

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32511

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590087

研究課題名(和文) 中心体複製ライセンス機構におけるセパレーズおよびその基質蛋白質の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of separase and its novel substrate in the licensing of centrosome duplication

研究代表者

高橋 美樹子 (TAKAHASHI, Mikiko)

帝京平成大学・薬学部・教授

研究者番号：90324938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：中心体は分裂期に双極紡錘体を形成して染色体の均等分配に重要な役割を果たす。そのために中心体の複製は細胞周期につき1回だけ、細胞分裂を経た後に開始できるというライセンス制御が想定されている。その分子機構は未解明であり、染色体分離に関わるタンパク質分解酵素セパレーズが必要であることは知られていたがその基質も不明であった。本研究によって、中心体タンパク質kendrinが中心体におけるセパレーズの重要な新規基質であり、分裂期におけるkendrinの限定分解とそれによる中心体からの解離が、次の中心体複製開始すなわちライセンス機構に必要であることを世界で初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Centrosome assembles the bipolar spindle during mitosis to ensure the equal segregation of replicated chromosomes. It is thereby assumed that the licensing mechanism tightly regulates the initiation of centrosome duplication only once per cell cycle, though precise process remains largely unknown. Separase, a cysteine protease that triggers sister chromatid separation, is known to be involved in this licensing, however, its centrosomal substrate remains unidentified. In this study, we found that the centrosomal protein kendrin is cleaved by separase at a consensus site. Moreover, expression of a non-cleavable kendrin mutant suppresses the initiation of centrosome duplication. Our finding provides the first evidence that kendrin is a novel and crucial substrate for separase at the centrosome involved in the licensing of centrosome duplication.

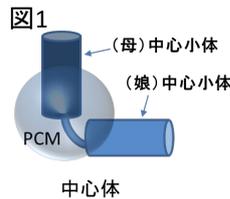
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

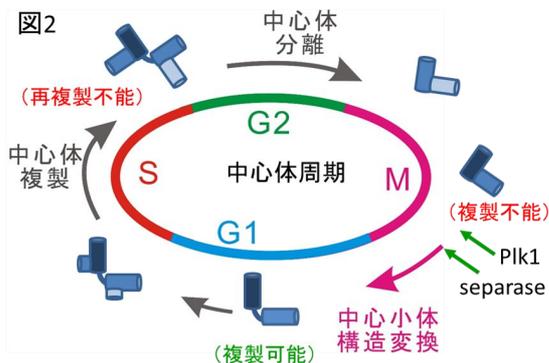
キーワード：中心体 細胞周期 中心体複製 分裂期 セパレーズ

1. 研究開始当初の背景

中心体は1対の中心小体とそれを取り囲む中心体周辺物質(PCM)からなり(図1)、動物細胞における主たる微小管形成中心として間期には細胞内輸送等を司り、分裂期には紡錘体極として染色体分離に重要な役割を担っている。中心体数の異常は染色体不均等分配を引き起こし、がん化との関連が示唆される染色体不安定性の原因となりうる。実際に多くのがん細胞で中心体数の異常が観察されており、中心体数の制御、すなわち中心体複製の制御は生命維持に不可欠である。



中心体は、染色体複製と同時期に1回だけ複製され、2つになった中心体は分裂期に分離して双極紡錘体を形成し、娘細胞に1つずつ分配される(図2)。染色体については「細胞周期につき1回だけ複製される」という複製ライセンス機構が明らかにされつつある一方で、中心体については複製、およびそのライセンス機構の詳細は不明であった。電顕、細胞融合などによる研究から、1度複製された中心体にはその構造自体に次の複製を抑制する機構を備えていることが示唆された。その構造は母中心小体の側面から複製された娘中心小体そのまま直角に結合した構造で、細胞分裂後期まで保持される(図2、S~M期)。次いで、「中心小体構造変換」により中心小体側面の結合が解離し、中心小体同士が末端部分でタンパク質複合体によりゆるく連結された構造に変換される(図2、G1期)。この構造のみ次の複製が可能となる。即ち、1度複製された中心体は細胞分裂を経るまで次の複製が抑制されることで双極性の紡錘体形成を保障し、構造変換を経てG1に入ると次の複製が可能になる、というライセンス機構が想定されていた。

