

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460376

研究課題名(和文) 神経幹細胞における新規中心体制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of novel centrosome regulation in human NSC

研究代表者

石垣 靖人 (ISHIGAKI, Yasuhito)

金沢医科大学・総合医学研究所・教授

研究者番号：20232275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：RNA結合因子のY14は、EJCと呼ばれる複合体の一員で、mRNAの分解や輸送に必要な因子と考えられてきた。しかし、同時に細胞分裂装置である中心体へ局在し染色体の正確な分配にも関与することが明らかになってきた。EJC構成因子全てが複合体を形成して中心体へ局在するのか、それとも一部が移動するのか、あるいはmRNAを伴って局在するのか否かといった詳細については未だに明らかにされていない。また、Y14はリン酸化制御を受けることが報告されてきたが、具体的に細胞内で修飾される部位や、リン酸化の生物学的な意義は明らかにされてきていない。以上の点について培養細胞を用いた解析を行った。

研究成果の概要(英文)：Y14-Magoh complex is a component of the exon junction complex (EJC) required for mRNA metabolism. However, the detailed status and mechanism of the phosphorylation of Y14 is poorly understood. We analyzed in detail Y14 phosphorylation in human cells. Phos-tag gels revealed that the majority of endogenous Y14 was phosphorylated throughout the cell-cycle progression. Nuclear and cytoplasmic Y14 and Y14 in the EJC was also found to be mostly phosphorylated. We also screened the phosphorylated serine by mutational analysis using Phos-tag gels to reveal modifications of serine residues 166 and 168. A single substitution at position 168 that concomitantly abolished the phosphorylation of serine 166 suggested the priority of kinase reaction between these sites. Furthermore, analysis of the role of the binding protein Magoh in Y14 phosphorylation revealed its inhibitory effect in vitro and in vivo.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Y14 中心体 リン酸化 PhosTagゲル

1. 研究開始当初の背景

ヒト第1番染色体 1p32.3 領域の欠失は重篤な精神遅滞と脳の発達低下を引き起こすことが知られてきた (Multani et al., 2008 など)。この領域には RNA 結合タンパク質として報告されていた Magoh 遺伝子が、他の約 30 遺伝子と共にマップされており脳の発達への関与が推測されてきた。2010 年に Silver らはマウス小頭症の原因遺伝子のひとつとして Magoh を同定し、その発現低下や変異が小頭症を引き起こすことを報告した。Magoh 変異体では神経幹細胞から中間神経前駆細胞の増殖に異常をきたし、組織全体が縮小した像が認められる。このため、Magoh が遺伝子の発現を調節して細胞を増殖させると考えられてきた。マウスでは、Magoh が滑脳症原因遺伝子 LIS1 を発現させて、2 次的に細胞増殖を進めるモデルが提唱されてきた。一方で Magoh は別の RNA 結合タンパク質 Y14 とヘテロ二量体を形成して mRNA に結合する (Kataoka et al., 2000 等)。この複合体は、mRNA のスプライシングや輸送、分解などに働くと考えられており、翻訳前の mRNA 上に存在することを報告してきた (研究代表者ら, 2001 など)。

上記で述べたような LIS1 発現調節を中心とした神経細胞の増殖モデルでは Magoh と LIS1 が同一のパスウェイにあることを前提としている。しかし、両者を欠損した病態は、それぞれ小頭症と滑脳症であり一致しない。このため Magoh は LIS1 を介して分裂を制御するだけでなく、別のメカニズムで関与することが予想される。

研究代表者らは、細胞内で Magoh と Y14 が中心体および収縮環へ局在し、中心体成熟にかかわる可能性を独自に明らかにしてきた。また、それぞれのノックダウンは細胞周期を速やかに M 期で停止させた。さらに、Y14 の複数のセリンが高率にリン酸化修飾を受けていることを明らかにした (当時未発表)。

以上の実験結果より、申請者は神経幹細胞増殖における Magoh-Y14 の機能として、中心体成長における直接的な関与を想定するに至った。Magoh に変異のある神経幹細胞は中心体機能に異常を来すために、増殖・分化できず小頭症に至ると考えられる。

