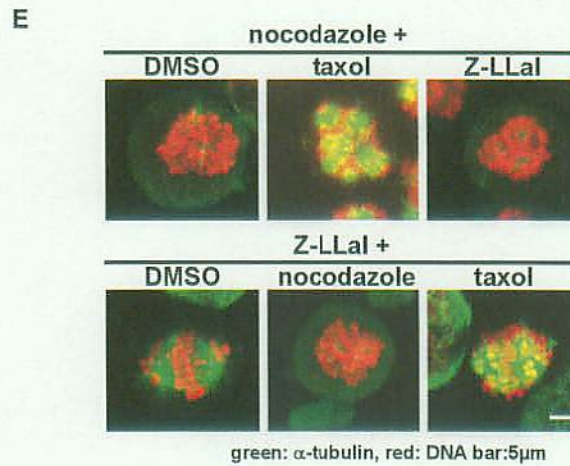
図 5



7-5 カルパイン阻害剤は双極性紡錘体の形成には何ら影響しない

Spindle assembly checkpoint は、ノコダゾールやタキソールといった分裂期紡錘系の安定性に影響を与える薬剤によって惹起される。したがって我々は、カルパイン阻害剤によって prometaphase で停止した細胞における分裂期紡錘系の状態を調べた。蛍光共焦点顕微鏡にて得られた画像から、Z-LLal を含むさまざまなカルパイン阻害剤にて処理された HeLa 細胞中において、2つの紡錘体極は互いに対極に位置し、双極性紡錘系は正常に形成されていた (図 4D)。これらの結果は、カルパイン阻害剤は中心体の分離にも双極性紡錘系の形成にも影響しないことを示す。

図 5



我々は、カルパイン阻害剤が taxol と同様の機序で分裂期紡錘系の安定性を変化さ

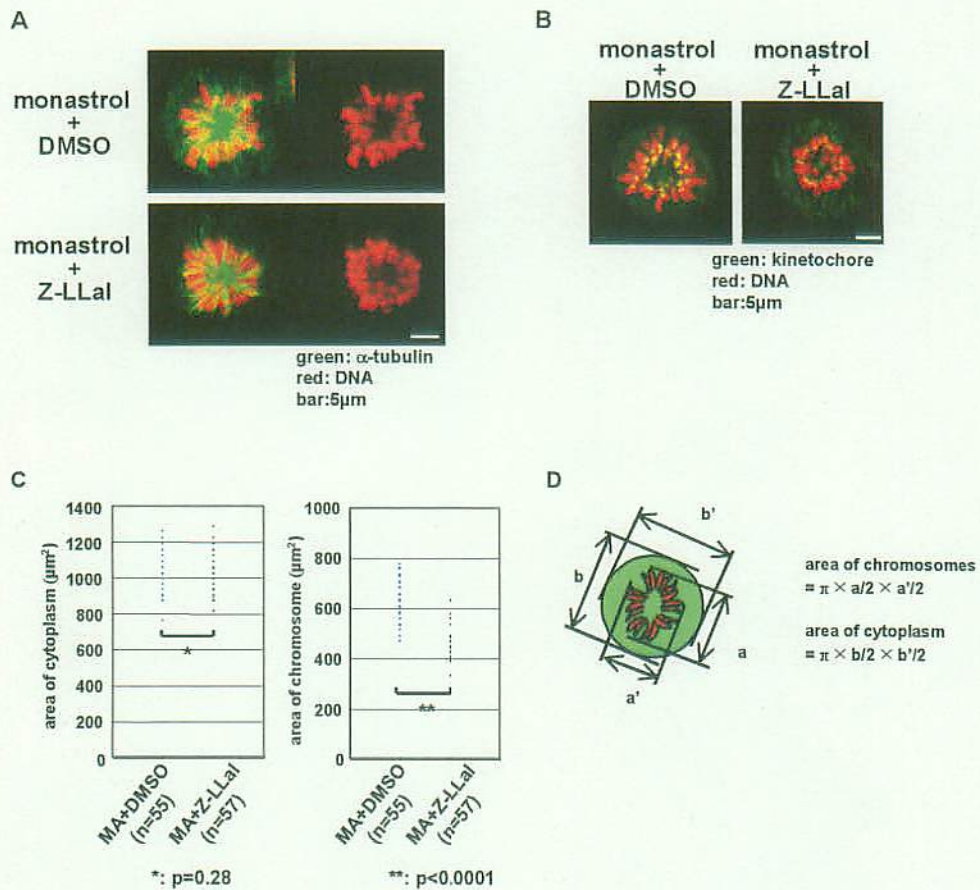
せていないかどうかを調べるために、HeLa 細胞を nocodazole または Z-LLal にて先行処理した後、DMSO 5 μ l/ml (コントロール)、Z-LLal 50 μ M、nocodazole 200 ng/ml、または taxol 100 nM で追加処理した。先行投与した Nocodazole 存在下では、Z-LLal は nocodazole による分裂期紡錘系の分解に影響しなかったが、taxol はこれらを強力に安定化した。反対に、先行投与した Z-LLal 存在下でも、nocodazole 追加処理は完全に紡錘系を分解した。Z-LLal は紡錘系を安定化させないと考えられた(図 5E)。これらの結果から、カルパイン阻害剤による prometaphase 停止は、双極性紡錘系形成や安定性の異常によるものではないということが証明された。

