

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870487

研究課題名(和文) 多次元プロテオミクスを利用した染色体分配を司る新規因子の発見とその機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of novel vertebrate chromosomal proteins with using Multi-Classifer Combinational Proteomics

研究代表者

太田 信哉 (Ohta, Shinya)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・特任助教

研究者番号：00631194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、新規の染色体タンパク質を複数同定した。そのうちCENP32、CSAPIは、正確な細胞分裂維持機能を担っていることを発表した。具体的には、CENP-32は、星状微小管を正確に伸長させ、正常なBipolarスピンドルを形成するのに必須である。また、その欠失は星状微小管の伸長に異常をきたすことで、Anastralスピンドルの形成を促すことが分かった。CSAPIは、スピンドル極周辺の微小管のうちポリグルタミン酸化修飾されたチューブリンに結合し、スピンドルを安定化させる機能を持つことが分かった。

研究成果の概要(英文)：In this study we identified CENP-32. CENP-32 appears to be required for centrosomes to integrate into a fully functional spindle that not only nucleates astral microtubules, but also is able to nucleate and bind to kinetochore and central spindle microtubules. Additional data suggest that NuMA tethers microtubules at the anastral spindle poles and that augmin is required for centrosome detachment after CENP-32 depletion, possibly due to an imbalance of forces within the spindle. Next we identified CSAP and proposed that CSAP associates with MTs around centrosomes to stabilize MTs during mitosis, ensuring proper bipolar spindle formation and maintenance.

研究分野：細胞生物学

キーワード：染色体 分裂期

1. 研究開始当初の背景

染色体を正確に複製、分配し、次世代細胞へと自身のゲノム情報を受け継ぐことは、生物にとって最も基本的な性質の一つである。その正確性は染色体上のタンパク質によって制御されており、それらの異常は染色体数異常やがん化につながる。そこで現在、既知のタンパク質の機能の解析が盛んに行われているが、どのようなタンパク質によって制御されているのか全く分かっていない染色体凝縮や分配の機構も存在する。例えば分裂期に染色体を凝縮するタンパク質としてコンデンシン複合体以外の因子の存在が近年示唆されているが、それは未だ同定されていない。あるいは正常な染色体分配のためキネトコアにおいて両端からの微小管の張力の釣り合いをいかにして感知しているのか、など明らかにすべき問題は多く存在する。そこで我々は、こうした機構にかかわる未知の制御タンパク質に迫るために、分裂期染色体の完全なタンパク質組成を決定することを目的として研究を進めた。さらに、我々は、独自のアルゴリズムである多次元プロテオミクスを開発し、この手法がこれまでの手法とは桁外れに精度の高いスクリーニング法であることを示すと同時に分裂期染色体の分配機構の一端をも見いだした。そこで本研究では、更なる機能的分裂期染色体タンパク質同定のため、上記の解析で染色体タンパク質と予測されるタンパク質の局在とそのノックダウンの表現型を確認し、癌原因遺伝子となり得る研究対象を見だし、その分裂期の機能を明らかにすることを目的として研究を進めた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、分裂期染色体の凝縮や分配機構に関わる新規のタンパク質を同定することである。そのために、これまでの多次元プロテオミクスのデータを基にした以下のスクリーニング的解析を行う。

3. 研究の方法

① 標的タンパク質をコードする ORF のクローニング

ヒト HeLa 細胞より抽出した全 mRNA から逆転写酵素とポリ T オリゴマーを用いて cDNA ライブラリーを作製した。作製された cDNA を鋳型に、標的となるそれぞれのタンパク質の ORF を PCR 反応で増幅する。増幅した ORF は Gateway システムのエントリーベクターに導入する。Gateway システムを用い、それを GFP との融合タンパク質で発現するためのベクターに簡便に組み換えた。

② 標的タンパク質の分裂期細胞内での局在の観察

標的タンパク質を GFP との融合タンパク質の形で発現するプラスミドを HeLa 細胞に導入し、24 時間後、0.1% の TritonX100 で洗

浄後 4% のパラホルムアルデヒドで固定化した。固定化した細胞は DAPI によって染色体を染色した後に蛍光顕微鏡で観察した。ヒトホモログのないニワトリ特異的なタンパク質の局在を見る場合は、作製した GFP 融合タンパク質発現プラスミドを DT40 細胞に導入し、24 時間後に同様の方法でその局在を観察した。

③ 既知の染色体タンパク質を標識にした共局在の確認

実際に分裂期の染色体に局在を示すタンパク質に関し、セントロメアへの局在を示す CENP-C、染色体表面上への局在を示す Ki-67 などに対する抗体を用いた間接蛍光法とともに GFP の共局在を調べることで、その結果を確認した。