この仮説を証明するために、Magoh-Y14 複合体の中心体での役割とリン酸化修飾の意義を分子レベルで解き明かし、これまでに報告されていない新しい M 期進行機構を明らかにすることを研究の目的とする。

2. 研究の目的

中心体における Magoh-Y14 の役割を解き明

かし、新しい細胞周期進行モデルを提出することを目的として、以下の点について実験を行い未知の分裂機構を明らかにする。

- (1) ヒト細胞増殖における Magoh と Y14 の役割を明らかにするために、それぞれの因子を細胞から除去した際に増殖や中心体に与える効果を明らかにする。
- (2) Magoh と Y14 が結合する中心体構成因子を明らかにする。また、様々な機能ドメインを欠損させた変異体を作製して発現させ、中心体への局在や中心体因子との相互作用に必要なドメインを確定する。
- (3) 中心体制御に必要なリン酸化部位とリン酸化の役割を変異体発現系により明らかにする。さらに局在に必要なリン酸化を行うキナーゼ分子を明らかにする。

3. 研究の方法

ヒト培養細胞を用いて siRNA による Magoh と Y14 のノックダウン実験を行い、細胞への影響を解析する。

細胞周期進行は BrdU 法と組み合わせたフローサイトメーターにより経時的に解析する。さらに染色体標本作製し、Mitotic index および染色体安定性について解析する。

ダブルチミジンブロック法により細胞周期を G₁/S 期に集積してから細胞周期進行をリリースさせることによって、G₂/M 期進行を特異的に解析する。

中心体成熟への役割を形態学的に解析するため、免疫染色と共焦点レーザー顕微鏡および電子顕微鏡を組み合わせ、中心体の成熟に対するノックダウンの効果を解析する。

タグ連結した Y14 遺伝子のセリン部位に変異を導入した発現ベクターを用意する。細胞への導入後、タンパク質がリン酸化を受けると泳動度が極端に遅くなる PhosTag ゲルを利用してリン酸化の検出を行った。

RNAi ライブラリーを利用してキナーゼのスクリーニングを行う。ヒトにおいては約 700 種類のキナーゼ遺伝子が同定されているが、既に阻害剤実験によりファミリーが絞り込まれているために、速やかに分子を特定できると考えている。

4. 研究成果

ヒト細胞増殖における Magoh と Y14 の役割を明らかにするために、それぞれの因子を細胞から除去した際に増殖や中心体に与える効果を明らかにすることを試みた結果、この 2 つの因子は細胞の増殖に必須であり、ノック

アウトは様々な細胞においてアポトーシスを引き起こすことを観察してきた。細胞周期の解析から、ノックダウン細胞ではM期の集積が起こることが明らかとなった。この結果はY14がM期の進行に必要であり、細胞周期進行停止がアポトーシスを誘導したと考えられた。そこで、中心体を解析したところノックダウン細胞で中心体数に異常が起きていることが明らかとなった。すなわちY14は中心体の成熟に関わる因子であることを明らかにできた。さらに、Y14の中心体への局在を免疫染色によって解析したところ、Y14およびMagohは中心体へ局在していることを明らかにできた。中心体ではPLKファミリー分子との近接も見いだすことができたが、直接的な相互作用の検出には至らなかった。

さらにY14分子のリン酸化修飾について検討を行った。リン酸化部位の変異体を多数作製して解析を行ってきた。方法としては、PhosTagゲルを活用してリン酸化の検出を行った。従来のアイソトープの取り込みを利用した解析手法と比較しても、簡便であり、なおかつ修飾を受けたタンパク質の割合をウエスタンブロットで検出できる点でも優れた手法であった。その結果、細胞内においてはRBM8A分子の大部分がリン酸化修飾を受けていること、リン酸化部位は166および168番目のセリンであること、166のリン酸化には168のリン酸化が必要であること等が明らかになった。さらに、試験管内リン酸化系を構築し、結合因子のMagohがリン酸化に阻害的に働くことを明らかにしてきた。以上の実験結果は、RBM8Aはタンパク質として合成された直後にリン酸化修飾を受け、その後Magohと複合体を形成して核内へ移行することを示唆すると考えられる。さらに、リン酸化を受けるセリンをアラニンに変えた変異体を細胞内に発現させて局在を観察したところ、中心体への局在が観察されたことから、リン酸化は中心体局在のシグナルとはならないことが示唆された。この過程で、これまで細胞質にのみ存在すると言われてきたUpf2が、核内にも存在することが明らかとなった。この結果は、EJCと、その結合因子が従来のモデルとは異なるスキームで相互作用しうると示唆する。