7-6 単極性紡錘体における染色体は、カルパイン活性の阻害により紡錘極に接近する分裂期における正常な染色体整列は、単結合性染色体 (monoorienting chromosome) の急速な極方向への移動、poleward force (極方向へ引く力) と polar ejection force (極方向からの斥力) による単結合性染色体の極方向・反極方向への動きからなる振動、そして赤道面への集合に続いておこる両極性の結合 (bipolar attachment) を含む、複雑かつ多様な動きを経て完遂される。(1, 23, 24) m-calpain の siRNA (図 3C) およびカルパイン阻害剤 (図 4D) で処理し prometaphase にて停止した細胞の顕微鏡的な観察では、いくつかの染色体は、二つのうち一方の紡錘体極からの紡錘系と結合し、その極の近くに局在する。これらの発見は、我々にカルパイン活性が分裂期の polar ejection force の創出に必要であるかどうかを調べるよう後押しした。

以前の報告により、polar ejection force は単極化した細胞内での染色体の位置取りを調べることによりモニターできることが示されている(5)。Eg5 の特異的阻害剤であるモナストロールで処理した細胞は、中心体の分離ができずに単極化する(25)。このとき、染色体は紡錘極の周囲にリング状に位置取り、それぞれキネトコアへの引力(pole ward force) と染色体腕部への斥力(polar ejection force)により “V” 字型の形態をとり、そのリングの中心には広い無染色体領域が見られる。pole ward force と polar ejection force のバランスが、この染色体の位置取りを決定する。通常の prometaphase 細胞では、polar ejection force が poleward force より強い証拠として、chromosome clear zone が形成される (図 6A 上、

および B 左)。しかしながら、モノストール存在下に Z-LLal 処理した細胞では、単極性紡錘体上の染色体は紡錘極寄りに集合する傾向があり、“V”字型を呈さなかった(図 6A 下、および B 右)。さらに我々は蛍光共焦点顕微鏡により得られた写真から、細胞質および染色体占拠領域の断面積を算出した (図 6D)。Z-LLal にて処理した細胞の染色体占拠領域の断面積 (平均値 $455.7\mu\text{m}^2$) はコントロールとして用いた DMSO (平均値 $619.8\mu\text{m}^2$) の場合よりも有意に狭かった ($p < 0.0001$, t-test)。細胞質の断面積では両者間に有意差は認めなかった (平均値 $1041.3\mu\text{m}^2$ および $1018.6\mu\text{m}^2$, $p = 0.28$, t-test)。さらに RNAi を用いて検証したところ、m-calpain に対する RNAi でのみ、Z-LLal と同様の結果が得られた。これらの結果は m-calpain の阻害が染色体腕部にかかる polar ejection force の減弱を来たすことを示唆する。よって我々は m-calpain は分裂期に活性化され、polar ejection force を制御するような標的分子を分解しているにちがいないと推測した。

