

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18528

研究課題名(和文)新規分裂制御因子LUZP1の細胞分裂期における機能解析

研究課題名(英文)The analysis of new mitosis regulating protein LUZP1

研究代表者

兵頭 寿典(HYODO, Toshinori)

名古屋大学・医学系研究科・研究員

研究者番号：40710645

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞分裂は細胞が増殖するために必要な現象である。つまり分裂を制御できれば、増えることで害をなす「がん」や「病原菌」などの病気を抑えられるようになる。しかし細胞分裂は非常に複雑であり、未解明な領域が多い現象である。申請者は細胞分裂を制御する新規因子の模索を行い、LUZP1と呼ばれる機能未知のタンパク質を見出した。そしてLUZP1が細胞分裂の最終段階である細胞質分裂に関与していることを明らかにした。さらにLUZP1が分裂を制御する重要な2つのシグナル経路をつなぐような役割をもっていることを見出した。

研究成果の概要(英文)：All cells need to divide for an increase in its number. Cancer or bacteria that get worse by increasing in cell numbers also do it. If we can control it, we will suppress these diseases. But the mechanisms of cell division still remain largely unknown. We tried to find new cell division regulating proteins and finally we focused LUZP1 that function is unknown. In this research, we revealed that LUZP1 regulates cytokinesis that is the last step of cell division and may bridge the important two signal pathways during cell division.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞分裂

1. 研究開始当初の背景

細胞は増殖するために必ず細胞分裂を行う必要がある。これは増殖が病気の悪化につながるがん細胞や病原菌でも同様である。つまり細胞分裂を制御することは、がんなどの病気に対する治療につながることになる。しかし細胞分裂機構は複雑で未解明な領域が多く、病気に対する治療へ応用していくためにはさらなる解析が必要とされている。

申請者は複雑な分裂機構の一端を明らかにするため、細胞分裂を制御する新規タンパク質の探索を行った。そして複数得られた候補タンパク質の中から、特に細胞分裂に影響を及ぼす可能性が高いと考えられた LUZP1 に着目した。

2. 研究の目的

申請者の行った探索により LUZP1 が細胞分裂に影響を及ぼす可能性が考えられた。しかし LUZP1 は機能が予想できる保存されたアミノ酸配列を持っておらず、また LUZP1 に関して、これまでそのタンパク質機能を報告した論文は存在しない。つまり機能が全くの未知である。そこで申請者は LUZP1 の細胞分裂期における様々な基礎解析を行い、LUZP1 の機能を明らかにし、新たな細胞分裂の制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 共焦点顕微鏡観察と定点培養観察

共焦点顕微鏡は細胞の微細構造まで詳細に観察することができる。この顕微鏡に細胞を培養しながら定点観測が行える培養タイムラプス装置を付属させ、細胞を生かしたまま微細構造の変化を観察する。微細構造の変化は目視では評価できないため、メタモルフ、イメージJといった解析ソフトを用いて統計的有意差などの検定を行う。

(2) タンパク質発現と精製

目的タンパク質が細胞内のどの部位に局在し、どの様に動くかを観察するため GFP などの蛍光タンパク質を融合したタンパク質を細胞内に発現させる。細胞内への導入には市販のリポ脂質を用いる。またタンパク質の生化学的解析を行うため、タンパク質を発現させた細胞を破碎し、抗体を用いて単離生成する。

(3) キナーゼ(リン酸化酵素)アッセイ

リン酸化酵素は ATP のリン酸基を基質(酵素の標的タンパク質)に移す酵素である。ラジオアイソトープで標識された ATP を用いて、リン酸化酵素 基質混合時に標識されたリン酸基が基質に移行するかの検討を行う。ラジオアイソトープは高エネルギーを放出しているため、そのエネルギーを検出器で読み取ることでリン酸基の移行が確認できる。

(4) リン酸化部位の同定実験

質量分析器はタンパク質を構成するペプチド配列だけでなく、ペプチドを構成する個々のアミノ酸のリン酸化やメチル化などの修飾も同定できる。そこでタンパク質を精製し、質量分析器にかけることでそのタンパク質のリン酸化部位の同定を試みる。しかし質量分析器ではリン酸化修飾がタンパク質にどのような影響を与えるかまでは判定できない。そこでリン酸化部位を変化させた点変異タンパク質を作成し、そのタンパク質を細胞に発現させることで、タンパク質におけるリン酸化修飾の意味を判定する。