リン酸化を行うキナーゼ群の同定を試みたが、単一遺伝子のノックダウンでは同定することができなかった。また、様々な阻害剤による阻害実験でも、Y14のリン酸化を抑制することはできなかった。このため、複数のキナーゼがお互いに補完しあいながらY14をリン酸化していると考えられる。

今後はプロテオミクスなどを活用しながら探索を続けたいと考えている。

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4件)

1. Tatsuno T, Nakamura Y, Ma S, Tomosugi N, Ishigaki Y; Nonsense-mediated mRNA decay factor Upf2 exists in both the nucleoplasm and the cytoplasm. **Mol Med Rep.**, 査読有, 14: 655-660(2016)
2. Ishigaki Y, Nakamura Y, Tatsuno T, Ma S, Tomosugi N: RNA-binding protein 8A and its inhibitory regulation by Magoh. **Exp Biol Med.**, 査読有, 240:438-445 (2015)
3. Ishigaki Y, Nakamura Y, Tatsuno T, Hashimoto M, Iwabuchi K, Tomosugi N: RNA binding protein RBM8A (Y14) and MAGOH localize to centrosome in human A549 cells. **Histochem Cell Biol.**, 査読有, 141:101-109 (2014)
4. Ishigaki Y, Nakamura Y, Tatsuno T, Hashimoto M, Shimasaki T, Iwabuchi K, Tomosugi N: Depletion of RNA-binding protein RBM8A (Y14) causes cell cycle deficiency and apoptosis in human cells. **Exp Biol Med.**, 査読有, 238: 889-897 (2013)

[学会発表](計5件)

1. 中心体に局在する Exon Junction Complex (EJC) 因子の解析. 辰野貴則, 中村有香, 石垣靖人: 第38回日本分子生物学会, (兵庫県神戸市, 神戸ポートアイランド, 2015.12.1)
2. Localization of RNA-binding complex EJC to centrosome. 石垣靖人, 辰野貴則, 中村有香: 第67回日本細胞生物学会大会, (東京都江戸川区, タワーホール船堀, 2015.6.30)
3. 中心体局在にする mRNA 結合因子. 辰野貴則, 中村有香, 石垣靖人: 中心体局在にする mRNA 結合因子, 第37回日本分子生物学会年会, (神奈川県横浜市, パシフィコ横浜, 2014.11.26)
4. Role of RNA binding protein in cell cycle progression and centrosome

maturation in human tumor cells. 石垣靖人, 中村有香, 辰野貴則, 橋本光正, 島崎猛夫, 岩淵邦芳, 友杉直久: 19th World Congress on Advances in Oncology & 17th International Symposium of Molecular Medicine ,(Athens, Greece , Metropolitan Hotel, 2014.10.11) .

5. 中心体局在因子RBM8Aのリン酸化制御の解析. 石垣靖人, 中村有香, 辰野貴則, 馬少福, 中川秀昭, 竹上勉, 友杉直久: 第65回日本細胞生物学大会, (愛知県名古屋市, ウィンク愛知, 2013.06.26) .

6. 研究組織

(1)研究代表者

石垣 靖人 (ISHIGAKI, Yasuhito)
金沢医科大学・総合医学研究所・教授
研究者番号: 20232275

(2)連携研究者

中村 有香 (NAKAMURA, Yuka)
金沢医科大学・総合医学研究所・助手
研究者番号: 00565632

友杉 直久 (TOMOSUGI, Naohisa)
金沢医科大学・総合医学研究所・教授
研究者番号: 80155580