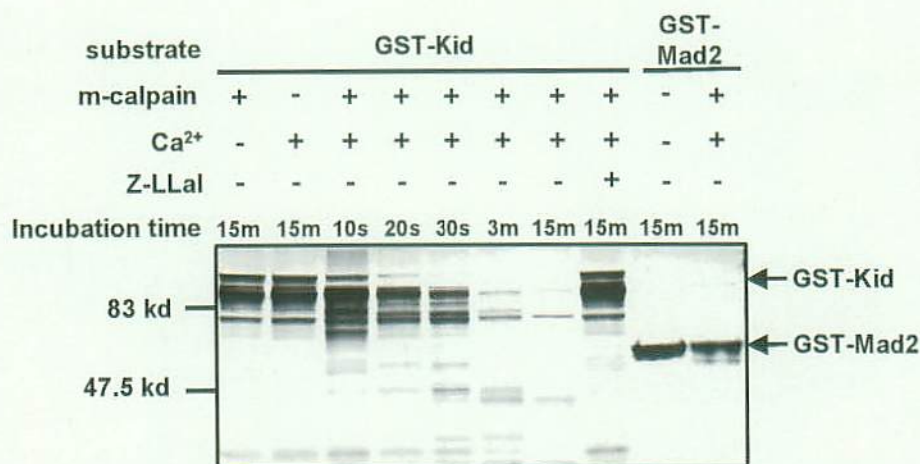
図 6



7-7 Kid は in vitro における m-calpain の特異的基質である

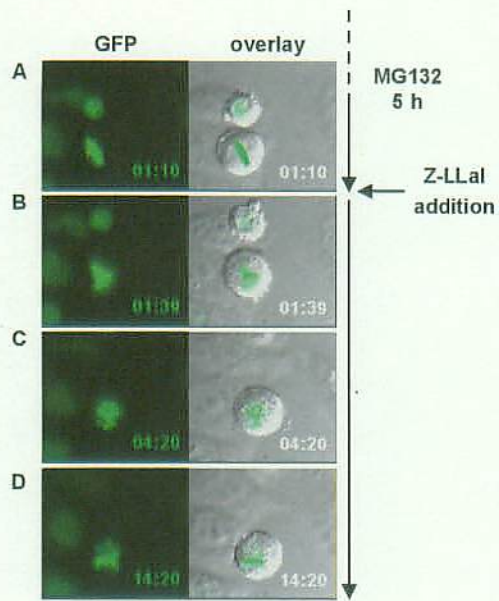
我々は、分裂期に polar ejection force を制御するような分子から、m-calpain の基質を探すことにした。Kid は polar ejection force 創出の中心的役割を担っていることが知られていることから、我々は精製したブタの m-calpain と、その基質として GST-Kid 融合リコンビナントタンパクを用いた in vitro proteolysis assay を行うことにした。図 7 に示すように、GST-Kid は m-calpain によって、カルシウムイオン存在下に、時間依存性に分解を受け、その分解反応は、Z-LLal によって完全に阻害された。ネガティブコントロールとして用いた GST-Mad2 は m-calpain に分解を受けなかった。よって我々は、m-calpain は Kid の分解を介して、polar ejection force を制御していると推測した。

図 7



7-8 カルパイン活性は分裂期赤道面への染色体整列の維持に必要である

アフリカツメガエル卵抽出物を用いた実験報告では、Kid により創出される polar ejection force は分裂期赤道面上への染色体整列の維持に必要であるとされている(4)。カルパイン活性が染色体整列の確立だけでなく、metaphase におけるその維持にも必要であるかどうかを観察するため、我々は、HeLa 細胞を MG132 処理にて metaphase に停止させた(図 8A)(26)あと、MG132 存在下に Z-LLal を添加し、time-lapse microscopy による観察をおこなった(図 8B-D)。



