

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 24 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：26840007

研究課題名(和文)新規Aurora基質タンパク質による染色体分配メカニズムの解析

研究課題名(英文)Characterization of a new Aurora kinase substrate in chromosome separation

研究代表者

稲見 恵理 (INAMI, ERI)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：80710615

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々はAurora kinaseの新規基質としてCEP97を見出し、その結合タンパク質として紡錘体制御因子NEDD1と動原体制御因子SUGT1を見出した。CEP97がリン酸化によりNEDD1と結合することを見出し、NEDD1がCEP97の局在を制御し、紡錘体が形成され細胞分裂が正常に起こることが示唆された。我々はCEP97のAuroraによるリン酸化部位としてS387を同定したが、その機能は示せなかった。しかし、我々はCEP97がPLK1やCDK1などの分裂期に重要なkinaseにもリン酸化されることを明らかにし、そのリン酸化部位が紡錘体形成に関与する可能性が本研究で示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that CEP97 is phosphorylated by Aurora kinase. We also found CEP97 binding protein which are the spindle regulated factor, NEDD1 and the centromere regulated factor, SUGT1. The association between CEP97 and NEDD1 is depended on phosphorylation. NEDD1 regulates the localization of CEP97, that has important role for the formation of spindle in mitosis. We identified a Aurora phosphorylation site S387. The role of S387 is remain unknown. However we found other phosphorylated sites of CEP97 which are probably phosphorylated by CDK1 or PLK1 and possibly regulate formation of spindle in mitosis.

研究分野：分子生物学

キーワード：Aurora 染色体分配 中心体 紡錘体 細胞分裂

1. 研究開始当初の背景

Auroraは細胞分裂進行の中心的役割を担っている重要なkinaseであるが、未だ同定されていない多くの基質が存在する。そこで、Auroraにリン酸化された基質を認識する抗体を用いてAuroraの新規基質の同定を試みた。抗体を用いて免疫沈降を行いSDS-PAGEで分離した後、質量分析により同定した。その結果、CEP97 (centrosomal protein 97kDa) がAuroraの新たな基質であることが示唆された。CEP97は中心体で一次繊毛形成を制御している。しかしながら、それ以外の機能に関してはほとんど知られていない。そこで我々はCEP97に関してさらなる研究を行った。その結果CEP97はAuroraによってリン酸化され、紡錘体形成制御因子NEDD1と動原体制御因子SUGT1の相互に結合し、分裂期の染色体分配を制御する重要なタンパク質であることが示唆された。

2. 研究の目的

CEP97のリン酸化部位、そしてNEDD1とSUGT1との関係を詳細に検討し、CEP97による染色体分配制御機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞

今回ヒト子宮頸癌細胞株 HeLa、ヒト胎児由来腎臓上皮細胞 293T 細胞を用いた。それぞれ 10% FBS DMEM、37 0.5% CO2 インキュベーターで培養した。

(2) ウイルスを用いた細胞株作成

FLAG-CEP97 を恒常的に発現する細胞株を作成するために、レトロウイルスを用いた。レトロウイルスベクターに FLAG-CEP97 を組み込み、gag, Pol 遺伝子を発現するベクターと共に 293T 細胞へ導入した。導入 48 間後のウイルスを含む培養液を目的の細胞にかけて感染させる。その後感染した細胞を導入した薬剤耐性遺伝子の薬剤をもちいてセレクトし細胞株を樹立した。

(3) siRNA による発現抑制

CEP97 の機能を解析するために siRNA をもちいて CEP97 の発現を抑制した。siRNA の設計は siDIRECT により特異性の高いものを設計した。siRNA は北海道システムサイエンス社より購入し、RNA iMAX を使用して各細胞へ導入した。導入後 72h 後に細胞を回収し、目的の遺伝子の発現を抑えているか WB で確認をした。

(4) 免疫染色、タイムラプス顕微鏡による細胞分裂の観察

tubulin や動原体が蛍光で可視化できる細胞をもちいて、CEP97 発現抑制時の細胞分裂の様子について観察した。顕微鏡は LCV100 (Olympus) FV-1000 (Olympus) を使用した。また CEP97 などを発現抑制した際に細胞をメタノール/アセトン(1:1)で固定をし、抗体

