

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440111

研究課題名(和文) 中心体局在がスイッチとなる新規細胞増殖制御機構の解明

研究課題名(英文) Research on the novel mechanism for cell cycle progression through centriolar localization

研究代表者

猪子 誠人 (Inoko, Akihito)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍医化学部・主任研究員

研究者番号：30393127

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)：最近報告者は、細胞間接着の鍵となる蛋白質Albatross (InokoらJCB2008)が、増殖時の中心小体複製と紡錘体形成、飢餓時の一次線毛形成の全てに寄与する示唆を得た。本研究では、この中心体Albatrossによる細胞増殖寄与の分子基盤が、中心小体複製の主要な蛋白質との結合、紡錘体形成の主要な分裂期キナーゼとの結合、にあることを明らかにした。以上のことからAlbatrossは中心体の微小管動態を統合する初めての蛋白質である。Albatrossは増殖と分化のbi-playerなのである。

合わせて中心体連結として細胞周期制御に寄与するRootletin線維の非染色可視化にも成功した。

研究成果の概要(英文)：Recently, we got a suggestion that our protein Albatross, that regulates cell-cell adhesion (Inoko et al. JCB2008), also contributes to all centriolar dynamics: centriole duplication, spindle formation and primary cilia formation. In this study, we clarified that the molecular basis of cell cycle progression by Albatross is its binding to (1) key players for centriole duplication and (2) key kinases for spindle formation. Taken together, Albatross is the first protein that integrates centrosomal microtubule dynamics. Thus, Albatross is the bi-player for both cell proliferation and cell differentiation.

Also, we succeeded in naive imaging of the Rootletin fiber which contributes to cell cycle regulation as a centrosome connection.

研究分野：細胞生物学

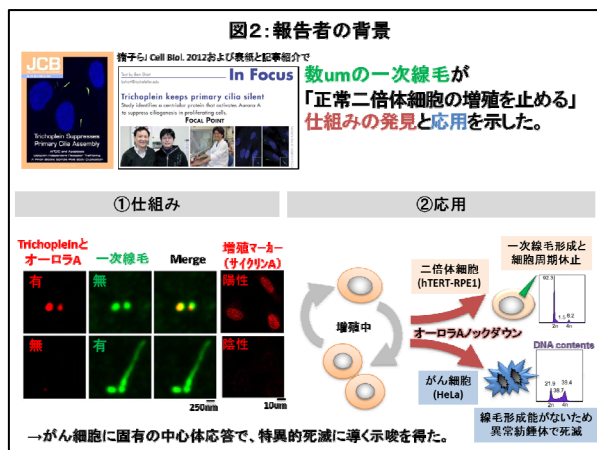
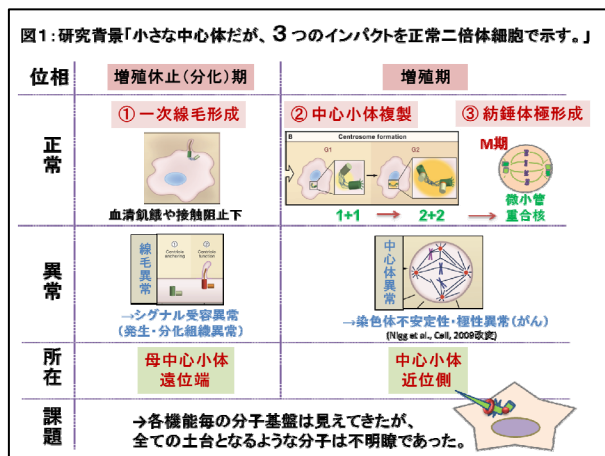
キーワード：細胞周期制御 中心体複製 中心小体 一次線毛 紡錘体 線毛根 第二次高調波

1. 研究開始当初の背景

中心小体およびこれを含む中心体は、1μmほどの小さな細胞内構造であるが、特徴的な動態変化として一次線毛形成、中心小体複製、紡錘体極形成という3つのインパクトを示す(図1)。これらに付随する分化・細胞増殖は細胞の重要現象であると同時に、がん化の標的でもある。特にがんでは一次線毛形成能の欠失や中心体数の異常がみられる。このように小さい作用点で大きい現象効果を生む中心体構造には、医学介入の標的としての期待も高まる。一方で、その小ささゆえに困難な解析は、最近の高～超解像顕微鏡やオミックス解析技術の総合進歩による克服を待つ必要があった。

私どものこの領域での先行成果は、小さな一次線毛の形成制御が細胞周期に与えるインパクトをTrichoplein-オーロラA分裂期キナーゼ分子経路と共に発見したことである(図2, Inokoら JCB2012, 猪子ら化学と生物2013)。