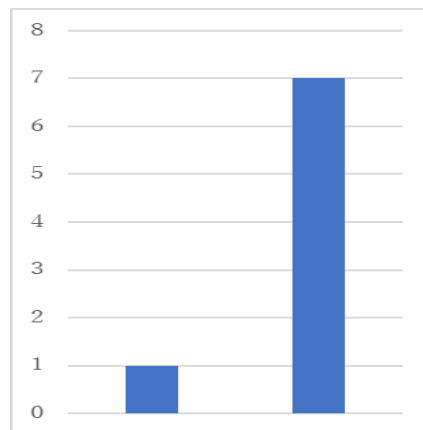
4. 研究成果

(1) LUZP1 は分裂の最終段階、細胞質分裂に関与する。

申請者は共焦点顕微鏡と培養装置を併用したタイムラプス観察により、LUZP1 を過剰発現させた細胞と LUZP1 の発現を抑制した細胞の分裂中の挙動を詳細に解析した。その結果 LUZP1 の過剰発現により、細胞質分裂がうまく進行しなくなり、分裂を失敗する細胞が有意に増加する現象が観察された(図1)。また LUZP1 を抑制した場合においても細胞質分裂に異常が生じることが確認できた。以上の結果より、LUZP1 が間違いなく細胞分裂に関与しており、さらに細胞質分裂の制御に関わっていることが明らかになった。

図1、多核化細胞割合

左から、
HeLa/GFP(コントロール)
HeLa/GFP-LUZP1



単位、割合 (%)

(2) LUZP1 はリン酸化酵素 X に結合し、リン酸化される。

申請者は LUZP1 の機能を推測するため、質量分析器を用いて LUZP1 に結合する新規タンパク質を探索した。その結果、LUZP1 がリン酸化酵素 X と結合することを見出した。

リン酸化酵素は細胞内に多数存在し、それぞれが異なる基質をリン酸化する。そこで次に酵素 X が LUZP1 をリン酸化するかをキナーゼアッセイにより確認した。その結果、間期、

細胞分裂期に関係なく LUZP1 にラジオアイソトープ標識されたリン酸基が移行することが確認でき(図2) 酵素 X が LUZP1 をリン酸化することが明らかになった。さらに LUZP1 を分割してどの部位が酵素 X にリン酸化されるかを確認した結果、分割された複数の LUZP1 がリン酸化されることが判明し、LUZP1 は酵素 X に複数箇所リン酸化されることが明らかとなった。

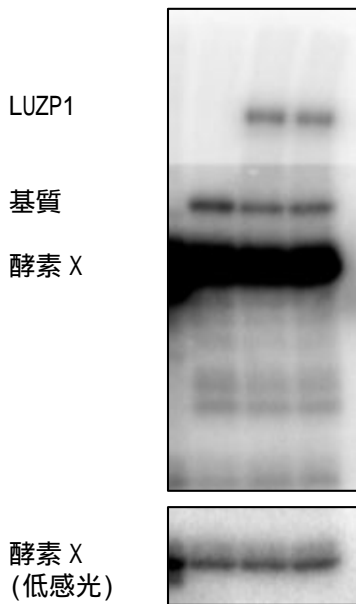
図2、酵素 X とのキナーゼアッセイ

左から

酵素 X + 基質 + ペプチド (コントロール)

酵素 X + 基質 + LUZP1 (間期)

酵素 X + 基質 + LUZP1 (細胞分裂期)



(3) LUZP1 はリン酸化酵素 X のリン酸化活性を阻害する。

次に申請者は LUZP1 がリン酸化酵素 X のリン酸化活性を制御するかの検討を行った。過去の報告から酵素 X によってリン酸化されるタンパク質が明らかとなっていたため、酵素 X による基質のリン酸化能力が LUZP1 の存在により変化するかを観察した。その結果 LUZP1 存在時にのみ酵素 X の基質リン酸化能力が低下することが明らかになり(図2) LUZP1 は酵素 X のリン酸化活性を抑制することが明らかとなった。