を用いて細胞分裂時の局在を観察した。

(5) 結合実験

CEP97 と NEDD1, SUGT1 の結合部位を同定するために FLAG-CEP97 の deletion mutant を作成し、HA-NEDD1 または HA-SUGT1 と 293T 細胞へ ripofectamine 2000 をもちいて導入し、発現させた。Plasimd 導入 24h 後に HA 抗体をもちいて免疫沈降を行った。

(6) リン酸化部位同定

作成した FLAG-CEP97 細胞を培養し、FLAG beads をもちいて FLAG-CEP97 を精製した。銀染色により、FLAG-CEP97 が十分なタンパク量精製できていることを確認し、FLAG ペプチドをもちいて beads より、FLAG-CEP97 を分離した。タンパク質を質量分析にけるために、還元アルキル化したのち、トリプシンにてタンパク質を断片化した。断片化したペプチドを回収し、LTQ Orbitrap XL にて解析をおこなった。

4. 研究成果

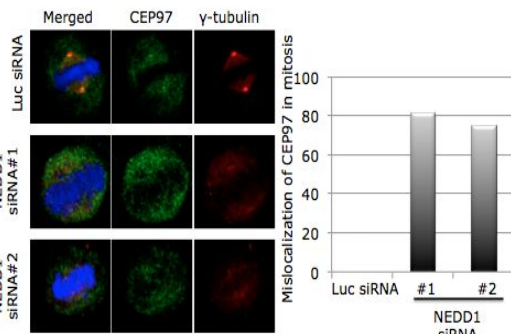
(1) CEP97 発現抑制時の分裂期染色体整列異常について

CEP97 発現抑制時の分裂期染色体が赤道面へ整列できなくなる原因として、紡錘体の形成異常が考えられた。そこで、分裂期紡錘体の形成を詳しく観察するため GFP-tubulin が発現する細胞をもちいて、タイムラプス顕微鏡で観察をした。siRNA CEP97 を導入後 48h からタイムラプス顕微鏡 LCV100 をもちいて GFP-tubulin を継続的に観察した。その結果、CEP97 の発現を抑えると分裂期紡錘体の形成はみられるが、明らかにコントロール siRNA に比べ紡錘体の形態に異常が観察された。固定した細胞でも同様な結果が観察された。また、CEP97 発現抑制時に分裂期染色体が赤道面へ整列できなくなる原因として紡錘体形成異常の他に動原体の形成異常が考えられた。そこで、CEP97 が動原体へ局在するか調べるため、HeLa 細胞を固定し抗 CEP97 抗体といくつかの動原体タンパク質抗体をもちいて共染色した結果、動原体への局在はみられず、CEP97 は分裂期に中心体とセントラルスピンドル、ミットボディへの局在のみ観察された。次に、CEP97 発現抑制時の動原体形成について調べるため、CENP-A や Aurora B などの動原体タンパク質を染めて観察した結果、動原体タンパク質の局在の変化は認められなかった。また、ウエスタンブロットにおいても CEP97 発現抑制時における動原体タンパク質のタンパク量の変化は認められなかったため、動原体の形成には影響がないと考えられる。したがって CEP97 発現抑制時に分裂中期染色体が赤道面へ整列できないのは、紡錘体形成側に異常があり、染色体と紡錘体の結合ができないということが明らかとなった。

(2) CEP97 結合タンパク質の解析

CEP97 には紡錘体形成に關与する NEDD1, 動原体形成に關与すると言われている SUGT1 が結合する。それぞれの siRNA を設計し、HeLa 細胞へ導入 72 間後に固定をし、紡錘体形成について觀察した結果、NEDD1 は今までの報告通り紡錘体形成異常が觀察された。またこのとき、CEP97 の中心体への局在もなくなるこゝがわかった(図 1)。CEP97 の発現を抑制