最近、Trichoplein 類似蛋白質であるAlbatross の中心体局在が Trichoplein とは全く違う仕組みで細胞増殖のスイッチとなることを示す結果を得た。中心体のAlbatross の局在が細胞周期進行のスイッチとなっている可能性がある。



2. 研究の目的

本研究の第一目的は、この中心体Albatross による細胞増殖制御機構の分子基盤の詳細な解析である。また、類縁となる分子群も含め解析補完を進める。その本質的意義は、細胞周期制御と上皮分化制御を統合する新しいタイプの分子群の分子基盤の解明にある。

3. 研究の方法

本研究では申請者が同定したAlbatross の予備実験により見出された、「中心体を拠点とする新しい細胞増殖制御仮説」を検証するために、以下の細胞生物学的実験を行い、細胞周期制御との分子レベルでの接点を見出す。

- (1) 中心体のAlbatross ノックダウンで正常二倍体細胞が増殖停止する分子機序を明らかにする。そのために分子マーカーでの発現量比較や in vitro の生化学結合実験によって関連分子経路を検討する。Albatross 結合分子を広く検索する。表現型となる細胞周期の時期を詳細に見る。
- (2) Albatross を含め、Distal Appendage に局在報告のある蛋白質5群を細胞周期制御機能を中心に比較する。
- (3) 類縁分子群 90～種による細胞周期制御も siRNA で検討する。

4. 研究成果

(1) Albatross の中心体機能

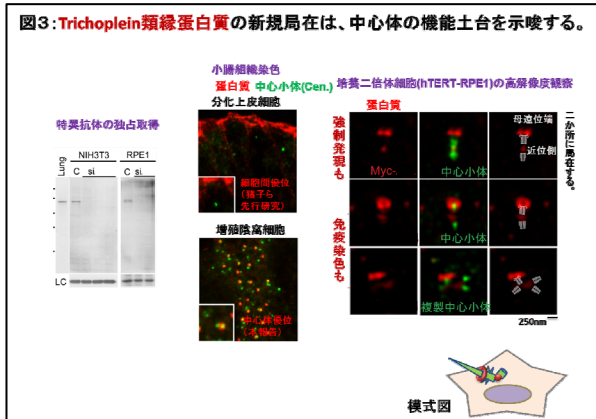
報告者が同定した trichoplein 類縁蛋白質である Albatross の中心小体内微細局在は、一次線毛形成、中心小体複製、紡錘体形成のすべての統合を示唆し、かつ機能実験によってその確証を得た(図3および以下)。

私どもが独占取得したこの蛋白質の特異抗体は、生体組織において、気管多線毛の根元にある中心小体類似構造に加え、広く複製中の中心小体に局在を示した。そのため、正常二倍体培養細胞で以下の局在・機能相関実験を追加した。まず、詳細な局在観察では中心小体の遠位端と近位端の両方へのユニークな局在特性を認めた。

ノックダウンでは血清飢餓下での一次線毛形成が阻害されたが、これは遠位端機能の障害による(Tanosら Gene&Dev2013 の先行示唆)。一方で、血清存在下のノックダウンでは新たに中心小体複製の障害が明らかとなった。マーカーを用いた局在相関確認や・生化学的結合実験からは、これが近位端に局在する中心小体構造蛋白質の局在障害と強く相関することが示された。さらに HeLa 細胞

のノックダウンでは染色体が凝集する分裂前期にも関わらず紡錘体極形成の障害が新たに見られた。こちらは近位端に局在する分裂期 kinase の障害と強い相関を認めている。そして、すべての機能障害はレスキュー実験で回復可能なことを確認した。

以上の結果は、この trichoplein 類似蛋白質が3つの特徴的な中心体動態の基盤となるこれまでにない重要分子であることと、その分子基盤の同時発見を意味しており、論文投稿に向けた細胞生物学・生化学的裏付けの最終確認中にある。

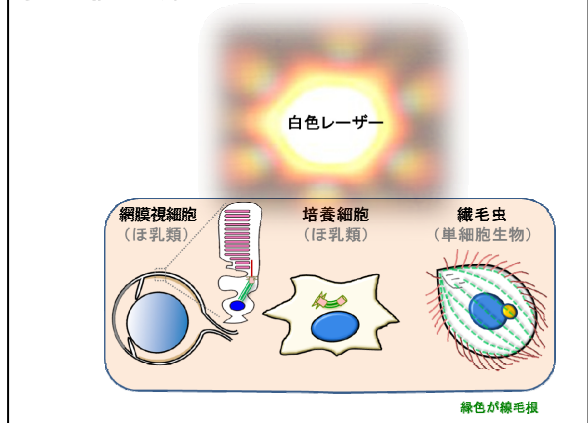


(2) 中心体を連結する Rootletin 線維すなわち「線毛根」の非染色可視化

報告者と国立大学法人筑波大学・数理物質系の加納英明准教授を中心とする共同研究グループは、白色レーザーを搭載した新しい顕微鏡を開発し、網膜内の重要構造である「線毛根」が、第二次高調波発生で標識物質なしに可視化できることを、実験的に証明した(図4)。

