

令和 2 年 5 月 14 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06168

研究課題名(和文) 超微小空間における中心小体構造の自己組織化原理の解明

研究課題名(英文) Self-assembly mechanisms of centrioles in nanospace

研究代表者

北川 大樹 (Kitagawa, Daiju)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・教授

研究者番号：80605725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、中心体複製における重要なプロセスである中心小体構築の分子機構に主眼を置き、その初期過程において微小空間で働く分子の機能解析を行った。その結果、初期過程で構築される土台構造であるカートホイールが形成される意義の一端を明らかにした。さらに中心小体周辺のマトリックス構造が形成される為に必要な分子複合体の同定に成功し、その複合体によって分裂期におけるマトリックスの拡大と中心小体間の結合が制御されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、新しいタンパク質分解システムを導入することで、中心小体の基底部であるカートホイール構造の生理的な役割を包括的に明らかにした。また、中心小体と周囲のマトリックスの相互関係を明らかにすることができた。このような意味で本研究は方法論的にも新しい概念的にも当該分野に対する波及効果は高いものと期待している。また、本研究で解析した因子は小頭症を含む遺伝子疾患の原因遺伝子としても知られていることから、基礎生物学のみならず医学的にも重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on the molecular mechanisms of centriole formation, which is an important process in centrosome duplication, and analyzed the functions of molecules working in nanospace during the initial process. The results clarify the significance of the formation of the cartwheel, which is a foundation structure constructed in the initial process. In addition, we have identified a molecular complex that is required for the formation of the matrix structure around the centriole and for the binding between mother and daughter centrioles during mitosis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：中心体 中心小体 細胞分裂

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中心体は動物細胞において進化上保存された自己複製する細胞小器官であり微小管形成中心として機能する。中心体複製は細胞周期ごとに一度だけ起こるように厳密に制御されており、分裂期における二極化した紡錘体の形成、染色体分配、ゲノム安定性維持において重要である。中心体はその核として機能する中心小体及びそれを取り囲む中心体マトリックスから構成されている。また、中心小体は精子鞭毛や繊毛の形成を調節しており中心小体が正常に機能しないと鞭毛や繊毛が形成されず、様々な疾病が起きることが報告されている (ciliopathy、男性不妊症など)。中心小体は9回対称性を有した円筒状の特微的な構造体で、その自己複製機構は未解明な部分が多く、細胞生物学の最大の謎の一つとされている。中心小体は幾つかの段階を経て構築される。初期過程では、基底部分であるカートホイール構造が構築され、伸長及び成熟過程を経てその構築が完了する。中心小体形成は細胞周期に同調して進行するが、段階な構築過程に介在する分子間相互作用に関しては不明な点が多い。さらには、新しい中心小体の形成が、既存の中心小体の基底部付近に限定されるメカニズム、構築された中心小体が中心体マトリックスである **PCM** をリクルートすることで機能を獲得するメカニズムに関しても不明な点が多いのが当初の状況であった。

2. 研究の目的

本研究では細胞生物学、生化学、構造生物学的手法に立脚した複合的な戦略によりこれらの課題にアプローチする。特に、中心小体構築の初期過程に着目し、娘中心小体が母中心小体の根本で形成され始める分子メカニズムとは？一つの母中心小体に対して、形成される娘中心小体を唯一に限定する仕組みとは？ **PCM** の形成はどのように起こるのか？などの中心体複製研究における基本原理を解明することを目指した。本研究では分子機構を明らかにするとともに、中心小体構造構築の進化的保存性、高度な再現性を保障する基本原理の解明に正面から取り組み、新しいコンセプトの創出を目指した。

3. 研究の方法

ヒト培養細胞をモデルとし、細胞周期進行に応じて、各中心小体構成因子が複合体を形成しながら、中心小体、特に初期前駆体であるカートホイール構造を構築する様子を免疫染色・超解像顕微鏡観察を用いて観察する。**AID (Auxin-inducible-degron)** システムによるタンパク質分解系、**PIK4** 阻害剤、**RNAi** を併用し、構成因子間の階層性に関しても検討を加える。

免疫染色、最新型超解像顕微鏡を用いて詳細に記述する。レファレンスとして、中心小体の外郭、伸長の程度をモニターできる **Cep192** 抗体を用いる。各中心小体構成因子を特異的に認識する抗体は既に用意済みであり、細胞周期を同調させたヒト培養細胞を用いて各ステージにおける中心小体構成因子の微小空間における局在、量、因子間の距離を測定する。また、**PCM** のサイズ、形状に関しても適切な抗体やラベリングを用いて同様に観察を行う。特に、抗体で認識されるシグナルの量、形などはイメージプロセッシングにより定量化し、構築過程における各因子の相関に関しても統計的に検討する。特に、