コントロールとして、MG132 存在下に DMSO 処理をおこなうと、細胞は 14 時間に達するまで metaphase で停止しつづけた。対照的に、MG132 を含有するメEDIUM中に Z-LLal を添加した場合は、染色体整列の急速な崩壊が誘導され、観察時間内では再び整列することはなかった。最終的な表原型は、Z-LLal 単独処理と酷似していた。これらの結果から、metaphase における染色体整列が静的なものではなく、その維持には m-calpain 活性を必要とすることが示された。

8. 考察

我々は、m-calpain の蛋白量が G2-M 期に増加すること、一方 μ -calpain は細胞周期を通じてほぼ一定であることを示した。 μ -calpain ではなく、m-calpain を標的とした RNAi では、赤道面に整列できない染色体を伴う分裂期の細胞が蓄積する。 μ -calpain ではなく、m-calpain を抑制した細胞では、大型で分葉状の異形な核の比率が時間経過に従い増加した。したがって、これらの所見は、古くから知られ、同列に論じられてきた 2 つの conventional calpains のうち、m-calpain のみが分裂期における染色体整列に関与していることを示唆するものである。

m-calpain の阻害は、明らかな双極性紡錘系形成の異常なしに、染色体の不全整列を伴う分裂期遅滞を引き起こす。これら整列不全染色体のキネトコアでは、Mad2 染色が陽性であり、正常なキネトコア-紡錘系間の結合の障害により、spindle assembly checkpoint (紡錘系形成チェックポイント) が作動していることを意味する。分裂期における m-calpain の機能阻害は、どちらかの紡錘極近くに局在する(整列していない)染色体において、双極性のキネトコア-紡錘系間の結合成立に障害を来たし、結果として spindle assembly checkpoint を惹起することになる。

染色体が分裂期赤道面に整列するためには、biorient、すなわち紡錘系によるキネトコアへの接着が両極性になされることが必要である。いくつかの染色体は核膜崩壊後直ちに biorient をなし、赤道面付近を振動するように動く。その他の染色体は、当初はどちらか一方の紡錘極からだけの紡錘系と接触し、結果として急速にその紡錘系の起源する紡錘極の方へと動く。紡錘極に近づくと、対を成す両方の姉妹動原体(キネトコアペア)は同じ一つの紡錘極からの紡錘系に捉えられる。この単極性の結合は、双極性の結合を成立させるために、一对のキネトコアのうちいずれか一方が対極からの紡錘系に結合するまで、Aurora kinase-INCENP 複合体により持続的に修正される(27)。Polar ejection force は、単極性結合染色体が、それらの結合している方の紡錘極から遠ざかり、双極性結合を成立させ、赤道面に整列するために必要である。Polar ejection force の障害は、双極性結合が成立するまでの、キネトコア-紡錘系間の結合解除状態の頻度を上げることになる。この

ことが、m-calpain の機能を阻害された細胞にプロメタフェーズ停止を引き起こす、Mad2 依存性の spindle assembly checkpoint 作動の引き金となる。

我々は、以下のような理由により、m-calpain が染色体整列に必要な polar ejection force を創成するという役割を担っていると考える。第一に、RNAi により m-calpain 発現を抑制した細胞およびカルパイン阻害剤にて処理した細胞のいずれも、分裂期における染色体整列ができなくなる。第二に、monastrol 存在下にカルパイン阻害剤にて処理した細胞では、単極性紡錘極から周囲への染色体の拡がりが増小され、各染色体は monastrol 処理時に典型的に見られる V 字型の形態を損なってしまう。この表原型は、近年、分裂期染色体に働く polar ejection force 創成の主要な分子として報告されている Kid(3-5)に対する中和抗体のマイクロインジェクション時に見られるものと類似している(5)。この発見は、Kid の過剰発現が染色体整列を阻害する(7)という最近の観察とともに、われわれの「m-calpain が、正確な分裂期染色体整列に必要な Kid 蛋白（が正しく機能するため）のターンオーバーを制御している」という仮説を支持するものである。