図 1 NEDD1 発現抑制時の CEP97 の局在

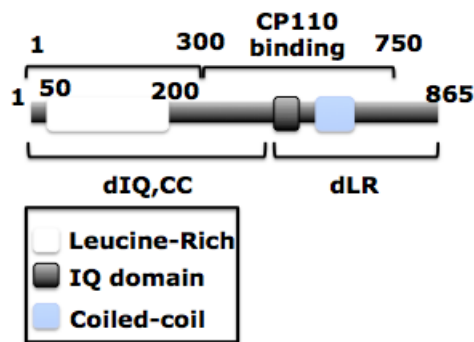


しても NEDD1 の局在には変化が認められなかった。また、SUGT1 の発現を抑えると紡錘体形成の異常が觀察された。SUGT1 の発現を抑えても CEP97 の局在には変化が認められなかった。以上の結果から、NEDD1 は CEP97 の局在を制御し、NEDD1、SUGT1 両者の結合が紡錘体形成に重要であることが示唆された。

(3) CEP97 deletion mutant による結合部位、局在部位の解析

CEP97 と NEDD1 と SUGT1 の結合が紡錘体形成に重要であることが示唆されたため、CEP97 の deletion コンストラクトを作成し(図 2)

図 2 CEP97 コンストラクト



NEDD1 と SUGT1 との結合とその局在について調べた。

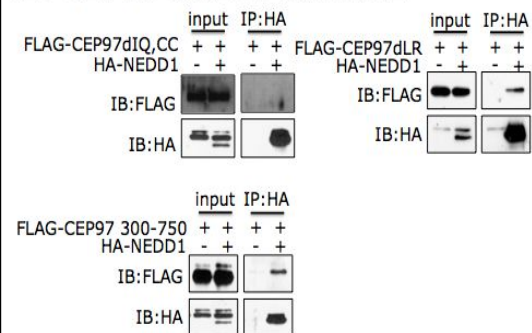
その結果、aa1-300 の領域で SUGT1 と結合し(図 3)、aa300-750 の領域で NEDD1 と結合をした(図 4)。CEP97 の中心体への局在には aa300-750 の領域が必要であった。この結果と、siNEDD1 によって CEP97 の中心体への局在がなくなるこゝという結果から、CEP97 の中心体への局在には NEDD1 との結合が必要であ

ることが示唆された。

図 3 CEP97 の SUGT1 結合部位



図 4 CEP97 の NEDD1 結合部位



(4) CEP97 とその結合タンパク質がリン酸化によって制御されているかについて検討

CEP97 と NEDD1 の結合がリン酸化によって制御されているのではないかと考え、FLAG-CEP97 FL または aa300-750 と HA-NEDD1 を 293T 細胞へ発現させ、HA 抗体をもちいて免疫沈降をした。その後 phosphatase で処理をして、脱リン酸化により結合が変化するかを調べた結果、変化が認められた。また同様な実験を SUGT1 についても行ったが変化は認められなかった。以上の結果より、CEP97 と NEDD1 の結合はリン酸化が関与していることが示唆された。

(5) CEP97 のリン酸化部位同定

CEP97 の分裂期におけるリン酸化部位を同定するために、作成した FLAG-CEP97 を発現する HeLa 細胞株を増やし、ノコダゾール処理し分裂期に止めたもの、ノコダゾール処理をしない細胞それぞれから FLAG-beads をもちいて FLAG-CEP97 を精製した。FLAG ペプチドで beads より FLAG-CEP97 を分離し、還元アルキル化しトリプシン処理したのち LTQ Obtrap XL で解析をした結果、分裂期でリン酸化されているセリンスレオニンが複数見つかった。その中でも S387 が Aurora にリン酸化されるコンセンサス配列であったため、S387 に着目した。このリン酸化部位をアラニンへ変換した mutant を作成し、抗 Aurora 抗

体をもちいて検出したところ、WT で検出できたバンドが消失したことから、S387 が Aurora にリン酸化される部位であることが示唆された。

(6) S387 が紡錘体形成に関与するかについての検討

S387 のリン酸化が紡錘体形成に関与するかについて検討するために、CEP97 WT, S387A, S387E をそれぞれ HeLa 細胞へ過剰発現させた。紡錘体形成を観察するため細胞を固定し、tubulin で染色をして共焦点顕微鏡 FV-1000 で観察した結果、紡錘体形成について変化が認められなかった。