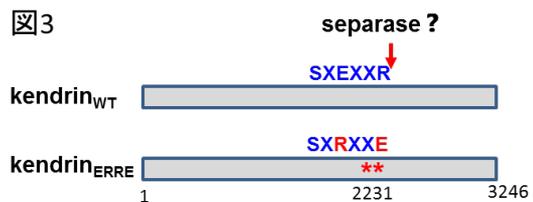


この中心小体構造変換を仲介する分子として2006年にタンパク質分解酵素 separase、次いで2009年にタンパク質リン酸化酵素 PIK1が見出され、いずれかの抑制で部分的に、また両方の抑制で完全に阻害されると報告

された。Separaseは、分裂後期直前に活性化されて姉妹染色分体のセントロメア領域をつなぐ scc1 を限定分解し、染色体分離に働くことが知られる。また PIK1 は分裂期初期から活性化される。これらのイベントは中心小体構造変換よりも早く起こるため separase や PIK1 が直接中心体に働くのか、あるいは別の分子の活性化を介するのか等、分子機構は未解明であり、またいずれの基質もまだ探索が続いていた。

2. 研究の目的

中心体タンパク質 kendrin (pericentrin) はPCM成分として代表的な巨大なタンパク質(約380kDa)で、申請者らはこれまでに kendrin が中心体からの微小管形成や、分裂期直前に2つの中心体が分離する制御に関わることを報告してきた。さらに、細胞周期における挙動を観察している過程で kendrin がユニークな変動をすることを見出した。すなわち、分裂前期に同調した細胞では1本のバンドとして検出されるのに対し、同調解除2時間後(大部分の細胞が分裂終期に入る時期)に2本のバンドとして検出され、限定分解を受けていると考えられた。欠失変異体の解析により特定された限定分解領域に、separase による切断部位のコンセンサス配列 (ExxR) を見出したので、野生型 kendrin (kendrin/WT)、およびこれを切断不能な配列 (RxxE) に変えた変異体 (kendrin/ERRE) を発現して解析を行った結果、kendrin は分裂中期以降にこの部位で限定分解されることが明らかになった(図3)。以上より kendrin が中心体における separase の基質の有力候補であると考えた。



本研究は、kendrin が中心体における separase の基質である可能性について確証を得ること、さらに kendrin の限定分解が中心小体構造変換およびその後の中心体複製に関与する可能性を検証することを目的として開始した。また中心小体構造変換が起こるメカニズムや、それがなぜ次の複製が可能になるのかという点についても検討を試みた。

3. 研究の方法

(1) kendrin が中心体における separase の基質である可能性を検証するため、培養細胞を用いて separase の発現抑制、あるいは、separase の過剰発現させた際の内在性の kendrin の限定分解への影響を検討する。また、separase の活性化と kendrin の限

定分解の経時的変化を詳細に比較する。

活性化 separase を調製し、in vitro の系で kendrin が直接切断されるか否かを検討する。

(2) kendrin の限定分解後の切断断片の挙動を細胞内局在およびタンパク質レベルで検討する。

(3) kendrin が切断される意義を調べるため、非切断型変異体(kendrin/ERRE)を細胞で発現させ、中心小体構造変換、およびそれに続く中心体複製への影響を調べる。

(4) kendrin が複製不能な中心体構造の形成に直接含まれている可能性、あるいは他の分子の活性や局在の制御を介している可能性を検討する。

(5) 逆に kendrin が次の複製開始に関与する可能性を検討する。

4. 研究成果

(1) kendrin は separase の新規基質である。

kendrin が separase の基質であるか否かを以下の方法により検討した。

複数種の siRNA を用いてヒト HeLa 細胞で separase の発現抑制を行ったところ、kendrin の限定分解が抑制され、siRNA の効果に応じた(separase の発現量が低いほど) kendrin 限定分解の抑制が観察された。

