

令和 2 年 7 月 13 日現在

機関番号：82601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14706

研究課題名(和文) 中心小体の複製開始メカニズム -無秩序な分子の集合から構造体の構築へ

研究課題名(英文) Molecular mechanism of the initiation of centriole duplication

研究代表者

吉場 聡子 (Yoshiba, Satoko)

国立医薬品食品衛生研究所・生化学部・主任研究官

研究者番号：70642213

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)：中心小体は、動物細胞の細胞分裂における、正常な染色体分配に必須の細胞小器官であり、細胞周期に同調して一細胞周期に一度、既存の一中心小体に対して一つだけ複製される。中心小体複製は、PLK4、STIL、SAS-6の3つのタンパク質が一箇所の複製起点に集まることで開始する。本研究では、最も初期に中心小体に局在し、自己リン酸化の制御を介して自己組織化するPLK4に、STILとSAS-6がどのように作用して複合体を形成し、中心小体の形成を開始するのか、そのメカニズムを明らかにしようとした。これらのタンパク質の相互作用や分子的性質についての解析を行い、結果として、今後の研究につながる新しい知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、動物細胞において進化的に保存された細胞小器官である、中心小体の複製開始のしくみを分子的に明らかにしようとした。細胞内において、無秩序な分子の集合が、どのようにして秩序を持つ構造体の形成につながるのかは、細胞生物学における重要な問題の一つであるが、本研究において中心小体をモデルとして、問題提起および今後につながる研究ができたことは、広く基礎生物学研究において学術的意義があったと考える。

研究成果の概要(英文)：In the cell cycle, a single daughter centriole is formed next to the pre-existing centriole. The key questions that I addressed in this study are how PLK4, STIL and SAS-6 sequentially localize to the mother centriole and form a complex to initiate the formation of a new centriole. In this study I tried to understand the molecular mechanism how STIL and SAS-6 load to the PLK4 condensate, which self-assembles under the control of its auto-phosphorylation. By analyzing the interactions and molecular properties of these proteins, I obtained several new findings, which would provide a basis for the future research in this field.

研究分野：細胞生物学

キーワード：中心小体複製 PLK4 STIL SAS-6

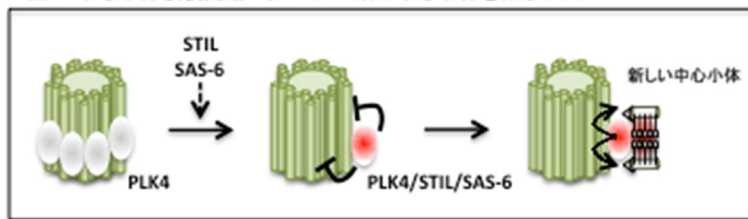
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

中心小体は、動物細胞において微小管形成中心として働く細胞小器官であり、9本の三連微小管を対称に配した、直径~100nmの微小構造体である。中心小体は細胞周期に同調して一細胞周期に一度、既存の中心小体に対して1つだけ複製が行われる。中心小体の数を正確に制御するためには、複製の起点となる場所を制限するしくみが必要であり、この制御に関わる重要な因子として、PLK4, STIL, SAS-6の3つの分子が注目されている。

本研究代表者の所属研究室では、PLK4の基質としてSTILを同定し、STILのリン酸化により中心小体の形を決める分子SAS-6が形成開始位置にリクルートされること、またこれら3つの分子の相互作用により、複製場所がひとつに限られることを見いだしていた(Ohta *et al*, *Nature Comm.* 2014, 図1)。さらに当時、所属研究室の研究により、PLK4が自己リン酸化を介して、液-液相転移により自己集合する生化学的性質を持つことが明らかになってきていた。この自己集合するPLK4にSTIL, SAS-6がどのように集まり、新しく作られる中心小体の数をひとつに限定する一方で、構造体としての中心小体を形成するのか、そのメカニズムを明らかにすることは、中心小体複製開始のしくみを理解する上で、非常に重要と考えられた。

図1 中心小体複製開始において1カ所で中心小体を作るしくみ



2. 研究の目的

中心小体の複製において、3つのタンパク質、PLK4, STIL, SAS-6が集合するしくみ、さらに構造体の形成開始につながるしくみを明らかにする。これらの分子が、どのように集まって構造体の形成の起点となり、一方で新しく作られる中心小体の数をひとつに限定するのか、PLK4とSTIL, STILとSAS-6の相互作用およびSTILの生化学的性質を解析し、*in vitro*の再構成を試みることで、メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

