

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893039

研究課題名(和文) SAPK新規標的分子の中心体複製抑制機構及びPLK4の中心体移行機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms that maintain centrosome integrity by SAPK and mechanisms that regulate PLK4 localization to centrosomes.

研究代表者

中村 貴紀(Nakamura, Takanori)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：30707576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：中心体は細胞分裂期において紡錘体極として働く事により染色体の均等分配に本質的な役割を担っている。正常細胞では細胞周期1回につき一度だけ中心体複製が起こる様に厳密に制御されている。しかし癌細胞ではストレス刺激により中心体数の異常が容易に引き起こされるが、その分子機構は不明であった。我々は2つのストレス応答経路であるp38/JNK経路およびp53経路が協調的にPLK4を介した中心体複製を制御することを見出した。更に中心体複製を抑制する際のSAPK標的分子の特定にも成功した。またPLK4の中心体移行機構の解明も行っており、PLK4の中心体輸送に関わる分子を複数同定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Centrosomes function as bipolar mitotic spindles, which are essential to chromosomal equal segregation. Centrosome biogenesis is control by PLK4 and centrosome duplication is tightly regulated to once per cell cycle in normal cells. In contrast, centrosome number is often increased after various stresses in cancer cells. The molecular mechanisms underlying centrosome overduplication process, however, had remained obscure. Recently we reported that the two major stress responsive SAPK pathway and p53 pathway cooperatively PLK4 kinase activity and PLK4-driven centrosome duplication under stress. Moreover, we identify the novel substrate of SAPK in centrosome duplication arrest.

We also identify several proteins, which regulate PLK4 localization to centrosomes.

研究分野：分子生物学

キーワード：SAPK PLK4 p38 JNK 中心体 p53 染色体安定性

## 1. 研究開始当初の背景

中心体は、細胞分裂時における双極性の紡錘体形成と染色体の均等分配に本質的な役割を果たしている。中心体複製は、DNA 損傷等のストレス環境下では停止するが、その分子機構は不明である。

また中心体複製の開始には Polo-like kinase 4 (PLK4)が必須であることが知られているが、中心体複製に関わる分子メカニズムに関しては不明である。さらに PLK4 が中心体へ輸送される分子機構に関しても不明な点が多く残されている。

## 2. 研究の目的

近年我々はストレス応答 MAPK(SAPK)と p53 経路が協調的に中心体複製を制御することにより、染色体安定性の保持に関わることを見出した。そこで本研究は、この研究を発展させ、SAPK がストレス環境下において中心体複製を抑制する分子機構の解明を目指す。

また中心体複製の鍵分子である PLK4 と特異的に結合する分子を明らかにすることにより、PLK4 の中心体移行機構を明らかにすることも目指す。

## 3. 研究の方法

### (1)中心体過剰複製の抑制に関わる SAPK の標的分子の同定

ストレス環境下において SAPK(p38/JNK)が中心体過剰複製を抑制する際に標的とする分子の同定を行う。そこで SAPK によってリン酸化される分子をスクリーニングにより探索する。このスクリーニングにより得られた候補分子が実際に SAPK によってリン酸化されるかキナーゼアッセイにより確認した後、リン酸化部位の特定を行う。

次に SAPK 標的分子のリン酸化部位を Asp (D)または Glu (E)に置換したリン酸化模倣型変異体を作製し、標的分子のリン酸化模倣型変異体では中心体複製が抑制されるか検証する。

### (2)PLK4 の中心体移行メカニズムの解明

PLK4 の中心体輸送に関わる蛋白質を質量分析により同定し、PLK4 の中心体移行メカニズムを明らかにする。

まず PLK4 分子と特異的に結合する分子を網羅的に質量分析により同定する。得られた PLK4 輸送関連蛋白質の候補分子を siRNA によりノックダウンした場合に PLK4 の中心体移行が消失するか検証することにより、PLK4 の中心体輸送に関わる分子を特定する。

## 4. 研究成果

### (1)中心体過剰複製の抑制に関わる SAPK の標的分子の同定

微小管重合中心として働く中心体は、細胞分裂期において紡錘体極として機能することにより染色体の均等分配に本質的な役割を担っている。このため正常細胞では中心体複製は細胞周期を通して1度だけ起こる様に厳密に制御されることにより中心体数が保持されている。一方多くの癌細胞では中心体数の保持機構が破綻しており、ストレス刺激等により容易に中心体数の異常が惹起されることが知られている。しかしこれまでその分子メカニズムに関して不明な点が多く残されていた。