1-1) 中心小体形成部位が一箇所に決定される局面での各因子の動態

1-2) 中心小体形成初期・カートホイール構造の構築過程とその必要性

1-3) 中心小体間の結合と分裂期における **PCM** の形成と拡大

に関して集中的に観察を行い、各構築段階における各因子の詳細な局在をマッピングすることで、中心小体/中心体形成の分子モデル構築を行った。

4. 研究成果

1. カートホイール構造の中心小体構築における役割の解明

ヒト培養細胞である **U2OS** 細胞において内在の **PIK4**、**STIL**、**HsSAS-6** の細胞周期依存的な細胞内局在、特に 娘中心小体形成過程での詳細な局在を観察した。この三因子は中心小体形成に必須の進化的に保存された因子であり、各々単独の過剰発現で娘中心小体を同時に複数形成できる限られた因子である。娘中心小体形成過程の全てにおいて、この3因子は局在を共にしていた。最初に、母中心小体壁上に約 **100 nm** 幅のドット上に3因子は共局在し、興味深いことに、細胞周期が **G1** 期から **S** 期に進行すると、ドット状から縦方向に伸長していく様子が観察された。これまでの電子顕微鏡の観察などから、これはカートホイール構造が幾つかの層として積み上げられ、娘中心小体の基底部を形成する過程を現していると推測される。次に、カートホイール構造の役割を明確にすることを目的に、**AID** 法を用いて、内在 **HsSAS-6** を短時間でタンパク分解により除去できる **HCT116** 細胞株の作製を行った。この細胞株においては、植物ホルモンであるオーキシンを添加することにより、細胞質に存在する **HsSAS-6** は **30** 分程度、中心小体に局在する **HsSAS-6** は **3-6** 時間程度で分解することが確認された。**G1** 期から **HsSAS-6** を分裂期にいたるまで分解し続けると、予想どおり、娘中心小体の形成は完全に阻害された。一方、**S** 期中期に一過的にオーキシンを添加した場合においては、娘中心小体は形成され、次の細胞周期におい

でも微小管形成中心として機能した。これら一連の結果は、カートホイール構造が娘中心小体形成初期には重要であるが、形成途中から前駆体の安定性には必要でないことを示している。細胞周期の中心小体形成過程におけるカートホイール構造の役割を明確に示した初めての知見である (Yoshida S. et al, 論文投稿準備中)。

2. 進化的に保存された新規分子 Cep295 の同定

中心小体は進化的に保存されていることから、中心小体を構成する因子や仕組みについても保存されていることが推察されます。この考えに基づいてバイオインフォマティクスを駆使した解析により、これまでにハエの Ana1 が中心小体形成に重要であることが示唆されていますが、その詳細の機能やヒトを含む脊椎動物でのホモログは知られていないことを見出しました。そこでまず、Ana1 のアミノ酸配列から二次構造を予測し、1つ1つの二次構造情報をもとに Blast によって解析し、他種に存在するホモログの候補を選定しました。さらに、それらの相同性を比較検討することで進化上非常に保存された領域を見出しました。この結果により、Ana1 のヒトでのホモログは Cep295 である可能性が強く示唆されたため、Cep295 の中心小体形成における機能に注目し解析を行いました。RNAi 法を用いて Cep295 をヒト培養細胞内で発現抑制し、中心小体マーカー分子の挙動を共焦点顕微鏡により観察しました。その結果、Cep295 を発現抑制した細胞では、中心小体の数が著しく減少し、単極紡錘体の形成が顕著でした。これらの結果は Cep295 が新規の中心小体形成必須因子であることを示しています。

3. Cep295 は中心小体形成経路の最上流で働き、娘から母中心小体の変換に必要

次に詳細な機能を理解するため、Cep295 の中心小体形成経路への影響を検討しました。Cep192 はこれまで、中心小体形成経路の最上流因子であり、微小管形成中心能の獲得に必須であることが広く認められていました。Cep295 を発現抑制した細胞では、Cep192 が娘中心小体に局在できず娘中心小体の成熟過程が著しく阻害される様子が観察されました。加えて、この未熟な中心小体は母中心小体としての性質、すなわち微小管形成中心としての機能や新しい娘中心小体を産み出す能力が完全に失われていることがわかりました。また超解像顕微鏡を用いて中心小体の微細な構造を観察すると、Cep295 は中心小体形成の比較的早い段階で Cep192 が局在するための足場のような構造体を形成していることが確認されました。これらの結果は Cep295 が Cep192 の上流で作用していることを強く示唆しています。