Arthur ら (2000) は、*Capn4* 遺伝子のノックアウトマウスから得られたマウス胎仔線維芽細胞(*Capn4*^{-/-}MEFs)を用いた実験により、m-、 μ -calpain (conventional calpains) は、胎生期発育には必要であるが、細胞増殖および分裂には必要ではないと報告している(28)。*Capn4* は m-、 μ -calpain 両者共通の制御サブユニット (common regulatory small subunit ; 30Kd) であるので、*Capn4*^{-/-}MEFs は conventional calpains の活性を欠いている可能性はある。この点で、本研究結果と Arthur らの研究結果との間には乖離が見られるが、我々の発見とかれらの *Capn4*^{-/-}MEFs を用いた実験結果の乖離は、conventional calpains が *Capn4* なしでも活性化しうる(29)、という最近の実験結果により説明され得る。この仮説は、*Capn4* に対する RNAi も *Capn4* 阻害剤 PD150606 も HeLa 細胞の分裂期の進行に有意な影響を示さなかった、という我々の実験結果により支持される。したがって、哺乳類細胞における calpain2 (m-calpain の大サブユニット) の阻害は、*Capn4* の抑制・阻害とは生物学的に異なる転帰となると考えられる。

蛋白分解反応は、細胞周期進行のための重要な推進要素である。細胞内カルシウ

ム濃度の変動もまた、細胞周期の進行、特に分裂期の進行にとって不可欠であることが証明されてきている。そのため、その分裂期における基質分子は不明であるものの、カルシウム依存性のプロテアーゼである m-calpain が分裂期の進行に必要であることが古くから推測されてきた。我々のデータは、m-calpain が、おそらくクロモカイネシン Kid の turnover を介して分裂前期の染色体に働く polar ejection force を制御することにより、bioriented chromosomes の確立に不可欠であることを示した。m-calpain と Kid の実際の細胞内での関連性と、m-calpain のさらなる基質分子の同定は、カルシウムシグナリングによる分裂期における染色体安定性制御機構の分子的洞察に寄与すると考えられる。

9. 結語

細胞分裂期における染色体整列は、DNAをはじめ、さまざまな細胞内情報・構成要素を正確に継代して行くために大変重要な細胞内現象である。今回の実験において、旧知のカルシウム依存性プロテアーゼである m-calpain が分裂前期の染色体にはたらく紡錘極からの斥力である polar ejection force を創出するのに必要であり、その働きを介して染色体整列に大きく寄与していることがわかった。また、m-calpain の阻害は微小管の重合にも脱重合にも直接的な影響は認めないことから、その働きはモータータンパクの機能を介していることが考えられた。

カルシウムシグナリングと細胞周期進行とは、細胞内カルシウム濃度の細胞周期依存性の変動から、古くから強い関連が示唆されていたが、本実験は、その一部の解明の端緒となるものと考えられる。今後はクロモカイネシン Kid との関係の更なる解析や、m-calpain の分裂期における Kid 以外の基質分子を同定することにより、染色体整列のメカニズムがより詳細に理解されるものと思われる。