本技術で可視化できる「線毛根」は、実は幅広い生物の感覚に寄与することから、眼病の診断や広範な生物感覚研究への応用が期待される。トピックスである細胞力覚とがん化の関係なども見えてくるかもしれない。

図4: 白色レーザーを用いた多重分光顕微鏡で、標識なしの線毛根構造が、種を超えて可視化できることを証明した。



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 Akiyama T, Inoko A (共同第一著者兼共同責任著者), Kaji Y, Yonemura S, Kakiguchi K, Segawa H, Ishitsuka K, Yoshida M, Numata O, Leproux P, Couderc V, Oshika T, Kano H: SHG-specificity of cellular Rootletin filaments enables naïve imaging with universal conservation. *Sci. Rep.* Jan 6(7) 39967, 2017. doi:10.1038/srep39967

② Inaba H, Goto H, Kasahara K, Kumamoto K, Yonemura S, Inoko A, Yamano S, Wanibuchi H, He D, Goshima N, Kiyono T, Hirotsune S, Inagaki M: Ndel1 suppresses ciliogenesis in proliferating cells by regulating the trichoplein-Aurora A pathway. *J. Cell Biol.* 212(4) 409-423, 2016. doi:10.1083/jcb.201507046

③ Tanaka H, Goto H, Inoko A, Makihara H, Enomoto A, Horimoto K, Matsuyama M, Kurita K, Izawa I, Inagaki M. Cytokinetic failure-induced tetraploidy develops into aneuploidy, triggering skin aging in phospho-vimentin deficient mice. *J Biol Chem.* 290(21):12984-98. doi:10.1074/jbc.M114.633891.

[学会発表] (計5件)

① 猪子 誠人、加納 英明: 非標識イメージング技術のインパクトをあげる分子生物学の利活用、第69回日本細胞生物学会大会・シンポジウム口演、2017年06月13日、仙台国際センター(仙台市)

② 猪子 誠人、林 裕子、清野 透、稲垣 昌樹: Albatross/Fbf1 蛋白質は中心体動態を統合する、第68回日本細胞生物学会・第11回日本ケミカルバイオロジー学会・合同大会・ワークショップ口演、2016年06月15日、京都テルサ(京都市)

③ 猪子 誠人、林裕子、清野透、稲垣昌樹: Albatross/Fbf1 蛋白質は中心体機能に広く寄与する、第38回分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会・合同大会・一般口演、2015年12月2日、神戸ポートアイランド(神戸市)

④ Akihito Inoko, Yuko Hayashi, Masaki Inagaki: Centriolar Albatross contributes to duplication of centrioles. 第37回日本分子生物学会年会・ワークショップ口演、2014年11月25日、パシフィコ横浜(横浜市)

⑤ 猪子誠人、林裕子、清野透、稲垣昌樹：
Albatross/Fbf1 蛋白質は中心小体の複製に
寄与する、第 87 回日本生化学会大会・口演、
2014 年 10 月 18 日、国立京都国際会館（京都市）

〔その他〕

(1) ホームページ情報：

・ Researchmap 猪子誠人

<http://researchmap.jp/read0164677/>

・ 愛知県がんセンター研究所腫瘍医化学部

http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/08hatsugan_seigyo/

(2) 報道関連情報：

・ 網膜内構造の「そのまま」見える化に成功
～新しい非線形光学顕微鏡の効果を実証～

<http://www.pref.aichi.jp/soshiki/byoin-kanri/290106soumu.html>

・ 網膜内構造の「そのまま」見える化に成功
～新しい非線形光学顕微鏡の効果を実証～

<http://www.tsukuba.ac.jp/attention-research/p201701061900.html>

・ つくばサイエンスニュース：視覚生み出す
網膜の微細構造可視化—他の感覚器に応用も

<http://www.tsukuba-sci.com/?p=1406>

・ 筑波大ら、白色レーザーで標識物質を使わず
イメージング

<http://www.optronics-media.com/news/20170110/45287/>

・ 網膜内構造の「そのまま」見える化に成功
筑波大学 愛知県がんセンター研究所 研究グループ

<https://www.adcom-media.co.jp/news/2017/01/25/24906/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

猪子 誠人 (INOKO AKIHITO)

愛知県がんセンター（研究所）・腫瘍医化学部
・主任研究員

研究者番号：30393127