(4) LUZP1 は細胞運動に関与する

LUZP1 に結合する酵素 X はこれまでの報告から細胞運動を制御していることが明らかとなっている。そこで申請者は LUZP1 が酵素 X 同様に細胞運動を制御するか、定点培養観察で細胞の動きを追うことで検討した。その結果 LUZP1 が酵素 X 同様に細胞運動に影響を与えていることが明らかとなった(図3)。この結果から LUZP1 は酵素 X の制御を行うことで細胞運動能力を制御している可能性が示唆された。しかしこの仮説はまだ証拠不十分

分であるため、今後より詳細な検証を行っていく必要がある。

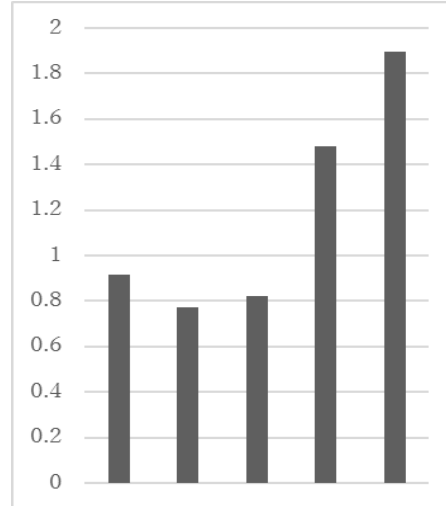
図3、LUZP1 抑制時の細胞運動速度

左から

HeLa(タンパク質発現抑制なし)

HeLa/リン酸化酵素 X 抑制 (レーン 2, 3)

HeLa/LUZP1 抑制 (レーン 4, 5)



単位、速度 (10⁻⁶ m/s)

(5) LUZP1 は細胞分裂を制御する別のリン酸化酵素 Y にもリン酸化される。

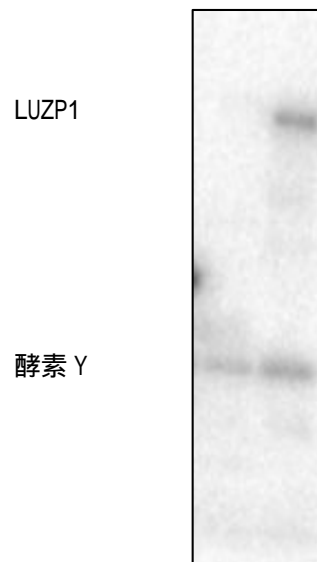
LUZP1 は分裂期に特異的に形成される構造体に局在する。申請者はこの局在から LUZP1 が細胞分裂期に機能する重要なリン酸化酵素 Y と相互作用しているのではないかと考えた。そこでリン酸化酵素 Y と LUZP1 でキナーゼアッセイを行ったところ、酵素 Y が LUZP1 をリン酸化することが判明した(図4)。

図4、酵素 Y とのキナーゼアッセイ

左から

酵素 Y + ペプチド (コントロール)

