

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06147

研究課題名（和文）中心体複製の開始機構と個体発生におけるその破綻

研究課題名（英文）The etiological mechanism of developmental disorder derived from deregulation of centrosomal proteins

研究代表者

中村 貴紀（Nakamura, Takanori）

愛媛大学・プロテオサイエンスセンター・講師

研究者番号：30707576

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）：細胞内小器官の1つである中心体は染色体の均等分配、器官/組織形成に本質的役割を担う。このため中心体の機能的・構造的異常は発がんリスクを高めるだけでなく発育不全疾患または男性不妊症などの主要因となる。しかし中心体複製機構や繊毛形成など中心体の持つ生理機能とその制御機構に関しては未だ不明が多く、中心体の異常によって惹起されるがん、発育不全疾患、不妊症の病態機構に関しても多くが不明である。そこで本研究では中心体蛋白質の機能異常によって惹起される発育不全疾患の病態機構の解明を目指して研究を実施した。その結果 中心体蛋白質の機能異常により惹起される発育不全疾患の発症機構の一つを解明することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中心体を構成するタンパク質の機能的あるいは構造的な異常は発がんリスクを高める要因となるだけでなく、発育不全疾患あるいは男性不妊症などの主要因となる。しかし発育不全疾患は数千人に1人の低頻度で発症する希少疾患であるため、その病態機構の解明に加えて同疾患治療法の確立も現在進展していない。このため中心体の生理機能の解明は発育不全疾患の発症機構の本質的理解に資するだけでなく、疾患治療の分子マーカーあるいは創薬標的分子の創出にも繋がる可能性を秘めている。このため本研究は大きな学術的および社会的意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：Centrosomes, an intracellular organelle, play a pivotal role in mitotic spindle formation and subsequent chromosome segregation, as well as the formation of organs and tissues. The structural or functional aberration of centrosomes causes various diseases such as tumorigenesis, ciliopathy, and male infertility. However, since the molecular mechanism underlying centrosome duplication and ciliogenesis has not been fully understood, the pathological mechanism, induced by centrosomal aberration, of tumorigenesis, growth failure and male infertility, has not been also fully defined. We therefore aimed to elucidate the mechanism of how centrosomal dysfunction caused by genetic mutations drives growth failure. We then found a pathological mechanism underlying growth failure induced by missense mutation of centrosomal proteins.

研究分野：細胞生物学

キーワード：中心体蛋白質 個体発生 初期発生 発育不全 小頭症 中心体複製 がん 染色体不安定性

1. 研究開始当初の背景

中心体は母/娘中心小体と呼ばれる 2 つの微小管構造とその周囲に液-液相分離を介して集合した Precentriolar material (PCM) から構成される細胞内小器官の 1 つで、細胞分裂や繊毛形成など細胞の恒常性維持に必須となる多様な機能を持つ。例えば中心体は体細胞分裂期に双極性の紡錘体極として細胞内微小管ネットワークを制御することにより染色体の均等分配に本質的役割を担う。また母中心小体が伸長して細胞膜を隆起させることで形成される繊毛は器官 / 組織の形態および機能の制御に関わることが報告されている。このため遺伝子変異に伴う中心体の機能的あるいは構造的異常はがん、発育不全疾患、男性不妊症など多くの疾患を惹起することが報告されている。しかしその病態機構は未だ不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

発育不全疾患は胎生期の脳、視覚、聴覚、循環器 (心臓) など器官 / 臓器における発育遅延または形態異常を所見とする希少疾患の総称で、全世界で数千人に 1 人の頻度 (年間 3~7 万人) で発症する。その発症には主に環境要因と先天的要因があり、前者として薬物、タバコ、ウィルス感染が知られている。また中心体タンパク質をコードする遺伝子群に先天的な遺伝子変異が生じることで発育不全 (小頭症) が発症することが報告されている。近年のゲノム解析技術の進歩により発育不全疾患の原因となる遺伝子およびその変異箇所が徐々に解明されている。しかしその一方で生命機能の主体はタンパク質であるため、「なぜ中心体タンパク質の遺伝子変異により上記疾患が発症するのか」を紐解くタンパク質レベルでの解析情報の実施 / 整備が遅れている。そこで本研究ではこれまでの中心体複製制御機構 (Nat. Commun., 2013) および肺器官の発生制御機構 (Commun. Biol., 2019) の研究経験を生かして、発育不全の症例として臨床報告のある中心体タンパク質の遺伝子変異 (変異型タンパク質) によって惹起される発育不全疾患の発症機構を詳細に解明することを目指す。

