

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 1 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2014

課題番号：26650035

研究課題名(和文)脂質代謝産物による中心体制御機構

研究課題名(英文)Steroids regulate centriole cohesion during mitosis

研究代表者

豊島 文子 (Toyoshima, Fumiko)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号：40397576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：中心体制御における代謝産物の機能は不明である。本研究では、ステロイドホルモン前駆体であるプレグネノロン(P5)が細胞分裂期の紡錘体極に局在し、紡錘体の多極化を防ぐことを見出した。P5を細胞から除去すると、分裂期において中心小体の接着が早期に乖離し、多極分裂した。P5は、中心小体維持に必須であるsSgo1のN末端側に存在するcoiled-coilドメインに直接結合することでsSgo1を中心体に集積させることが分かった。また、P5による中心体制御機構は、複数種類のがん細胞では機能するが、正常細胞では機能しなかった。今後、P5による中心体安定化機構をターゲットとした新規がん治療戦略が期待される。

研究成果の概要(英文)：Cell division is controlled by a multitude of protein enzymes, but little is known about roles of metabolites in the mechanism. We show that pregnenolone (P5), a steroid which is produced from cholesterol by the steroidogenic enzyme Cyp11a1, has essential roles in centriole cohesion during mitosis. During prometa-metaphase, P5 is accumulated around the spindle poles. Depletion of P5 induces multipolar spindles that result from premature centriole disengagement, which are rescued by ectopic introduction of P5, but not its downstream metabolites, into the cells. Premature centriole disengagement, induced by loss of P5, is not a result of precocious activation of separase, a key factor for the centriole disengagement in anaphase. Rather, P5 directly binds to the N-terminal coiled-coil domain of short-form of shugoshin 1 (sSgo1), a protector for centriole cohesion, and recruits it to spindle poles in mitosis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：中心体 細胞分裂 ステロイド プレグネノロン

1. 研究開始当初の背景

多くのがん細胞では、正常細胞とは異なる代謝経路が亢進している。一方、がん細胞のもう一つの特徴として、中心体の不安定性が知られている。最近の研究により、がん細胞は中心体数が異常であっても二極紡錘体を形成する機構をもつこと、この機構が働かないとがん細胞は多極分裂し、結果的に細胞死することが報告された。すなわち、がん細胞は、正常細胞とは異なる中心体制御機構を持つと考えられる。しかし、がんの代謝と中心体制御の関連性についての研究は、これまで報告されていない。本研究では、がん細胞において、特定の代謝産物が分裂期の中心体を制御する機構を解明する。

2. 研究の目的

中心体を制御する様々なタンパク質が同定されているが、代謝産物の機能はこれまで研究がなされていない。我々は、ステロイドホルモン前駆体のプレグネノロンが、分裂期において中心小体の接着維持に必須であることを発見した。プレグネノロンを除去すると多極分裂が誘導され、細胞は結果的に細胞死した。さらに、この現象はがん細胞特異的であるとの予備的結果が得られた。これら結果を踏まえ、本研究では、プレグネノロンによる中心体制御機構の解明と、がん細胞と正常細胞での比較解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1)プレグネノロンの細胞周期の進行に伴う変動と細胞内局在の検討

細胞周期に伴うプレグネノロンの細胞内濃度を、市販のプレグネノロン測定キットと Mass spectra 解析により測定した。また、FITC ラベルをしたプレグネノロンを化学合成し、HeLa 細胞にマイクロインジェクションすることにより、細部分裂期における局在を解析した。

(2)プレグネノロンの細胞分裂期における機能解析と結合タンパク質の同定

プレグネノロン産生酵素 Cyp11a1 を siRNA ノックダウンおよび阻害剤によって抑制し、分裂期紡錘体の形態を観察した。siRNA 耐性の Cyp11a1 またはプレグネノロン自体を戻すことで、抑制効果の特性を検証した。また、中心体の異常について、複製異常と中心小体接着異常の二つの可能性について検証した。中心小体接着維持に必須である sSgo1 との結合について、in vitro-binding assay を行った。

(3)sSgo1 のプレグネノロン結合ドメインの特定

sSgo1 の一連の欠失変異体を作成し、MBP 融合タンパク質を得た。それぞれを FITC-プレグネノロンと混合し、MBP-pull down assay により、結合ドメインを特定した。また、この領域の機能について細胞生物学的に解析を行った。

(4)細胞のがん化とプレグネノロン依存的紡錘体形成機構の関連

がん細胞株と正常細胞株を用いて、sSgo1 の中心体局在、Cyp11a1 ノックダウンによる中心体への影響について、比較検討した。

4. 研究成果

(1)プレグネノロンの細胞周期の進行に伴う変動と細胞内局在の検討

HeLa 細胞を細胞周期を同調させ、各周期で細胞内のプレグネノロンの濃度を測定した結果、プレグネノロンは分裂期で濃度がピークに達することが分かった。分裂期での細胞内の濃度は約 33nM であり、血中濃度とされる 1-3nM よりもはるかに高かった。FITC を標識したプレグネノロンと RITC - tubulin を HeLa 細胞にインジェクションし、分裂期での局在を観察した結果、FITC-プレグネノロンは紡錘体極(すなわち中心体)に局在した。このとき、コントロールの FITC-コレステロールは中心体への濃縮が見られなかったため、この局在はプレグネノロン特異的であると考えられる(図1)。