④ RNAi による、興味深い局在を示すタンパク質のノックダウンの表現型解析

上記の実験で、実際に分裂期の染色体に局在を示した新規染色体タンパク質について、発現抑制が引き起こす分裂期染色体の挙動の変化を観察した。そのために、一つの標的タンパク質に対しそのタンパク質をノックダウンする複数の種類の siRNA オリゴを設計、作製し、それぞれを個々に HeLa 細胞に導入し、それぞれが引き起こす染色体の異常を各種抗体を用いた蛍光染色法で観察した。

⑤ ノックダウン細胞の分裂期プロファイリング

ノックダウンにより分裂前期、前中期、中期、後期そして末期とどの期間で分裂期の進行が止まっているのかを調べた。そのために、siRNA 導入後、48 時間あるいは 60 時間後の細胞に、CENP-C 抗体と α チューブリン抗体を用いた間接蛍光法と DAPI 染色を施し、蛍光顕微鏡で観察した。この観察により調べた分裂期のプロファイリングから、他の既知の染色体タンパク質との関係を考察した。また、本実験にライブセルイメージングの技術を導入することで、分裂期の進行と得られる表現型との関係をより詳細に調べた。

4. 研究成果

① CNEP-32 の発見とその機能解析

CENP-32 は分裂期のスピンドルに局在するタンパク質で、その欠失は、中心体のスピンドルからの離脱を促すことが分かった。また、中心体離脱後のスピンドルが染色体整列の機能を有していることから、研究代表者はこれを Anastral スピンドルとし、その形成と維持の機構を調べることにした。

第一に、CENP-32 の欠失細胞においてスピンドルからの中心体離脱後に、中心体あるいは中心体周辺に局在するタンパク質がどのように振る舞うのか、 γ -Tubulin,

Pericentrin, CDK5RAP2, AuroraA, NuMA, CG-NAPなどを認識する抗体を用いた免疫染色で観察した。その結果、離脱した中心体にはCG-NAPとNuMAが局在しないことを見出した。しかし、NuMAに関しては中心体が離脱したスピンドル極には正常に局在していた。これらの事実は、CENP-32の欠失細胞では中心体の成熟に異常が起こっていることと、中心体が離脱してもNuMAの作用でスピンドルがその極を維持することを示している。実際にCENP-32とNuMAを同時に欠失させると、機能的なAnastralスピンドルは形成されなくなる。加えて、中心体のスピンドル極からの離脱は、Augmin依存的に引き起こされることも明らかにした。また、透過型電子顕微鏡を用いたCENP-32の欠失細胞の分裂期中心体の構造観察より、星状微小管が著しく短くなることと、冷却処理を用いた微小管脱重合後の再伸長実験より、CENP-32の非存在下では星状微小管の成長が阻害されていることが示された。

以上の事実から、CENP-32は星状微小管を正確に伸長させ、正常なBipolarスピンドルを形成するのに必須である。また、その欠失は星状微小管の伸長に異常をきたすことで、Anastralスピンドルの形成を促すことが分かった。

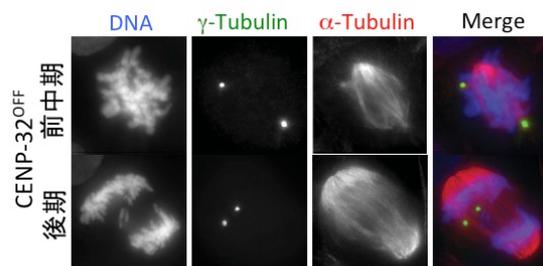


図1 CENP32のノックダウンは中心体(γ-Tubulin)のスピンドル(α-Tubulin)からの離脱を促す。

② CSAPの発見とその機能解析

CENP-32同様に、未知タンパク質Clorf96も、多次元プロテオミクスから分裂期における機能が示唆された。そこでその局在を調べたところ、Clorf96は中心体への局在を示した。実際に、最近別グループからこのタンパク質がCentriole, Cilia And Spindle-Associated Protein CCSAP/CSAPとして発表された。研究代表者は、この事実に加えて、その過剰発現によりスピンドル極が3つ以上形成されるmulti-polar表現系を示すことを見入だした。また、g-Tubulinによる免疫染色を施すことで、形成されたスピンドル極に中心体が存在するか調べたところ、~55%のスピンドル極が中心体非依存的に形成されていることが示唆された。また、コールドトリートメントやノコダゾール処理により、スピンドル微小管の脱重合を促したところ、CSAPが結合した領域の微小管のみが脱重合を阻害されていることが明らかに

なった。これらの事実から、CSAPは中心体周辺の星状微小管に結合し、スピンドルを安定化させる作用を持つことが示唆された。また、CSAPの結合した領域にはNuMAやAuroraAなどの中心体周辺タンパク質もリクルートされることを確認しており、その作用が擬似スピンドル極の形成を促していると考えられた。さらに、CSAPの欠失はNuMAをはじめとする中心体周辺タンパク質の局在異常を引き起こすことを明らかにした。CSAPは翻訳後修飾のひとつであるGlutamylationされたTubulinに結合することが示されており、それらはスピンドル極周辺に局在する。したがって、CSAPはGlutamylationされたスピンドル極周辺の微小管に結合し、安定化させる機能を持つことが示唆された。

