

平成 31 年 5 月 3 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18540

研究課題名(和文)ユニークな細胞分裂異常を示す温度感受性変異株における、変異遺伝子の同定と機能解明

研究課題名(英文) Identification and functional elucidation of the causative gene of the murine temperature-sensitive mutants which display unique cell-division phenotypes.

研究代表者

柏葉 脩一郎 (Kashiwaba, Shu-ichiro)

東京理科大学・基礎工学部生物工学科・助教

研究者番号：40735461

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞分裂の不備はゲノムを不安定化させ、細胞のがん化を引き起こす。しかしながら、哺乳類細胞の細胞分裂機構には不明な部分も多い。本研究では、細胞分裂に失敗するマウス温度感受性変異株の原因遺伝子を同定し、機能を明らかにすることを目指した。本研究ではtsFT50細胞とtsFT101細胞について、Diaph3の変異が温度感受性の原因であることを突き止めた。Diaph3の欠損はDiaph1やDiaph2の発現ではカバーできず、また、Diaph3のN末端側に、正常な細胞質分裂を行うために重要な領域があることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、細胞質分裂に異常を示すマウス温度感受性変異株tsFT50、及びtsFT101の原因遺伝子が、フォルミンファミリーの一つであるDiaph3であることを突き止めた。Diaph3の欠損細胞も温度感受性を示すことから、Diaph3の必要性は温度に依存することが新たにわかった。一方、Diaph3は一部のがん細胞で高発現しており、その悪性化に關与しているという報告もある。Diaph3は細胞分裂に重要な遺伝子であるが、本研究結果が示すように、その必要性をコントロールすることができれば、Diaph3を標的とした安全ながん治療が可能になることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：Failures in cell-division lead to genomic instability and tumorigenesis. However, the mechanism of the cell-division in mammalian cells is still not fully understood. In this study, we aimed to identify and elucidate the function of the causative gene of the murine temperature-sensitive mutants which display unique cell-division phenotypes. We identified Diaph3 as the causative gene of tsFT50 and tsFT101. Both Diaph1 and Diaph2 failed to rescue the defect of Diaph3. Furthermore, we revealed that N-terminal region of Diaph3 is required for accurate cytokinesis.

研究分野：分子生物学、細胞生物学

キーワード：細胞分裂 細胞質分裂 温度感受性変異

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、DNA の複製や修復のエラー等によって引き起こされるゲノムの不安定化が、細胞の癌化の原因となることが明らかとされつつある。これまでの癌研究により、がんの治療や早期発見法などについては一定の進歩が見られているものの、がんは未だ日本人の死因の第一位にあり、より効果的な治療法の開発が望まれており、そのためには、細胞が癌化に至るプロセスをより詳細に理解する必要がある。他方、細胞分裂における染色体分配や細胞質分裂などのエラーもゲノムの不安定化を引き起こすことが知られており、その結果生じる染色体数の異常や倍数化は細胞の癌化に加え、ダウン症に代表される染色体異常の原因となる。細胞分裂研究は、主に、酵母をはじめとするモデル生物を用いた研究により進展した。一方で、生物種や細胞種によって細胞分裂の機構に差異が存在することも明らかとなり、特に哺乳類細胞では遺伝学的手法の確立が遅れたことも影響し、その機構については不明な部分が多く残されている。これまでに複数のグループが、ゲノムワイドな RNA 干渉によるヒトの細胞分裂に必須な遺伝子の網羅的探索を行った。これらの報告は哺乳類の細胞分裂に関する多くの情報を与えたが、同定された新規遺伝子には、その後の解析報告が無いものが多く、また、別の新規細胞分裂遺伝子が次々と同定されるなど、哺乳類における細胞分裂機構の全体像は未だ掴めていないというのが現状であった。

