

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14508

研究課題名(和文)セパレースセンサーを用いた中心子複製ライセンス機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of the licensing mechanism of centriole duplication by using Separase Sensor

研究代表者

花房 洋(Hanafusa, Hiroshi)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号：00345844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：中心体は一对の母娘中心小体からなり、細胞周期ごとに一度だけ複製される。この時、母娘中心小体の解離が、中心小体複製のライセンスシグナルとして働くことが明らかとなっている。母娘中心小体の解離は、プロテアーゼであるセパレースがコヒーシンを分解することで生じる。コヒーシン切断配列の両側に発色団を持つセパレースセンサーを用いると、セパレースの活性を蛍光の変化で観察できる。本研究ではこの系を用いて、ライセンスシグナルに重要な遺伝子の同定と、その分子機構の解析を行った。その結果、ROCOファミリーキナーゼLRRK1が、キナーゼ活性依存的に母娘中心小体の解離を制御していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The centrosome consists of a pair of mother-daughter centrioles, which are replicated only once per cell cycle. At this time, the disengagement of mother-daughter centrioles acts as a licensing signal for centriole duplication. Dissociation of the mother-daughter centrioles occurs by the cleavage of cohesin by the protease separator. When a separator sensor with a chromophore on both sides of the cohesin cleavage sequence is used, the activity of the separase can be observed with a change in fluorescence. In this study, we used this system to identify genes important for licensing signals and analyze their molecular mechanisms. As a result, it was revealed that the ROCO family kinase LRRK1 controls the disengagement of the mother-daughter centrioles in a kinase activity-dependent manner.

研究分野：細胞生物学

キーワード：LRRK1 中心小体 ライセンスシグナル

## 1. 研究開始当初の背景

中心体は微小管形成中心として機能し、間期には微小管ネットワークを形成し細胞骨格やモーター蛋白質による輸送のレールとして機能している。また細胞分裂期(M期)には紡錘体(スピンドル)を形成し、染色体ゲノムの娘細胞への均等な分配に重要な役割を果たしている。中心体は、母中心子と娘中心子の2つの中心子から成り、細胞周期と連動してS期に一度だけ複製される(図1a)。過剰な中心体は、多極紡錘体の形成及びゲノム分配の不安定化を引き起こし、細胞の恒常性維持にとって重篤な事態を引き起こす。実際多くのガン細胞で、中心体数の過剰が原因で染色体の不安定化が生じていることが報告されている。このため、中心子の複製は、一回の細胞周期につき一度、S期でしかおきないように厳密に制御されている。この中心子複製サイクルの制御には、M-G1期のライセンシングシグナルが必須の役割を果たしている。S期に複製された娘中心子は母中心子とタイトに接着しており、M期からG1期にかけて解離(disengagement)する。するとこの解離がS期での複製のライセンシングシグナルとなる(図1a)。これまでの研究から、S期中心子複製に関与する因子は多数同定されてきたが、M-G1期ライセンシング機構に関与する因子はほとんど明らかになっておらず、ライセンシングシグナルがどのように複製を制御しているのかも不明であった。

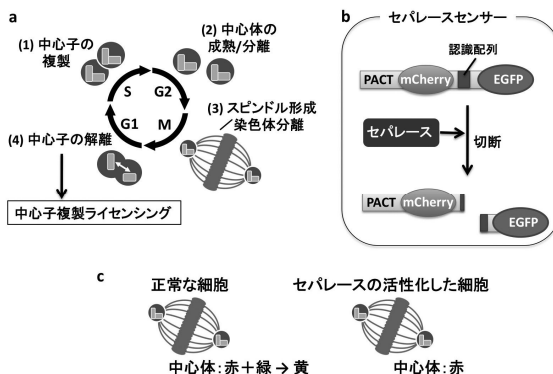


図1 中心子複製とセパレーズセンサー

## 2. 研究の目的

これまでライセンシング機構に重要な因子として、セパレーズが報告されている。セパレーズは、姉妹染色体の分離に重要なプロテアーゼとして有名である。最近の研究から、中心体において母娘中心子の解離にも機能していることが明らかとなってきた。つまりセパレーズの活性化は、中心子の解離(=ライセンシングシグナル)に必須である。そこでセパレーズセンサーを用い、セパレーズの活性化を指標にライセンシングに機能する

遺伝子群を同定する。またこれらの遺伝子のライセンシングにおける機能解析を行う。これらの解析から、セパレーズを中心とした中心子解離制御機構(ライセンシング機構)の解明を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) セパレーズセンサーを用いたライセンシング制御因子のスクリーニング

上述したように中心体でのセパレーズの活性化は、母娘中心子の解離を引き起こし、ライセンシングシグナルを発生させる。通常細胞は、M期後期からG1期にかけて中心体でセパレーズが活性化する。一方、M期中期にセパレーズが活性化すると、中心子の解離が早まりライセンシングシグナルが異常な時期に生じてしまう。このような細胞では、その後の中心子複製が複数回おこり、細胞は過剰な中心体を持つようになる。そこでセパレーズセンサーを用いてsiRNAスクリーニングを行い、ロックダウンするとセパレーズの活性化が異常な時期に生じる遺伝子の同定を行う。また二次スクリーニングとして、同定した遺伝子をロックダウンした細胞で、母娘中心子の解離が実際に早くなっているか検討する。中心体構成因子のうちCentrinは、中心子の先端に局在し、Cep135は基底部に局在することが知られている(図2a)。このためCentrinとCep135を2重染色すると、母娘中心子がタイトに結合していると、CentrinとCep135のシグナルは2:1でみられ、母娘中心子が解離していると、CentrinとCep135のシグナルは1:1で見られる(図2a)。そこでCentrinとCep135の染色を指標に、母娘中心子の解離が生じているか検討する。