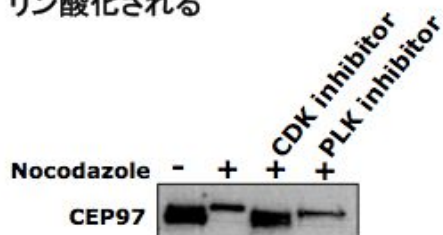
(7) まとめ

本研究では新規 Aurora 基質である CEP97 が aa300-750 の領域でリン酸化により NEDD1 と結合し、CEP97 の局在を制御することにより、紡錘体が形成され、細胞分裂が正常に起こることが示唆された。

今回発見し解析を行ったリン酸化部位 S387 が Aurora にリン酸化される部位であることは確認できたが、それが紡錘体形成に関与し細胞分裂を制御することは示せなかった。S387 が紡錘体形成に関与するか検討した方法は強制発現によるドミナントネガティブ、アクティブ効果をみたものであるため、内在性の CEP97 の影響も考えられる。siRNA をもちいたレスキューの系を作成中であり再検討する。

CEP97 には Aurora 以外にも PLK や CDK1 により細胞分裂期にリン酸化される(図 5)。

図5 CEP97はCDK1PLK1により、リン酸化される



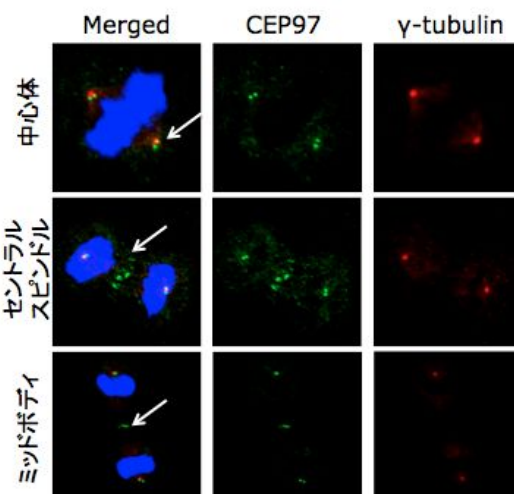
CDK, PLK の inhibitor により、リン酸化による CEP97 のバンドのシフトが下がることから、これらの kinase によりリン酸化されると考えられる。

質量分析で分裂期にリン酸化される部位は S387 以外にも存在した。今回は Aurora にリン酸化される部位に着目したが、そのほかのリン酸化部位にも着目範囲を広げ、NEDD1 や SUGT1 の結合、そして紡錘体形成に関わるリン酸化部位を明らかにしていきたいと考えている。

また CEP97 は細胞分裂後期にセントラルスピンドルやミットボディという構造体にも局在を示す(図 6)。細胞分裂後期にも Aurora kinase は重要な役割をするので、今回発見し

た Aurora のリン酸化部位は細胞分裂後期のセントラルスピンドルやミットボディへの局在や機能に重要な役割をしている可能性があり、今後検討していきたいと考えている。

図6 CEP97の分裂期局在



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)

Maeda M, Hasegawa H, Sugiyama M, Hyodo T, Ito S, Chen D, Asano E, Masuda A, Hasegawa Y, Hamaguchi M, Senga T.

Arginine methylation of ubiquitin-associated protein 2-like is required for the accurate distribution of chromosomes.

FASEB J. 2016 30(1):312-23. 査読あり

DOI: 10.1096/fj.14-268987

Ayesha AK, Hyodo T, Asano E, Sato N, Mansour MA, Ito S, Hamaguchi M, Senga T.

UBE2S is associated with malignant characteristics of breast cancer cells.

Tumour Biol. 2016 37(1): 763-72. 査読あり

DOI: 10.1007/s13277-015-3863-7

Hyodo T, Ito S, Asano-Inami E, Chen D, Senga T.

A Regulatory Subunit of Protein Phosphatase2A, PPP2R5E, Regulates the Abundance of Microtubule Crosslinking factor1 (MTCL1)

FEBS J. 2016 283(19):3662-71. 査読あり

DOI: 10.1111/febs.13835

6. 研究組織

(1)研究代表者

稲見 恵理 (INAMI ERI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教

研究者番号：80710615