HeLa 細胞に野生型の separase を過剰発現させたところ、kendrin の限定分解が促進され、不活性型 separase (CA 変異体) の発現では影響が見られなかった。

separase は活性化されると自己分解を起こして分解バンドが出現する。そこで、HeLa 細胞を分裂前中期に同調し、解除後 30 分毎に細胞を回収して separase および kendrin のウェスタンブロットを行ったところ、1.5 時間後から両者とも分解バンドが出現した。separase の活性化と同時に kendrin の限定分解が始まっていると考えられた。

ヒト 293T 細胞で活性型あるいは不活性型の separase を発現、カエル卵 M 期抽出液による活性化処理を行い、精製活性化 separase、および不活性なコントロール separase を得た。精製した野生型 kendrin (kendrin/WT)、あるいは非切断型変異体(kendrin/ERRE)とこれらの酵素を組み合わせることで反応させたところ、活性型 separase により野生型 kendrin が限定分解され、他の組み合わせでは変化が見られなかった。これより、in vitro で、kendrin が直接 separase によりコンセンサス配列で限定分解されることが確かめられた。

以上の結果より、kendrin は、separase の新規基質であることが明らかになった。

(2) 限定分解後、kendrin の C 末端断片はすぐに分解され、N 末端断片は少し遅れて中心体から解離する。解離のタイミングは、中心小体構造変換の時期に対応する。

次に限定分解後の kendrin の 2 つの切断断片のたどる運命を調べた。

それぞれの断片を発現させた場合の細胞内局在は、N 末端側は細胞質に、中心体局在領域を含む C 末端側は中心体に局在した。

全長 kendrin を発現させて分裂後期に同調し、細胞内で限定分解を起こさせたところ、N 末端断片はウェスタンブロットで G1 期に至るまで安定に検出された。一方、C 末端断片は検出できなかった。C 末端断片の新たにできる N 末端アミノ酸は Lys であり、“N-end rule” によれば分解を受けやすいので、限定分解後 C 末端断片はすぐに分解されていると考えられた。

内性 kendrin の N 末端断片の挙動を、抗 kendrin 抗体による免疫蛍光染色で調べたところ、separase が活性化し kendrin が限定分解を受けた分裂後期においてもまだ中心体に強いシグナルが検出され、分裂終期から細胞質分裂の時期に弱くなっていた。

限定分解後も N 末端断片がしばらく中心体に残留するメカニズムとして、ホモダイマー(あるいはオリゴマー)形成により、未切断分子との結合を介している可能性が考えられた。

免疫蛍光染色の観察から、中心体の kendrin シグナルが低くなる分裂終期から細胞質分裂の時期は、中心小体構造変換の起こる時期とほぼ同じであることが分かった。

以上より、separase 活性化から遅れて中心体構造変換が起こる原因として、切断後に kendrin の中心体からの解離が遅れるためである可能性が示唆された。

(3) 非切断型変異体(kendrin/ERRE)の発現により、中心小体構造変換と中心体複製が抑制される。

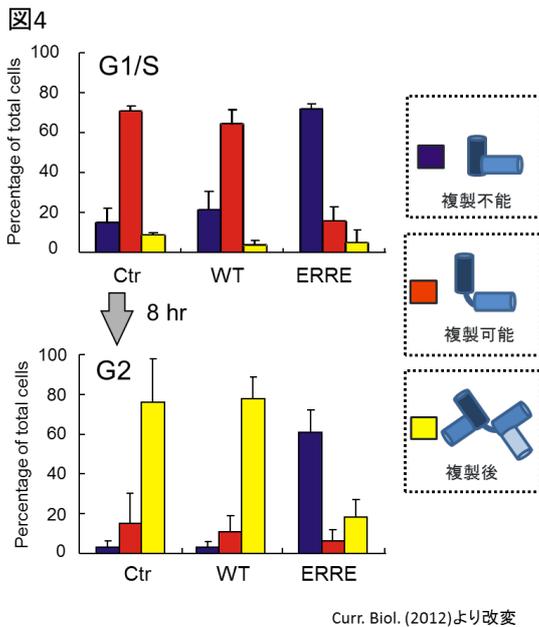
HeLa 細胞に野生型 kendrin (kendrin/WT)、あるいは非切断型変異体(kendrin/ERRE)を発現させて G1/S 期に同調し、中心体の構造を調べたところ、kendrin/ERRE 発現細胞では中心小体構造変換が抑制されていた(図 4、上)。