マウス FM3A 細胞由来 tsFT50、tsFT74、tsFT101 細胞は、変異遺伝子が未同定の温度感受性変異株であり、いずれも許容温度である 32 °C では正常に分裂するものの、制限温度の 39 °C では細胞分裂に異常をきたして多核化し、やがて死滅する。tsFT50 と tsFT101 は中央紡錘体の局在異常を示し、tsFT74 は染色体と微小管の局在異常がそれぞれ観察される。また、特に tsFT74、tsFT101 が示すユニークな表現型からは、これらが未知の細胞分裂関連遺伝子に変異を持つ可能性が期待され、これら変異遺伝子の同定と機能の解明は、哺乳類の細胞分裂機構の一端を明らかにするものであると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、高温温度下においてユニークな細胞分裂異常を示すマウス温度感受性変異株 tsFT50、tsFT74、tsFT101 細胞に着目し、温度感受性を示す原因遺伝子を同定して、それら遺伝子の機能を明らかとすることで、哺乳類における細胞分裂機構の理解に貢献することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究ではまず、tsFT50、tsFT74、tsFT101、そして親株である FM3A 細胞に対して次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を行い、変異が導入された遺伝子を網羅的に同定した。その後、変異が見つかった遺伝子の正常型を強制発現することで、温度感受性から回復するかどうかを評価し、温度感受性の原因遺伝子の同定を試みた。温度感受性から回復させることができた遺伝子については、欠損変異タンパク質を発現させて表現型を解析するなど、細胞分裂における機能の解析を行った。

4. 研究成果

tsFT50 細胞と tsFT101 細胞

細胞質分裂に異常を示す tsFT50、tsFT101 細胞については、エクソーム解析の結果から、両者で共通して変異が入っていた Diaph3 遺伝子に着目し、これら細胞に強制発現させたところ、いずれの細胞においても、温度感受性の表現型が消失した。

アクチンの重合に関するフォルミンファミリーの一つである Diaph3 は、tsFT101 細胞において 1 アミノ酸置換の変異が両アリルで同定されたが、tsFT50 細胞においてはナンセンス変異が両アリルに導入されていた。そこで、親株である FM3A 細胞に対し、CRISPR/Cas9 により Diaph3 をノックアウトしたところ、この細胞も温度感受性を示したことから、マウス FM3A 細胞においては、Diaph3 を欠損することにより、細胞が温度感受性を示すことが明らかとなった。この結果から、tsFT101 細胞で発現する 1 アミノ酸の変異型 Diaph3 は温度とは関係なく機能を欠損している可能性が考えられた。そこで、この部分タンパク質を大腸菌で発現、精製し、酵素活性を調べることを試みた。大腸菌を用いた発現系では、GST、His タグ等の様々な精製条件を検討したが、いずれもカラムから溶出せず、精製タンパク質を得ることが出来なかった。そこで、哺乳類細胞を用いた全長型タンパク質の発現系に変更することにより、精製タンパク質を得ることが出来たが、収量が少なく、解析に用いる量のタンパク質を得るに至らなかった。

tsFT101 細胞では、Diaph3 の FH2 ドメインと呼ばれる、アクチン重合に重要な領域に変異が入っていた。そこで、同じ FH2 ドメインを持つ、Diaph3 と構造の良く似た Diaph1、Diaph2 を tsFT101 細胞に強制発現させたところ、いずれも温度感受性からは回復しなかった。そのため、細胞質分裂においては、Diaph3 特異的な寄与が存在することがわかった。

また、Diaph3 の部分欠損タンパク質を発現させ、温度感受性からの回復に重要な部位を探索したところ、特に N 末端領域が重要であることがわかった。

Diaph3 のノックアウト細胞を用いて更に解析を進めたところ、Diaph3 ノックアウト細胞では、高温培養時において、低温培養時と比較して、Aurora B キナーゼのスピンデルミッドゾーンへの集積が減少する傾向が見られた。

以上の結果より、マウス FM3A 細胞において、Diaph3 は高温培養時特異的に Aurora B キナーゼのスピンドルミッドゾーンへの集積に関与し、細胞質分裂に関与することが示唆された。

tsFT74 細胞

tsFT74 細胞については、タイムラプス解析を行うことで、染色体分配の過程で異常が生じることが明らかとなった。エクソーム解析の結果、染色体分配への関与が既知の遺伝子のいくつかに変異が見つかったため、そのうち、10 種類程度について正常型の遺伝子を tsFT74 細胞に導入したが、いずれも温度感受性からの回復は認められなかった。