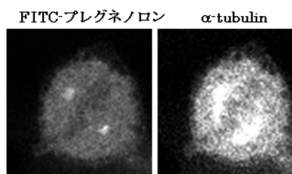


図1 プレグネノロンは紡錘体極に局在する

(2)プレグネノロンの細胞分裂期における機能解析と結合タンパク質の同定

Cyp11a1 の siRNA によるノックダウン、および阻害剤(aminoglutethimide)による抑制の結果、分裂期の紡錘体が多極化することを見出した。また、この異常は、中心体複製の異常が原因ではなく、中心小体のかい離が分裂期の早期に起こることが原因であることが分かった。さらにこの異常は、培地にプレグネノロンを投与すると回復するが、プロゲステロンや 17-OH-プレグネノロンでは回復しないことから、プレグネノロン自身が中心小体接着を促進する作用を持つことが分かった。また、プレグネノロンを除去すると、中心小体接着に必須である sSgo1 が中心体に局在できなくなること、この異常はプレグネノロンの投与で回復するが、プロゲステロンでは回復しないことから、sSgo1 はプレグネノロン特異的に紡錘体極に局在することがわかった(図2)。

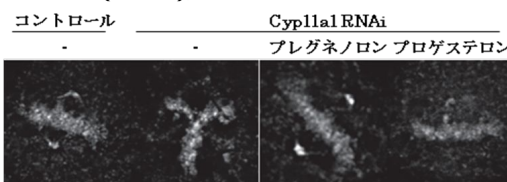


図2 sSgo1 はプレグネノロン依存的に紡錘体極に局在する

### (3)sSgo1 のプレグネノロン結合ドメインの特定

一連の MBP-sSgo1 欠失変異体と FITC-プレグネノロンの *in vitro* binding assay の結果、プレグネノロンは sSgo1 の N 末端に存在する coiled-coil domain に直接結合することが分かった (図 3)。さらに、この領域は sSgo1 の中心体局在に必要な十分であることを示した。

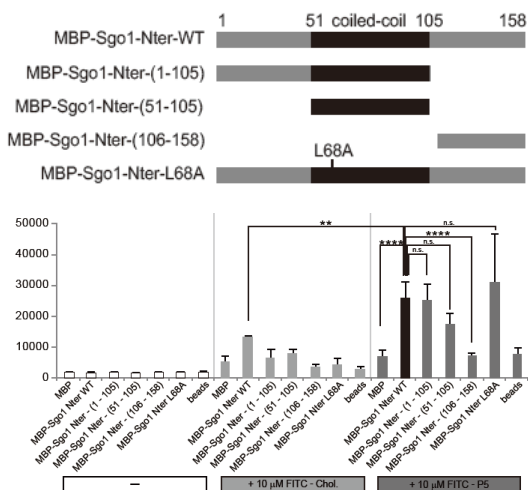


図 3 プレグネノロンは sSgo1 の coiled-coil 領域に結合する。

### (4)細胞のがん化とプレグネノロン依存的紡錘体形成機構の関連

がん細胞株である A549 と非がん細胞である HEK293 を比較した結果、A549 では sSgo1 は A549 細胞では紡錘体に局在したが、HEK293 細胞では局在しなかった。また、Cyp11a1 を抑制すると、A549 細胞では紡錘体の多極化が誘導されたが、HEK293 細胞ではされなかった。これらのことから、プレグネノロンによる中心小体接着維持機構は、がん細胞特異的である可能性が示唆された。

最近、がん細胞は中心体数が異常であっても二極紡錘体を形成する機構を持つこと、この機構が働かないとがん細胞は多極分裂し、結果的に細胞死することが報告された。続いて、この機構を阻害する化合物として GF15 が海外の研究グループ共同開発された。GF15 は多発性骨髄腫細胞に細胞死を特異的に誘導することが報告され、がん細胞特異的な中心体制御機構を標的とした制がん戦略が開始しつつある。本研究で明らかとなったプレグネノロン依存的な中心体制御機構ががん細胞特異的である場合、プレグネノロンと sSgo1 の結合を特異的に阻害する低分子化合物は、がん細胞に対する治療標的となり得ることが期待される。

### 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 1 件)

Hamasaki, M., Matsumura, S., Satou, A., Takahashi, C., Oda, Y., Higashiura, C., Ishihama, Y., and Toyoshima, F. Pregnenolone functions in centriole cohesion during mitosis. *Chem. Biol.* 21, 1707-1721 (2014)

DOI: 10.1016/j.chembiol.2014.11.005.

[学会発表](計 2 件)

Fumiko Toyoshima. Pregnenolone associates with mitotic spindles and functions in centriole cohesion. EMBO Conference Centriole and Spindle pole bodies, Lisbon, Portugal, 30 Sep-3 Oct., 2014.

Fumiko Toyoshima: An emerging role of steroids in control of cell division. The 21th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, Seoul, Korea, 17-18 July, 2014.

[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

### 6. 研究組織

(1)研究代表者

豊島 文子 (Toyoshima Fumiko)

京都大学・ウイルス研究所・教授

研究者番号: 40397576

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

松村 繁 (Matsumura Shigeru)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：6 0 5 2 3 5 1 1