さらに同調を解除して 8 時間後(S~G2 期)では、kendrin/ERRE 発現細胞では中心小体構造変換が起こらず中心体複製も抑制されていた(図 4、下)。

以上より、kendrin の separase による切断と中心体からの解離は、中心小体構造変換と中心体複製に必要であることが明らかになった。

(4) kendrin の発現抑制は、分裂前中期に早期の中心小体構造変換を引き起こす。

siRNA により kendrin の発現を抑制して分裂前中期の中心体を観察したところ、中心小体同士の分離や、それによる多極紡錘体形成の頻度が上昇していた。これより、kendrin は、分裂後期までの中心体の構造維持に関わり、双極紡錘体の形成維持に寄与しているものと考えられた。



(5) kendrin は母中心小体を円筒状に取り囲んで局在する。

kendrin の中心体における局在をデコンボリューション顕微鏡により詳細に観察したところ、G1 期には中心小体を取り囲む円筒状の構造を取っていると考えられた。中心体複製後の S~G2 期にも、同様に母中心小体を取り囲むように局在していた。

(6) 中心小体構造変換を可視化する試み。

kendrin の N 末端断片の中心体からの解離は中心小体構造変換とほぼ同期すると考えられるが、それをライブイメージングによる観察で明らかにすることを目指した。kendrin や微小管、染色体については蛍光タンパク質を融合させて発現する系は確立した。中心小体構造変換のマーカーとして母中心小体の近位末端に局在する C-Nap1 が 1 つから 2 つに変わる瞬間を捉えることが適切と考え、蛍光タンパク質と融合させて発現する系を確立し、ライブイメージングを行ったところ、細胞質分裂期に変化を捉えることができた。

今後、kendrin や微小管の動きと同時に観察することにより、中心小体構造変換のメカニズム解明のヒントが得られることを期待している。

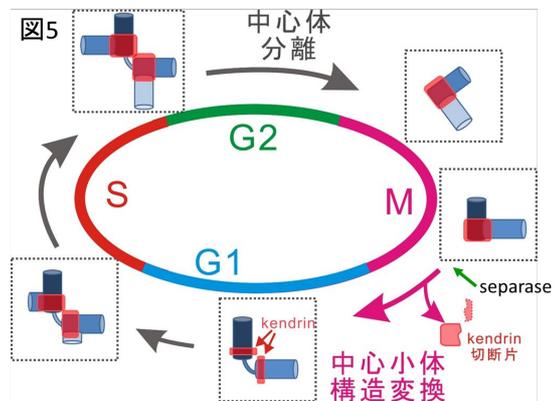
(7) 中心小体構造変換から中心体複製期における kendrin の挙動と機能解析。

kendrin の分裂中期以降におけるタンパク質量および中心体局在を詳細に調べたところ、細胞質に遊離した N 末端断片は S 期開始時までは分解され、新たに合成された全長分子が中心体に集積し始めることが分かった。kendrin は結合しているタンパク質 (PCM 成分) を細胞分裂終了時に一旦中心体から解離させ、S 期に向けてまた再局在させることで PCM

のリニューアルに働いている可能性、さらには、S 期に向けた中心体複製開始複合体の形成に関わる可能性等も考えられた。

そこで中心体複製開始に関連することが知られる複数のタンパク質についてタンパク質量および中心体局在の変動を詳細に検討したところ、S 期にむけてタンパク質量が増加し、kendrin と複合体を形成する可能性があるものを見出した。現在、この相互作用により kendrin が中心体複製開始、あるいはそれ以降の中心体過剰複製抑制に関わる可能性について検討を行っている。