今回我々は、ストレス環境にตอบสนองして活性化される2つの細胞内シグナル伝達システム、即ちストレス応答 MAPK (SAPK : p38 および JNK)経路と p53 経路が、協調して中心体複製を調節しており、ストレス環境下における中心体複製制御と染色体安定性の保持に重要な役割を果たしていることを見出した (*Nature Commun.*, 2013)。p53 は PLK4 の発現量を抑制することによりストレス環境下における PLK4 を介した中心体複製を阻害することを明らかにした。一方、SAPK にも PLK4 を介した中心体複製を抑制する作用があった。しかしこの際 SAPK は PLK4 分子のキナーゼ活性を阻害することはできなかった。このため我々は SAPK が中心体複製を抑制する際に SAPK が標的とする分子の同定を試みた。その結果、中心体局在蛋白質の1つが SAPK によって直接リン酸化されることを見出した。またこの新規 SAPK 標的分子が SAPK によってリン酸化されるリン酸化部位の特定にも成功した。更に SAPK 標的分子がリン酸化される生理学的意義についても検証を行い、リン酸化部位を Asp (D)または Glu (E)に置換した変異体では中心体複製を抑制する知見も得られつつある。

### (2)PLK4 の中心体移行メカニズムの解明

中心体は2つの中心小体とその周囲を覆う Pericentriolar matrix (PCM)から構成されている。中心体複製の際に PLK4 は中心小体の複製を担っていることが知られている。PLK4 は中心体蛋白質の SAS 6 や STIL などと相互作用することにより中心小体複製に必須の車輪構造と呼ばれる複製の基底を構築する。このように PLK4 が中心小体複製において非常に重要な分子であることにも関わらず、中心体複製における PLK4 の活性制御機構および PLK4 の中心体複製における標的分子に関しては不明のままである。これまでに我々は PLK4 がストレス環境下で活性化される分子メカニズムを解明することに成功した (*Nature Commun.*, 2013)。

また PLK4 がどのようにして中心体へと輸送されるのか、その分子機構に関しても未だに多くの不明な点が残されている。

我々は、PLK4 の機能解析を行う過程において、PLK4 の中心体移行領域を特定するこ

とに成功した。また我々は、PLK4 と特異的に結合する分子の探索を質量分析により行い、複数の候補分子を得ることに成功した。更に得られた候補分子を siRNA によって遺伝子欠損させた場合に PLK4 の中心体移行が低下または消失するか検証した。その結果 PLK4 の中心体輸送に関わることが予想されるいくつかの候補分子を同定することに成功した。

現在これらの PLK4 中心体輸送に関わる候補分子と PLK4 との相互作用や結合部位の特定を行っており、PLK4 の中心体移行機構が分子レベルで明らかになりつつある。

#### 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)

Kenji Ichikawa, Yuji Kubota,  
Takanori Nakamura, Jane S. Weng,  
Taichiro Tomida, Haruo Saito and  
Mutsuhiro Takekawa.

MCRIP1, an ERK substrate,  
mediates ERK-induced gene  
silencing during  
epithelial-mesenchymal transition by  
regulating the co-repressor CtBP.

**Molecular Cell** 58: 35-46 (2015)  
doi:10.1016/j.molcel.2015.01.023

(査読有)

Takanori Nakamura, Haruo Saito and  
Mutsuhiro Takekawa

SAPK pathways and p53 cooperatively  
regulate PLK4 activity and centrosome  
integrity under stress. **Nature Commun.**

4:1775|DOI:10.1038/ncomms2752 (2013)

(査読有)

[学会発表](計4件)

中村 貴紀、武川 睦寛

癌抑制遺伝子MKK4とp53による中心体数  
および染色体安定性の保持機構と癌にお  
けるその破綻

2015年4月10日 第52回日本臨床分子医

学会 みやこめっせ(京都)  
(**学術奨励賞受賞**)

中村 貴紀、武川 睦寛

PLK4, p53及びSAPK経路を介したストレ  
ス環境下における中心体数の保持機構

2013年12月3日 第36回日本分子生物学  
会 神戸ポートアイランド  
(ポスター発表)

Takanori Nakamura and Mutsuhiro

Takekawa

Centrosome integrity under stress is  
maintained by a network of PLK4, p53 and  
SAPK pathways.

2013年10月4日 第72回日本癌学会 パ  
シフィコ横浜  
(口頭発表)

Takanori Nakamura and Mutsuhiro

Takekawa

Centrosome integrity under stress is  
maintained by a network of PLK4, p53 and  
SAPK pathways.

2013年6月20日  
第65回日本細胞生物学会 ウィンクあい  
ち(名古屋)  
シンポジウム(**招待講演**)

[図書](計0件)

[産業財産権]  
出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/dcsmm/DCSMM/ronbun-J.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 貴紀 (NAKAMURA, Takanori)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：30707576

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：