10. 参考文献

1. Kapoor, T. M., and Compton, D. A. (2002) *J Cell Biol* **157**, 551-556.
2. Tokai, N., Fujimoto-Nishiyama, A., Toyoshima, Y., Yonemura, S., Tsukita, S., Inoue, J., and Yamamoto, T. (1996) *Embo J* **15**, 457-467.
3. Funabiki, H., and Murray, A. W. (2000) *Cell* **102**, 411-424.
4. Antonio, C., Ferby, I., Wilhelm, H., Jones, M., Karsenti, E., Nebreda, A. R., and Vernos, I. (2000) *Cell* **102**, 425-435.
5. Levesque, A. A., and Compton, D. A. (2001) *J Cell Biol* **154**, 1135-1146.
6. Yajima, J., Edamatsu, M., Watai-Nishii, J., Tokai-Nishizumi, N., Yamamoto, T., and Toyoshima, Y. Y. (2003) *Embo J* **22**, 1067-1074.
7. Ohsugi, M., Tokai-Nishizumi, N., Shiroguchi, K., Toyoshima, Y. Y., Inoue, J., and Yamamoto, T. (2003) *Embo J* **22**, 2091-2103.
8. Santella, L., Kyozuka, K., Hoving, S., Munchbach, M., Quadroni, M., Dainese, P., Zamparelli, C., James, P., and Carafoli, E. (2000) *Exp Cell Res* **259**, 117-126.
9. Santella, L., Kyozuka, K., De Riso, L., and Carafoli, E. (1998) *Cell Calcium* **23**, 123-130.
10. Cox, E. A., and Huttenlocher, A. (1998) *Microsc Res Tech* **43**, 412-419.
11. Bhatt, A., Kaverina, I., Otey, C., and Huttenlocher, A. (2002) *J Cell Sci* **115**, 3415-3425.
12. Wang, K. K., Posmantur, R., Nadimpalli, R., Nath, R., Mohan, P., Nixon, R. A., Talanian, R. V., Keegan, M., Herzog, L., and Allen, H. (1998) *Arch Biochem Biophys* **356**, 187-196.
13. Kimura, Y., Koga, H., Araki, N., Mugita, N., Fujita, N., Takeshima, H., Nishi, T., Yamashima, T., Saido, T. C., Yamasaki, T., Moritake, K., Saya, H., and Nakao, M. (1998) *Nat Med* **4**, 915-922.
14. Xu, Y., and Mellgren, R. L. (2002) *J Biol Chem* **277**, 21474-21479.

15. Santella, L. (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **244**, 317-324.
16. Carafoli, E., and Molinari, M. (1998) *Biochem Biophys Res Commun* **247**, 193-203.
17. Yamaguchi, R., Maki, M., Hatanaka, M., and Sabe, H. (1994) *FEBS Lett* **356**, 114-116.
18. Lane, R. D., Allan, D. M., and Mellgren, R. L. (1992) *Exp Cell Res* **203**, 5-16.
19. Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001) *Nature* **411**, 494-498.
20. Nitta, M., Tsuiki, H., Arima, Y., Harada, K., Nishizaki, T., Sasaki, K., Mimori, T., Ushio, Y., and Saya, H. (2002) *Genes Cells* **7**, 151-162.
21. Hirota, T., Morisaki, T., Nishiyama, Y., Marumoto, T., Tada, K., Hara, T., Masuko, N., Inagaki, M., Hatakeyama, K., and Saya, H. (2000) *J Cell Biol* **149**, 1073-1086.
22. Fang, G., Yu, H., and Kirschner, M. W. (1998) *Genes Dev* **12**, 1871-1883.
23. Skibbens, R. V., Skeen, V. P., and Salmon, E. D. (1993) *J Cell Biol* **122**, 859-875.
24. Rieder, C. L., and Salmon, E. D. (1994) *J Cell Biol* **124**, 223-233.
25. Kapoor, T. M., Mayer, T. U., Coughlin, M. L., and Mitchison, T. J. (2000) *J Cell Biol* **150**, 975-988.
26. Topper, L. M., Bastians, H., Ruderman, J. V., and Gorbsky, G. J. (2001) *J Cell Biol* **154**, 707-717.
27. Tanaka, T. U., Rachidi, N., Janke, C., Pereira, G., Galova, M., Schiebel, E., Stark, M. J., and Nasmyth, K. (2002) *Cell* **108**, 317-329.
28. Arthur, J. S., Elce, J. S., Hegadorn, C., Williams, K., and Greer, P. A. (2000) *Mol Cell Biol* **20**, 4474-4481.
29. Hata, S., Sorimachi, H., Nakagawa, K., Maeda, T., Abe, K., and Suzuki, K. (2001) *FEBS Let* **501**, 111-114.