3. 研究の方法

発育不全疾患の原因として報告されている中心体タンパク質 (野生型) およびその変異体をクローニングする。次にこれらを細胞に遺伝子導入して疾患由来の遺伝子変異によって生じるタンパク質レベルでの変化 (例: 物性変化、細胞内分布変化、構造変化など) を野生型タンパク質の結果と比較解析して発育不全疾患の発症要因を特定する。また野生型または変異型中心体タンパク質をそれぞれにモデル生物に遺伝子導入した後に経過観察することで初期発生過程における異常をきたす箇所を特定して発育不全病態の理解を深める。

4. 研究成果

(1) 発育不全疾患の根底をなす病態機構の解明

発育不全疾患（例：小頭症など）の原因となる遺伝子変異によって惹起されるタンパク質レベルでの変化と初期発生過程における影響を詳細に解析して、同疾患の病態機構の解明を目指した。まず発育不全疾患の原因となる変異型タンパク質を細胞内に導入したところ、細胞内局在および物性レベルでの変化がそれぞれ観察された。更に発育不全疾患の原因となる変異体（およびコントロールとして野生型）をゼブラフィッシュ1細胞期に遺伝子導入した。その後1~5日に渡り野生型または変異体を導入したゼブラフィッシュ仔魚の発生過程における形態学的差異を観察したところ、変異体発現仔魚では脊索歪曲や小頭症様症状が見られた。更に多光子励起顕微鏡および電子顕微鏡を用いて詳細に解析したところ発育不全疾患の発症要因となる形態異常の場所を特定することにも成功した。

(2) 液-液相分離を介して形成される動的構造体「ストレス顆粒」によるストレス環境適応とがんの悪性化機構の解明

細胞がストレス刺激に曝された際に形成されるストレス顆粒(SG)は、mRNA 保護、細胞死抑制などストレス環境適応に本質的役割を担う。同顆粒は液-液相分離を介した弱い結合によって形成される液滴構造であるため、一般的な免疫沈降と質量分析では精製過程で液滴を構成する分子複合体が崩壊してしまいその構成分子を同定することが困難だった。そこで我々は近位ビオチン標識を活用して SG 構成分子を網羅的に探索した。その結果これまでに SG との関連が全く報告されていない 100 を超える新たな SG 移行蛋白質を同定することに成功した。また上記探索で得られた実行カスパーゼの Caspase3/7 に関しては不活性状態の Pro-Caspase3/7 よりも活性化型 Caspase3/7 が SG に優先的に取り込まれること、更にその結果(ストレス顆粒が形成される)ストレス環境下では細胞死が一過的に抑制されることを明らかにした (**Current Biology** 2023)。