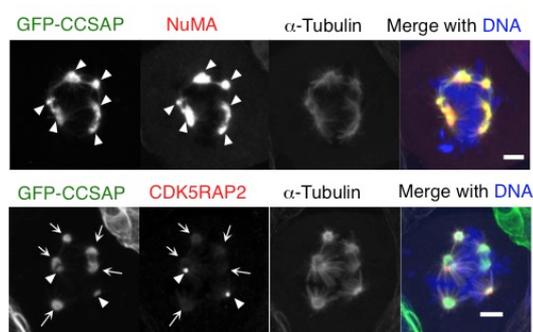


図2 過剰発現されたCSAPはスピンドルにNuMAをリクルートし(上図矢尻)、中心体非依存的なスピンドル極の形成を促す(下図矢印)。

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 3件)

- ① Laura Wood, Daniel G. Booth, Giulia Vargiu, Shinya Ohta, Flavia deLima Alves, Kumiko Samejima, Tatsuo Fukagawa, Juri Rappsilber, and William C Earnshaw
Auxin/AID versus conventional knockouts: Distinguishing the roles of CENP-T/W in mitotic kinetochore assembly and stability
Open Biology, 6(1): rsob150230, 2016, 査読有.
doi: 10.1098/rsob.150230.
- ② *Shinya Ohta, Mayako Hamada, Nobuko Sato, Iyo Toramoto
Polyglutamylated tubulin binding protein Clorf96/CSAP is involved in microtubule stabilization in mitotic spindles
PLoS ONE, 10(11): e0142798, 2015, 査読有.
doi: 10.1371/journal.pone.0142798
***責任著者**

- ③ ***Shinya Ohta**, Laura Wood, Iyo Toramoto, Ken-Ichi Yagyū, Tatsuo Fukagawa, and William C. Earnshaw
CENP-32 is required to maintain centrosomal dominance in bipolar spindle assembly
Molecular Biology of the Cell, 26(7): 1225-1237, 2015, 査読有.
doi: 10.1091/mbc.E14-09-1366
*責任著者

[学会発表] (計 8 件)

- ① **太田 信哉**
In silico co-fractionation を用いた分裂期染色体上のタンパク質相互作用解析
第13回日本プロテオーム学会2015年会、シンポジウム「エピゲノム、プロテオゲノム」、熊本市、くまもと森都心プラザ、2015年7月23日～24日
- ② **太田 信哉**
プロテオミクスによる分裂期クロマチン制御構造の解析
第32回染色体ワークショップ、第13回核ダイナミクス研究会、広島県、安芸グランドホテル、2014年12月12日～14日
- ③ **太田 信哉**, 高木 俊輔, 木村 迪子, 石濱 泰
分裂期染色体上におけるタンパク質リン酸化の網羅的解析
第37回日本分子生物学会年会、横浜市、パシフィコ横浜、2014年11月25日～27日
- ④ **太田 信哉**, Luis Fernando Montaña, Laura Wood, Itaru, Samejima, Flavia de Lima Alves, Juri Rapsilber, William C Earnshaw
多次元プロテオミクスによる分裂期染色体の制御構造解析
第64回日本染色体学会年会、富山市、富山大学、2013年11月8日～10日
- ⑤ **太田 信哉**, Laura Wood, Juri Rapsilber, William C. Earnshaw
プロテオミクスと遺伝学の融合による分裂期染色体の制御構造解析
第85回日本遺伝学会年会、横浜市、慶応義塾、2013年9月19日～21日
- ⑥ **太田 信哉**
多次元プロテオミクスを用いた分裂期染色体構造の解析
第2回 JHUP0 サテライトシンポジウム、松山市、愛媛大学、2013年6月7日
- ⑦ **Shinya Ohta**, Laura Wood, Jimi-Carlo Bukowski-Wills, Itaru Samejima Luis Fernando Montano, Juri Rapsilber and

William C. Earnshaw
Defining the structure of mitotic chromosomes using multi-classifier combinatorial proteomics together with DT40 genetics
12th Human Proteome Organisation World Congress
2013年 横浜市 パシフィコ横浜

- ⑧ Itaru Samejima, Flavia de Lima Alves, **Shinya Ohta**, Juri Rapsilber, Tatsuo Fukagawa and William C Earnshaw
Proteomics study of vertebrate mitotic chromosomes.
Gordon Research Conference - chromosome dynamics
2013年 5月26日～31日 ルッカ イタリア

[図書] (計 0 件)

該当なし

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

名該当なし

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

[その他]
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 信哉 (OHTA, Shinya)
高知大学・研究教育部医療学系基礎医学部門・特任助教
研究者番号: 00631194

(2) 研究分担者

該当なし