以上の結果をまとめる (図 5) kendrin は G1 期終わりから S 期にかけて中心小体を円筒状に取り囲むように局在し、中心体複製を経て局在量を増加しつつ分裂中期を迎える。分裂後期進入に伴う separase の活性化により kendrin は限定分解を受け、C 末端断片はすぐ分解され、N 末端断片は少し遅れて分裂終期頃に中心体から解離する。それにより中心小体構造変換が起こり、中心体は G1 期の複製が可能な構造に戻る。



中心小体構造変換が引き起こされるメカニズムとして、kendrin が複製後の母娘中心小体を繋ぐ糊のような役割を果たし、限定分解を受けて解離することで中心小体同士の結合が解離する可能性が考えられる。あるいは、kendrin が様々な中心体タンパク質と結合する足場タンパク質として、中心小体同士の結合維持に関わる他のタンパク質を局在させる役割を果たし、kendrin の解離によりそのタンパク質も中心体から除去されることも考えられる。

本研究成果の(5)までを論文として Curr. Biol. (2012) に発表した。この論文は、post-publication review として著名な Faculty of 1000 (F1000) の "Cell Biology" と "Cancer Biology" の分野において、Score 8.0 (Must Read) と高い評価を受けた。本研究遂行中に、中心体においても染色体同様に Scc1 が separase の基質であるとの報告があったため、これに対する異議を提示し、全く

新たな発見であることが評価された。

それ以降、複数の研究室で kendrin の超解像度顕微鏡を用いた詳細な局在解析も進められ、kendrin の separase による限定分解と中心体からの解離が中心体複製ライセンスングに重要であることは認められ、それを根拠として現在も研究が進められている。

また、論文発表後、2012 年にはオランダ・ユトレヒト大学学部学生が、2013 年にはアメリカ・テネシー大学大学院生が研究計画作成課題のテーマとして kendrin と中心体複製制御を選び、問い合わせを受けた。本研究による separase の新たな基質 kendrin の発見と中心体複製制御機構の関係について、特定の研究領域の研究者のみならず生物学としての興味を惹起したものと感じた。

今後、(6) および (7) に記載した研究をさらに展開し、「separase の活性化 kendrin の限定分解と中心体からの解離 中心体構造変換 中心体複製開始 中心体過剰複製抑制」という一連の中心体複製ライセンスング機構解明の一助となること目指す所存である。

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2件)

Mikiko Takahashi and Kazuhiko Matsuo

More isn't always better: Limiting centrosome size in interphase.

Cell Cycle 2013, 12, 1482.

(News & Views 査読無)

DOI: 10.4161/cc.23879

Kazuhiko Matsuo, Keita Ohsumi, Mari Iwabuchi, Toshio Kawamata, Yoshitaka Ono, and Mikiko Takahashi

Kendrin is a novel substrate for separase involved in the licensing of centriole duplication

Curr. Biol. 2012, 22, 915-921.

(査読有)

DOI: 10.1016/j.cub.2012.03.048

[学会発表](計3件)

松尾 和彦

Functional analysis of centrosomal protein kendrin in centriole duplication.

第 86 回生化学会大会

2013 年 9 月 11 日、横浜

高橋 美樹子

Possible role of a novel substrate for separase in the licensing of centriole duplication

第 34 回分子生物学会年会シンポジウム

2011 年 12 月 16 日、横浜

松尾 和彦

中心体複製制御機構における separase の新規基質候補蛋白質の解析

第 34 回分子生物学会年会

2011 年 12 月 16 日、横浜

[その他]

ホームページ等

<http://pharm.thu.ac.jp/research/unit/bunshisaibou.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 美樹子 (TAKAHASHI, Mikiko)

帝京平成大学・薬学部・教授

研究者番号: 9 0 3 2 4 9 3 8

(2) 研究分担者

多田 周右 (TADA, Shusuke)

帝京平成大学・薬学部・教授

研究者番号: 0 0 2 1 6 9 7 0

向井 秀幸 (MUKAI, Hideyuki)

神戸大学・バイオシグナル研究センター・准教授

研究者番号: 8 0 2 5 2 7 5 8

(平成 25 年度より)

(3) 連携研究者

松尾 和彦 (MATSUO, Kazuhiko)

帝京平成大学・薬学部・助教

研究者番号: 7 0 5 9 9 7 5 3