### (2) M-G1期ライセンシングシグナルによるS期中心子複製の制御機構の解明

これまでライセンシングシグナルがどのようにS期中心子複製へとつながるのかわからなかった。PLK1のファミリー分子PLK4は、S期中心子複製に必須のキナーゼとして知られている。PLK4をロックダウンすると中心子の複製はおこらず、またPLK4を過剰発現させると中心子の複製が過剰に生じる。興味深いことにPLK4はM期中心体で最も活性化しており、M期での活性を阻害するとS期での中心子複製も阻害されることが報告されている。このことは、M-G1期ライセンシングシグナルとS期中心子複製をつなぐ分子としてPLK4が機能している可能性を示唆している。そこでスクリーニングで得られた候補分子が、PLK4とともに機能しないか検討する。

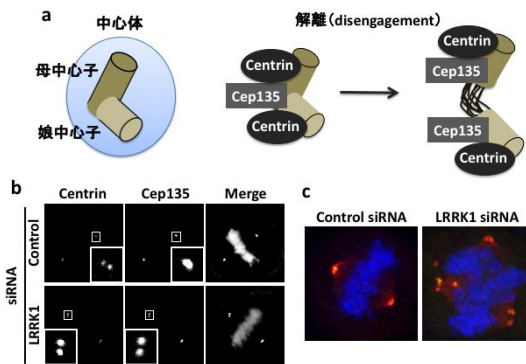


図2 LRRK1 ノックダウンと中心子複製

#### 4. 研究成果

我々はM期ライセンスシグナルに関する因子として、ROCOファミリーキナーゼLRRK1を同定した。LRRK1はRasに似たGTPaseドメインとMAPKKKに似たキナーゼドメインをもつユニークなキナーゼで、ファミリー分子LRRK2は、家族性パーキンソン病の原因遺伝子として知られている。これまで我々はLRRK1が間期の細胞において、上皮成長因子受容体(EGFR)の細胞内トラフィックに重要な役割を果たしていることを明らかにしていた。一方M期の細胞においては、LRRK1は中心体に局在し、M期キナーゼPLK1及びCDK1によって強く活性化されることが明らかとなった。

我々は本研究から、HeLa細胞でLRRK1を恒常的に活性化させると、M期母娘中心小体の解離が早まること(図2b)を見出した。その結果、LRRK1を恒常的に活性化させた細胞では、S期に中心小体の過剰複製が生じ、中心体数が過剰になることが明らかとなった。この時セバレースセンサーを用いた解析から、LRRK1を恒常的に活性化させた細胞では、中心体におけるセバレースの活性が上昇していることが明らかとなった。このことから、これらの細胞では、セバレースによるコヒーシンの切断タイミングが早まった可能性が考えられた。

一方、LRRK1をノックダウンした細胞では、母娘中心小体の解離が遅延することを明らかにした。上記と同様にセバレースセンサーを用いた解析から、これらの細胞ではセバレースの活性化のタイミングが遅延していた。

以上本研究から、LRRK1がキナーゼ活性依存的にセバレースの活性化を制御し、母娘中心小体の解離(ライセンスシグナル)のタイミングを制御していることが明らかとなった。LRRK1はM期ライセンスシグナルを制御することで、S期中心小体複製をコントロールしていることが明らかとなった。

#### 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 2件)

(1) Hanafusa, H.\*, Matsumoto, K. \*  
LRRK1 regulates spindle orientation by phosphorylating CDK5RAP2. *Cell cycle*, 14:3349-3350 (2015) 査読有り

(2) Hanafusa, H.\*, Kedashiro, S., Tezuka, M., Funatsu, M., Usami, S., Toyoshima, F., and Matsumoto, K.\*  
PLK1-dependent activation of LRRK1 regulates spindle orientation by phosphorylating CDK5RAP2. *Nat. Cell Biol.* 17:1024-1035 (2015) 査読有り

[学会発表](計 3件)

##### 1 花房洋

LRRK1による細胞内トラフィックを介したEGFRシグナル制御  
生命科学系学会合同年次大会  
2017年12月6日(ワークショップ:オーガナイザー)  
神戸ポートアイランド

##### 2 花房洋、松本邦弘

ROCOファミリーキナーゼLRRK1によるシリア退縮制御  
第39回日本分子生物学会  
2016年11月30日(招待講演)  
横浜

##### 3 花房洋、松本邦弘

ROCO family kinase LRRK1 regulates the transport and maturation of autophagosomes through Rab7 phosphorylation  
第68回細胞生物学会  
2016年6月15日(招待講演)  
京都

[図書](計 1件)

##### 花房洋、松本邦弘

ROCOファミリーキナーゼLRRK1の基質依存的な細胞機能 生化学 89, 286-289 (2017).

[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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページのアドレス

[http://bunshi3.bio.nagoya-u.ac.jp/~bunshi6/matsumoto\\_japanese/index.html](http://bunshi3.bio.nagoya-u.ac.jp/~bunshi6/matsumoto_japanese/index.html)

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

花房 洋 (Hanafusa Hiroshi)  
名古屋大学大学院理学研究科・准教授  
研究者番号：00345844