4. Cep295-Cep192 間の結合が娘中心小体の成熟に必要

Cep295 が Cep192 の娘中心小体への局在に必要であることから、Cep295-Cep192 間の物理的な相互作用を免疫沈降法によって検討しました。その結果、Cep295 は Cep192 と結合することがわかりました。様々な変異体を用いた解析から Cep295-Cep192 間の結合部位を同定し、この結合が Cep192 の娘中心小体への局在に必要であり、かつ娘中心小体から母中心小体の変換に必須であることがわかりました。

5. 未熟な中心小体は消失する

中心小体マーカーを恒常的に発現させたヒト培養細胞と高解像度のライブイメージングを用いて、母として成熟できなかった中心小体がどのような挙動を示すかを観察しました。その結果、母中心小体として成熟できなかった中心小体は時間が経過するとともに消えてしまうことがわかりました。中心小体は数十種類の

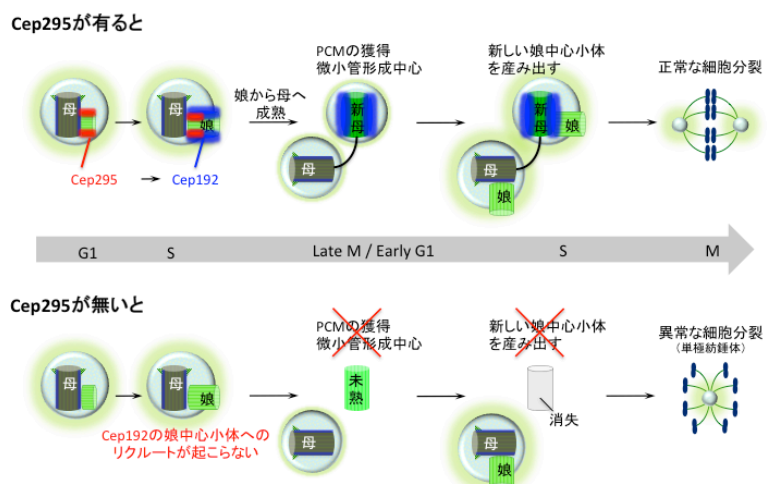


図1. 中心体形成における Cep295 機能のモデル図

タンパク質が集まって構築されていると考えられていますが、たった一つの因子がかけるとバラバラになってしまう点はこの因子が中心小体の基盤として大変重要であることを示唆しています。以上のことからCep295の役割について下記のモデルのようにまとめました。2-5の結果は国際誌であるNature Communicationsに掲載されました (Tsuchiya Y. et al (2016))。

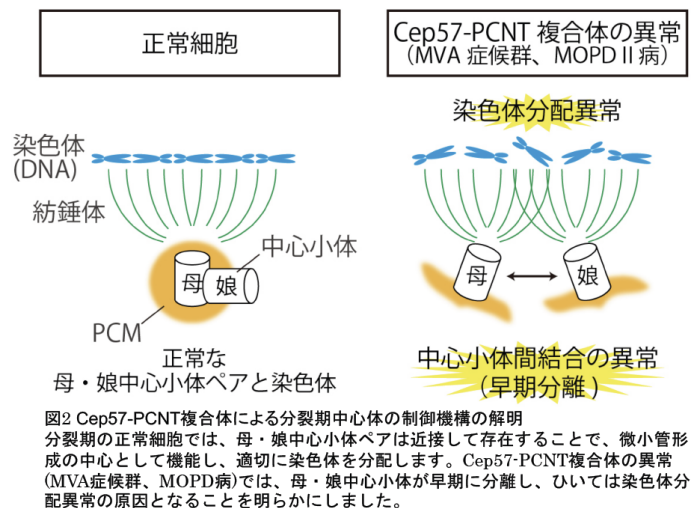
6. 母・娘中心小体間の結合を制御するCep57-PCNT複合体の同定

細胞分裂に伴い、遺伝情報を運ぶ染色体(DNA)が複製されて倍加し、娘細胞に均等に分配されることはよく知られています。このときに染色体を2方向に引っ張っているのが、微小管とよばれる繊維状の構造体であり、この微小管形成の中心として働くのが中心体です。この中心体の数や機能に異常が生じると、染色体を適切に分配できず、ゲノム不安定化に起因する癌などの疾患に繋がることが知られています。中心体の構造はその核として機能する2つの母・娘中心小体とそれを取り囲む中心体マトリクス(PCM)から構成されています。細胞分裂前に母中心小体から娘中心小体が複製されますが、形成されたばかりの娘中心小体は細胞分裂の間、母中心小体に近接して存在します。しかしながら、細胞分裂時における母・娘中心小体ペアの結合メカニズムについては未知な部分が多く残っていました。本研究では、母・娘中心小体間の結合とゲノム安定性維持に必須な中心体因子複合体(Cep57-PCNT複合体)を発見しました。Cep57、PCNTはそれぞれ多彩異数性モザイク(MVA)症候群とMOPD IIと呼ばれる難病の原因遺伝子として知られていましたが、その発症メカニズムは長らく不明なままでした。Cep57-PCNT複合体に異常が生じると、分裂期前期に母・娘中心小体が早期に分離してしまい、適切な紡錘体が形成されないために、染色体分配異常が高頻度に誘発されることを明らかにしました(図2)。