1) STILのfragment解析

PLK4は、STIL, SAS-6の局在化に先立って、複製場所周辺に局在し、自己リン酸化による解離と自己組織化の性質によって、潜在的複製開始点を作る(Yamamoto *et al*, *Nature Comm.* 2019, 図1左)。STILはPLK4の基質であり、C末STAN motif(図2上)のリン酸化によってSAS-6と結合することで、PLK4との安定な複合体形成、すなわち中心小体への局在が可能になり、複製開始点は堅固なものとなる。中心小体へのSTILとSAS-6の局在は、PLK4のリン酸化を通じた相互依存的なイベントと考えられている一方で、SAS-6に依存しないSTILの局在化の可能性も考えられていた。本研究では、auxin依存的に標的タンパク質を分解するauxin-inducible degron (AID)のシステムを利用した、SAS6-AID細胞(Yoshida, *Journal of Cell Science* 2019)を用いて、SAS-6のノックダウンとSTIL fragmentの発現を同時に行い、STILのどのドメインが局在に関与するのか調べた。また、リン酸化を阻害した時のSTIL fragmentの挙動についても観察を行った。なお本研究で用いたPLK4, STIL, SAS-6はすべてhumanである。

2) STIL/SAS-6のinteraction解析

STILとSAS-6の相互作用において、STIL側の結合ドメインやリン酸化が必要なアミノ酸が詳細に調べられているが、SAS-6については報告されていない。そこでSTILおよびSAS-6の精製タンパク質を用いた*in vitro* pull-down assayにより、SAS-6のinteraction siteの同定を行った。

3) PLK4, STIL, SAS-6の*in vitro*再構成

昆虫細胞を利用した、タンパク質の複数同時精製のシステムbiGBACの系を用いて、PLK4, STIL, SAS-6の全長タンパク質を同時精製し、*in vitro*再構成を試みた。PLK4, STIL, SAS-6がどのようにして複合体を形成するのか、クライオ顕微鏡による構造解析を行うことを目的とした。

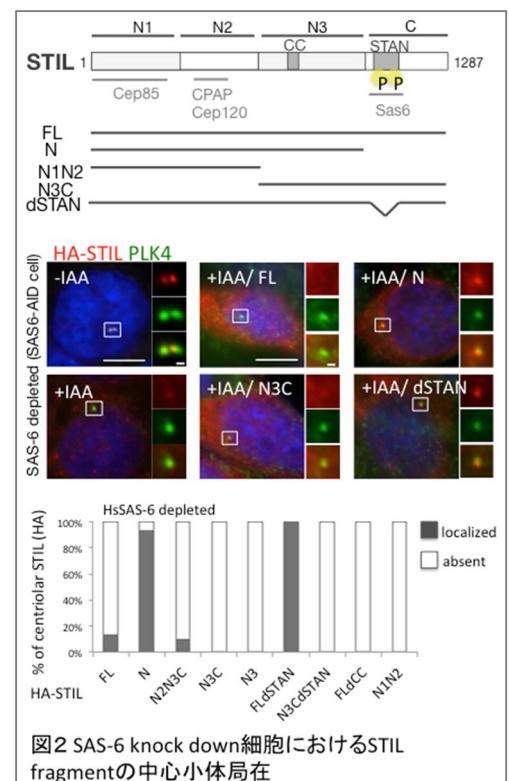


図2 SAS-6 knock down細胞におけるSTIL fragmentの中心小体局在

4. 研究成果

1) STIL の fragment 解析

SAS6-AID 細胞を用いて、SAS-6 のノックダウンと STIL fragment の発現を同時に行い、STIL のどのドメインが局在に関与するのか調べた(図2)。その結果、STIL_N と STIL_dSTAN (STAN motif 欠損)は、SAS-6 非依存的に中心小体に局在することがわかった。また、PLK4 specific kinase inhibitor, Centrione を用いて、PLK4 のリン酸化阻害と STIL fragment の発現を同時に行い、同様に局在を調べた(図3)。その結果、STIL の N 末は、PLK4 によるリン酸化非依存的に中心小体に局在することがわかった。これらより、STIL の N が SAS-6 非依存的に PLK4 と複合体を作ること、また STAN のリン酸化が複合体形成に抑制的に働くことが示唆された。さらに、非構造領域予測システム PrDOS により STIL の配列予測を行ったところ、N2,N3,C にかけて広範囲で非構造領域が見られた(図4上)一方で、タンパク質の凝集を予測する AGGRESCAN では、N1 の領域で強い凝集が予測された(図4下)。これらの結果を元に、STIL が N 領域を介して自己集合する PLK4 に取り込まれ、C 領域のリン酸化による抑制を受けながら、SAS-6 が C 領域と結合することで安定した PLK4-STIL-SAS6 複合体を形成する、という仮説モデルを提案した。今後本研究をさらに進めることで、これらの分子により中心小体複製が開始される分子メカニズムが明らかになると期待される。