酵素 Y + LUZP1



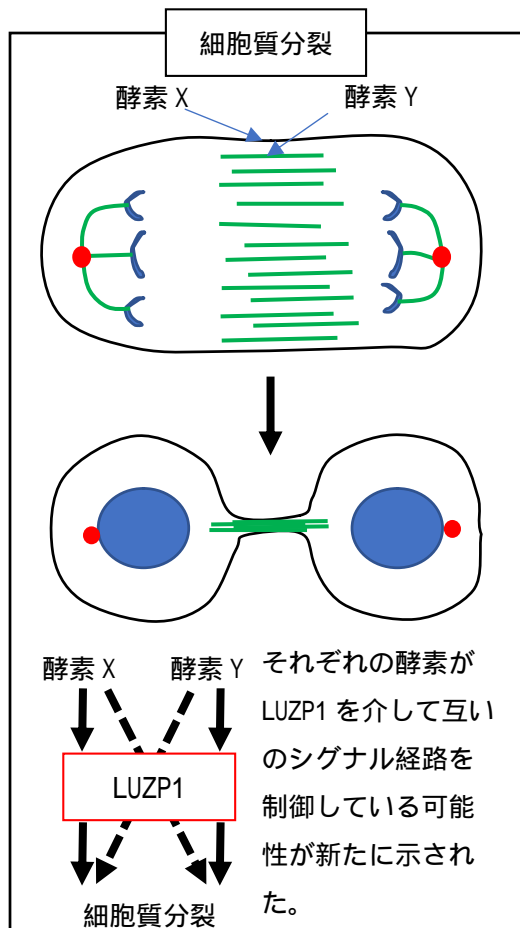
(6) LUZP1 のリン酸化部位の同定

LUZP1 が酵素 X や酵素 Y にリン酸化されることが先の実験より明らかになった。また公開されているデータベース情報より LUZP1 は細胞分裂期にリン酸化が亢進することが報告されている。どの部位が細胞分裂期にリン酸化され、分裂に影響を与えるのかを、リン酸化予想部位に点変異をいれることで検討を行った。しかし得られた候補部位、約 10 か所に変異を入れたが特に分裂への影響は観察されなかった。機能変化には複数部位へのリン酸化が必要な可能性が考えられるため、今後は変異部位を組み合わせた検証が必要と考えられる。

(7) LUZP1 機能考察

今回申請者が見出した LUZP1 をリン酸化する酵素 X と酵素 Y はこれまでの報告から両者ともに細胞質分裂に関与していることが判明している。しかし興味深いことに両者は別のシグナル経路を制御している。今回申請者が見出した結果を考慮すると LUZP1 は両者のシグナル経路をつなぐ機能がある可能性がある(図 5)。この仮説を検証するため、今後 LUZP1 と酵素 X、酵素 Y とのより詳細な解析を継続していく必要がある。本仮説が正しければ、細胞分裂の新たな制御機構が一つ明らかになることになり、分裂研究を臨床応用していくための価値ある前進といえる。

図 5、まとめの模式図



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 8 件)

(1) Hyodo T, Ito S, Asano-Inami E, Chen D, Senga T., A regulatory subunit of protein phosphatase 2A, PPP2R5E, regulates the abundance of microtubule crosslinking factor 1., FEBS journal, 査読有、Vol. 283, 2016, pp. 3662-3671
DOI:10.1111/febs.13835

(2) Mansour MA, Hyodo T, Akter KA, Kokuryo T, Uehara K, Nagino M, Senga T., SATB1 and SATB2 play opposing roles in c-Myc expression and progression of colorectal cancer., Oncotarget, 査読有、Vol. 7, 2016, pp.4993-5006
DOI:10.18632/oncotarget.6651

(3) Maeda M, Hasegawa H, Sugiyama M, Hyodo T, Ito S, Chen D, Asano E, Masuda M, Hasegawa Y, Hamaguchi M, Senga T., Arginine methylation of ubiquitin-associated protein 2-like is required for the accurate distribution of chromosomes., FASEB journal, 査読有、Vol. 30, 2016, pp. 312-323
DOI: 10.1096/fj.14-268987

(4) Chen D, Ito S, Yuan H, Hyodo T, Kadomatsu K, Hamaguchi M, Senga T., EML4 promotes the loading of NUDC to the spindle for mitotic progression., Cell Cycle, 査読有、Vol. 14, 2015, pp. 1529-1539
DOI: 10.1080/15384101.2015.1026514

(5) Mansour MA, Hyodo T, Ito S, Kurita K, Kokuryo T, Uehara K, Nagino M, Takahashi M, Hamaguchi M, Senga T., SATB2 suppresses the progression of colorectal cancer cells via inactivation of MEK5/ERK5 signaling., FEBS Journal, 査読有、Vol. 282, 2015, pp. 1394-1405
DOI: 10.1111/febs.13227

〔学会発表〕(計 1 件)

兵頭 寿典、浜口 道成、微小管形成に関わる MTCL1 の役割、第 45 回東海乳酸菌研究会、2016 年 2 月、中日ビル(愛知県名古屋市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

兵頭 寿典 (HYODO, Toshinori)
名古屋大学大学院・医系研究科・研究員
研究者番号：40710645

(2)研究分担者

なし