7. MVAとMOPD II変異が与える中心小体動態の表現型

さらに、Cep57、PCNTはそれぞれ多彩異数性モザイク(MVA)症候群とMOPD IIと呼ばれる難病の原因遺伝子として知られていましたが、両疾患の患者由来の細胞や遺伝子変異体を用いた詳細な解析から、

母・娘中心小体間の結合異常が両疾患の発症原因であることを明らかにしました。本研究成果は、MVA症候群および、MOPD IIの予防や治療のみならず、中心体の異常に起因する様々な病気の原因解明に役立つことが期待されます。6-7の結果は国際誌であるNature Communicationsに掲載されました (Watanabe. et al (2019))。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Gupta A, Tsuchiya Y, Ohta M, Shiratsuchi G, Kitagawa D.	4. 巻 28
2. 論文標題 NEK7 is required for G1 progression and procentriole formation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol Biol Cell.	6. 最初と最後の頁 2123-2134
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1091/mbc.E16-09-0643.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Okamoto N, Tsuchiya Y, Miya F, Tsunoda T, Yamashita K, Boroevich KA, Kato M, Saitoh S, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Kitagawa D.	4. 巻 173
2. 論文標題 A novel genetic syndrome with STARD9 mutation and abnormal spindle morphology.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Am J Med Genet A.	6. 最初と最後の頁 2690-2696
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1002/ajmg.a.38391.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okamoto N, Tsuchiya Y, Kuki I, Yamamoto T, Saitsu H, Kitagawa D, Matsumoto N.	4. 巻 5
2. 論文標題 Disturbed chromosome segregation and multipolar spindle formation in a patient with CHAMP1 mutation.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol Genet Genomic Med.	6. 最初と最後の頁 585-591
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1002/mgg3.303.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Gupta A, Kitagawa D.	4. 巻 164
2. 論文標題 Ultrastructural diversity between centrioles of eukaryotes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Biochem.	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1093/jb/mvy031.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohta M, Watanabe K, Ashikawa T, Nozaki Y, Yoshiba S, Kimura A, Kitagawa D.	4. 巻 23
2. 論文標題 Bimodal Binding of STIL to Plk4 Controls Proper Centriole Copy Number.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 3160-3169.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.celrep.2018.05.030.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchiya Y., Yoshiba S., Gupta A., Watanabe K. and Kitagawa D.	4. 巻 12567
2. 論文標題 Cep295 is a conserved scaffold protein required for generation of a bona fide mother centriole.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 12567
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/ncomms12567	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Jin M, Pomp O, Shinoda T, Toba S, Torisawa T, Furuta K, Oiwa K, Yasunaga T, Kitagawa D, Matsumura S, Miyata T, Tan TT, Reversade B, Hirotsune S.	4. 巻 7
2. 論文標題 Katanin p80, NuMA and cytoplasmic dynein cooperate to control microtubule dynamics.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 39902
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/srep39902.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Watanabe K, Takao D, Ito KK, Takahashi M, Kitagawa D.	4. 巻 10
2. 論文標題 The Cep57-pericentrin module organizes PCM expansion and centriole engagement.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 931
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1038/s41467-019-08862-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Daiju Kitagawa, Satoko Yoshiba
2. 発表標題 Crucial functions of the cartwheel structure in human procentriole formation
3. 学会等名 EMBO Centrosome meeting 2017 (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Daiju Kitagawa
2. 発表標題 A two-step model for centriole duplication
3. 学会等名 SNU-NIG meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Daiju Kitagawa
2. 発表標題 A two-step model for centriole duplication
3. 学会等名 KSBMB Network Award talk (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 北川大樹
2. 発表標題 中心小体複製の分子機構の研究
3. 学会等名 日本生化学会 (招待講演)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Daiju Kitagawa
2. 発表標題 A two-step model for centriole duplication
3. 学会等名 SNU Bio-symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 北川大樹
2. 発表標題 中心小体複製の基本原理とその理論化
3. 学会等名 高遠シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Daiju Kitagawa
2. 発表標題 lncRNAs that regulate mitotic spindle formation and chromosome segregation
3. 学会等名 Australia-Japan RNA meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shohei Yamamoto and Daiju Kitagawa
2. 発表標題 Self-organization of Plk4 regulates symmetry breaking in centriole duplication.
3. 学会等名 日本分子生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 北川大樹
2. 発表標題 Basic principles and a theory of centriole duplication
3. 学会等名 日本生化学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考