本研究の過程で、tsFT74 細胞については、培養を続けることにより、自然に温度感受性から回復する復帰突然変異体が発見することがわかった。そこで、取得した復帰突然変異体 2 クローンについてもエクソーム解析を行い、新たに導入された変異を探索したが、予想より多くの遺伝子に新たな変異が見つかり、また、両者に共通した変異遺伝子も同定されなかった。

そこで、tsFT74 は何らかの遺伝子の上流領域に変異が入り、転写レベルの異常が生じたことで温度感受性を示す可能性を考え、RNA-seq により遺伝子の発現レベルを網羅的に解析し、親株である FM3A と比較した。しかしながら、目立った遺伝子の発現変動は認められず、結局、tsFT74 が温度感受性を示す原因遺伝子の同定には至らなかった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

Goto Shunya, Takahashi Masashi, Yasutsune Narumi, Inayama Sumiki, Kato Dai, Fukuoka Masashi, Kashiwaba Shu-ichiro, Murakami Yasufumi
Identification of GA-Binding Protein Transcription Factor Alpha Subunit (GABPA) as a Novel Bookmarking Factor
International Journal of Molecular Sciences (2019) 20(5),1093

[学会発表](計 12 件)

Masutani C, Kashiwaba S, Kanao R, Kusumoto-Matsuo R, Hanaoka F, Masuda Y
USP7 suppresses H2O2-induced mutagenesis by regulating PCNA ubiquitination in human cells
Gordon Research Conference, Mutagenesis 2016 年 Girona, Spain
Kanao R, Kashiwaba S, Masuda Y, Kusumoto-Matsuo R, Hanaoka F, Masutani C
Suppression of PCNA ubiquitination and oxidative stress-induced mutagenesis by USP7
The 10th 3R (Replication, Recombination and Repair) symposium 2016 年 松江
益谷央豪, 金尾 梨絵, 柏葉 脩一郎, 松尾(楠本) 理加, 増田 雄司
PCNA の翻訳後修飾の可逆的な制御による突然変異抑制機構の解析
日本放射線影響学会第 59 回大会 2016 年 横浜
第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 横浜
後藤 峻也, 中里 浩章, 高橋 将史, 安恒 徳美, 藪崎 名保恵, 柏葉 脩一郎, 村上 康文
GABPA は早期 G1 期における転写の再活性化を促進する
中里 浩章, 後藤 峻也, 高橋 将史, 安恒 徳美, 加藤 大, 柏葉 脩一郎, 村上 康文
SP1 は GABPA と協調的に早期 G1 期における転 再活性化を促進し、分裂期における細胞周期進行に関与している
第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 横浜
高橋 将史, 後藤 峻也, 中里 浩章, 安恒 徳美, 藪崎 名保恵, 柏葉 脩一郎, 村上 康文
早期 G1 期遺伝子上流領域に存在するユニークな DNA 配列の機能解析
第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 横浜
益谷 央豪, 柏葉 脩一郎, 金尾 梨絵, 楠本 理加, 花岡 文雄, 増田 雄司
USP7 は PCNA のユビキチン化を制御して酸化的 DNA 損傷による突然変異を抑制する
第 34 回染色体ワークショップ/第 15 回核ダイナミクス研究会 2017 年 木更津
後藤 峻也, 高橋 将史, 安恒 徳美, 稲山 純生, 柏葉 脩一郎, 村上 康文
GABPA とヒストンアセチル化は早期 G1 期遺伝子に対して Bookmarking 因子として機能する
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 神戸
高橋 将史, 後藤 峻也, 安恒 徳美, 稲山 純生, 柏葉 脩一郎, 村上 康文
Bookmarking 候補転写因子の分裂期クロマチンへの結合能の評価
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 神戸
浅尾 麻由, 遠山 一文, 木戸 まい子, 助乗 崇紘, 加藤 大, 柏葉 脩一郎, 村上 康文
損傷乗り越え複製における hINO80 および UCH37 の機能解析
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 神戸
小林 真子, 古矢 裕梨, 山崎 萌香, 山根 小幸, 加藤 大, 柏葉 脩一郎, 村上 康文
大腸がんで高発現する膜タンパク質 S3 の機能解析
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 2017 年 神戸
石井 沙耶香, 柏葉 脩一郎, 村上 康文
マウス温度感受性変異株 tsFT50 細胞の温度感受性を示す原因遺伝子の同定