(3) インフラマソームを介したストレス顆粒形成の抑制機構の解明

ストレス環境への適応として(NLRP3 インフラマソームによって誘導される)細胞死の制御は恒常性の維持に必須である。一般に細胞死の調節は促進と抑制のバランスによって制御されるがその詳細な分子機構は未だ不明な点が多い。今回 NLRP3 インフラマソームを構成するウィルス RNA センサー DHX33 がストレス環境下で形成されるストレス顆粒(SG)に取り込まれることを新たに見出した。また逆に SG 形成に必要なコア蛋白質 G3BP が NLRP3 インフラマソームに取り込まれることも明らかにした。(細胞死の抑制効果のある) SG と (逆に細胞死の促進効果のある)NLRP3 インフラマソームの間の調節機構を詳細に解析した。その結果 NLRP3 インフラマソーム形成に伴う細胞内 K^+ 濃度の低下と、G3BP の同インフラマソームへの隔離が並行して起こることにより SG 形成を抑制して計画的細胞死(パイロプロシス)を誘導することを明らかにした(**The Journal of Biochem.** 2024)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshioka Daisuke, Nakamura Takanori, Kubota Yuji, Takekawa Mutsuhiro	4. 巻 mvae009
2. 論文標題 Formation of the NLRP3 inflammasome inhibits stress granule assembly by multiple mechanisms	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 mvae009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvae009	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 Daichi Fujikawa, Takanori Nakamura, Daisuke Yoshioka, Zizheng Li, Hisashi Moriizumi, Mari Taguchi, Noriko Tokai-Nishizumi, Hiroko Kozuka-Hata, Masaaki Oyama, and Mutsuhiro Takekawa	4. 巻 33
2. 論文標題 Stress granule formation inhibits stress-induced apoptosis by selectively sequestering executioner caspases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 1967-1981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2023.04.012	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 吉岡 大介、中村 貴紀、武川 睦寛	4. 巻 39
2. 論文標題 ストレス顆粒形成による生命機能制御と疾患	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 羊土社 実験医学 増刊 「相分離~メカニズムと疾患~」	6. 最初と最後の頁 93-101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山内 陽生, 中村 貴紀, 小迫 英尊, 内藤 幹彦, 澤崎 達也
2. 発表標題 慢性骨髄性白血病に対する新たな薬剤標的の探索
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村 貴紀
2. 発表標題 非膜型細胞内小器官の観点から捉える生体内恒常性の維持機構
3. 学会等名 第301回 愛媛大学 応用化学セミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡海 紀子, 中村 貴紀, 武川 睦寛
2. 発表標題 SAPKにより発現制御されているmiRNA-Xは大腸癌において癌抑制miRNAの発現を抑制する
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森泉 寿士, 中村 貴紀, 鈴木 貴, 武川 睦寛
2. 発表標題 癌抑制分子SAPKKによるDNA損傷誘導アポトーシス制御機構の解析
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takanori Nakamura , Shigeyuki Nada , Takashi Suzuki , Masato Okada
2. 発表標題 Mathematical model of mTORC1 pathway sensing intracellular amino-acids and glucose
3. 学会等名 10th International Congress on Industrial and Applied Mathematics (ICIAM2023 Tokyo) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村 貴紀
2. 発表標題 発育不全疾患の発症メカニズムの解明と神経変性疾患治療を目指した取り組み
3. 学会等名 愛媛大学PROS 第1回合同教員会議 ショートセミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村 貴紀, 西住 紀子, 河西 通, 中澤 崇, 森 竜樹, 武田 洋幸, 鈴木 貴, 武川 睦寛
2. 発表標題 中心小体輸送の分子基盤と発育不全疾患におけるその破綻
3. 学会等名 CREST 多細胞領域 第 4 回領域会議（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村 貴紀, 渡海 紀子, 中澤 崇, 森 竜樹, 鈴木 貴, 武川 睦寛
2. 発表標題 中心体複製開始における分子制御機構とがんにおけるその破綻
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡海 紀子, 中村 貴紀, 武川 睦寛
2. 発表標題 ストレス応答MAPKは転写因子リン酸化依存的にmiR-Xの発現を抑制する
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村 貴紀
2. 発表標題 非膜型オルガネラを介した生体内恒常性の制御： その破綻に伴う癌および発育不全疾患の発症機構
3. 学会等名 愛媛大学プロテオサイエンスセンターPROSセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村貴紀, 名田茂之, 鈴木貴, 岡田雅人
2. 発表標題 mTORC1経路
3. 学会等名 2022年度数理腫瘍学年末研究会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村 貴紀, 渡海 紀子, 中澤 崇, 森 竜樹, 鈴木 貴, 武川 睦寛
2. 発表標題 数理解析手法を駆使した「中心体複製開始機構とその破綻によって惹起される発癌機構」の解明
3. 学会等名 第80回 日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡海 紀子, 中村 貴紀, 武川 睦寛
2. 発表標題 SAPKにより制御されているmiRNA-Xは大腸癌のアポトーシスを抑制する
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森泉寿士、中村貴紀、曹永旻、河西通、武田洋幸、鈴木貴、武川睦寛
2. 発表標題 細胞の生き死にを決定するアナログ-デジタル変換システムの解明
3. 学会等名 第73回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田 碧, 中村 貴紀, 小迫 英尊, 武川 睦寛
2. 発表標題 「APEX2を用いた近位ピオチン標識法と質量分析を活用した熱刺激誘導性液-液相分離顆粒コアタンパク質の探索」
3. 学会等名 第72回日本電気泳動学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田 碧, 中村 貴紀, 小迫 英尊, 武川 睦寛
2. 発表標題 熱ショック誘導性ストレス顆粒形成を担う新規コアタンパク質の同定
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

researchmap 中村 貴紀 https://researchmap.jp/NakamuraTakanori 東京大学 医科学研究所 分子シグナル制御分野 ホームページ https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/dcsmm/DCSMM/index.html 愛媛大学 プロテオサイエンスセンター https://www.pros.ehime-u.ac.jp/departments/ 愛媛大学 プロテオサイエンスセンター 無細胞生命科学部門 ホームページ https://www.pros.ehime-u.ac.jp/cell-free/

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------