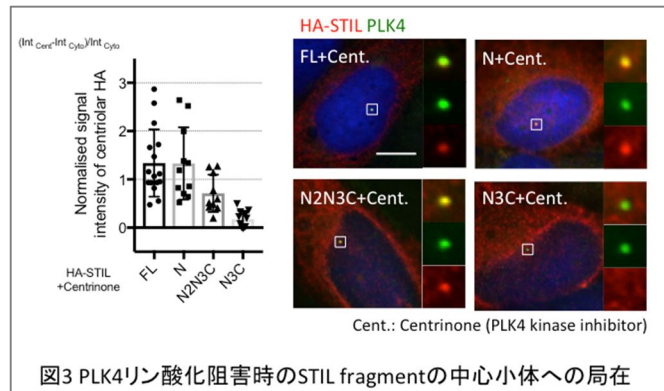
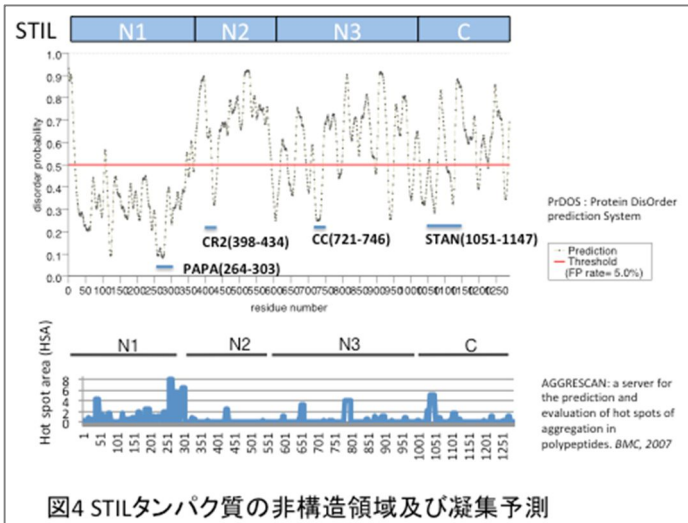


図3 PLK4リン酸化阻害時のSTIL fragmentの中心小体への局在

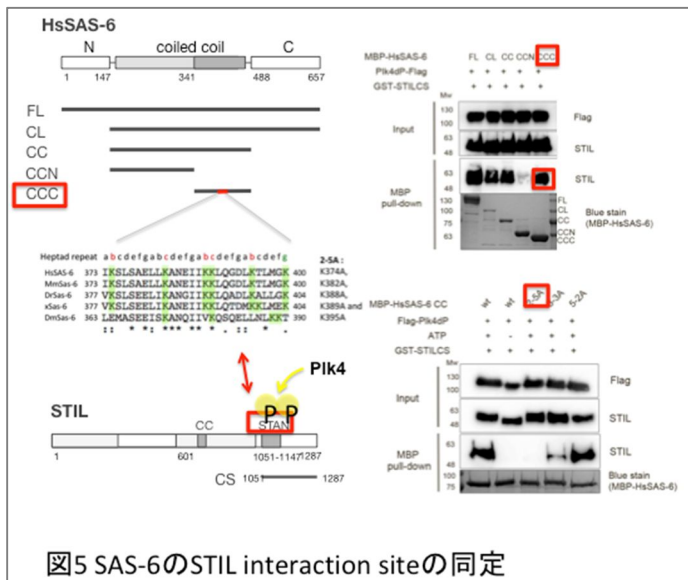
2) STIL/SAS-6 の interaction 解析

STIL 及び SAS-6 タンパク質を精製し、STIL を *in vitro* で PLK4 によりリン酸化したのち、SAS-6 fragment による pull down を行った(図5)。その結果、STIL が SAS-6 coiled-coil ドメインの C 末と結合することがわかった。さらに deletion 及び アミノ酸置換による解析を行い、STIL と SAS-6 の interaction site を同定した。今後本研究を進めていく上で、非常に有用な情報となると考えられる。



3) PLK4, STIL, SAS-6 の *in vitro* 再構成

PLK4, STIL, SAS-6 がどのようにして複合体を形成するのかについて、*in vitro* 再構成という、直接的なアプローチを試みた。昆虫細胞 Sf9 を用いて、PLK4, STIL, SAS-6 の全長タンパク質の同時精製を試みたが、個々のタンパク質は全長として精製されるものの、複合体としては精製することはできなかった。その理由として、この3つのタンパク質の複合体が不安定であること、または3つ以外の分子が複合体形成に必要であること、が考えられた。今後の再構成の戦略としては、同時精製を行うのではなく、ひとつひとつのタンパク質を精製し、1)に関連して、自己集合する PLK4 に対して、どのように STIL, SAS-6 が取り込まれるのか、精査していくことが考えられる。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ohta Midori, Watanabe Koki, Ashikawa Tomoko, Nozaki Yuka, Yoshiba Satoko, Kimura Akatsuki, Kitagawa Daiju	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 Reports	6. 最初と最後の頁 3160 ~ 3169.e4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 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 Yoshiba Satoko, Tsuchiya Yuki, Ohta Midori, Gupta Akshari, Shiratsuchi Gen, Nozaki Yuka, Ashikawa Tomoko, Fujiwara Takahiro, Natsume Toyoaki, Kanemaki Masato T., Kitagawa Daiju	4. 巻 132
2. 論文標題 HsSAS-6-dependent cartwheel assembly ensures stabilization of centriole intermediates	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 217521 ~ 217521
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.217521	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----