

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19003

研究課題名(和文) SAPKおよびPLK4による中心体複製の開始と停止を制御する分子機構の解明

研究課題名(英文) SAPKs and PLK4 maintain the numerical integrity of 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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：中心体は紡錘体極として機能することで染色体の均等分配を担っている。このため正常細胞では中心体数はG1期には1つ、S-G2期に複製されて2つになる様に厳密に制御されており、ストレス環境下においても中心体複製を停止させることで中心体数は保持されるが、その分子機構は不明であった。我々はこれまでにp53とSAPK経路が協調的にPLK4を介した中心体複製を制御することによりストレス環境下における中心体数の保持を担うことを見出した。そこで本研究では更にこの研究を発展させ、中心体複製停止に関わるSAPK新規標的分子の同定と機能解析を行った。また更に中心体複製鍵分子PLK4の中心体移行機構の解明も行った。

研究成果の概要(英文)：Centrosomes function as bipolar spindles, which are essential for equal chromosome segregation. Therefore centrosome duplication is strictly regulated to once per cell cycle. Even under stress condition, centrosome number is maintained in normal cells. However, the molecular mechanism had remained unclear. We have reported that p53 and SAPK pathways cooperatively regulate PLK4-driven centrosome duplication under stress, thereby maintaining the numeral integrity of centrosomes. This time we identified the novel target of SAPK in centrosome duplication arrest. Moreover we tried to elucidate the mechanism by which PLK4 translocalizes to mother centrioles.

研究分野：分子生物学、細胞生物学

キーワード：MAPK SAPK PLK4 中心体 染色体不安定性

1. 研究開始当初の背景

細胞内小器官の1つである中心体は、体細胞分裂時において双極性の紡錘体形成を担うことにより染色体の均等分配に本質的な役割を果たしている。このため正常細胞において中心体数はG1期には1つ、S-G2期に複製されて2つになる様に制御されている。仮に正常細胞がDNA損傷等のストレス環境下に曝された場合でも中心体複製は停止することで中心体数は保持されるが、その分子機構は不明である。

また中心体複製にはPolo-like kinase 4 (PLK4) が必須であることが知られており、中心体複製の開始時期であるG1-S期にかけて母中心小体にPLK4が移行することにより新たな中心小体(娘中心小体)の複製が開始される。しかし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現在でも多く残されている。

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PLK4を介して誘導される中心体複製を制御することにより、中心体数と染色体安定性の保持に関わることを報告した(Nature Commun., 2013)。更に我々はp53が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が、SAPKはPLK4のキナーゼ活性を直接阻害することは無かった。この結果からSAPKはPLK4以外の分子を標的にすることによりストレス環境下において中心体複製を抑制することが考えられた。そこで本研究では、ストレス環境下においてSAPKが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同定および機能解析することにより、PLK4の中心体移行に関わる分子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の標的分子の同定と機能解析

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を探索する。この探索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にリン酸化部位の特定を行う。更に細胞にストレス刺激を加えることにより内在性レベルで候補分子がSAPKによってリン酸化されるか検証する。

次にSAPK標的分子のリン酸化部位をアスパラギン酸(D)またはグルタミン酸(E)に置換したリン酸化模倣型変異体を作製する。得られたSAPK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。ま

たSAPK標的分子のリン酸化残基をアラニン(A)置換したリン酸化修飾を受けない変異体を作製する。得られたアラニン変異体ではストレス刺激を加えた場合でも中心体複製の停止が阻害されるか検証する。

(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同定することでPLK4の中心体移行メカニズムを明らかにする。そこでまずPLK4分子と特異的に結合する分子を質量分析により網羅的に同定する。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して、PLK4の中心体輸送に関わる分子を特定する。更にこれら中心体輸送制御分子とPLK4との結合様式等を調べることにより、PLK4の中心体移行に関わる分子制御機構を解明する。

4. 研究成果

(1)中心体過剰複製の抑制に関わるSAPKの標的分子の同定と機能解析

ストレス刺激にตอบสนองしてSAPKが中心体複製停止を誘導する分子機構を明らかにするため、ストレス応答MAPK(SAPK)の新規基質分子を探索した。その結果、中心体局在蛋白質を初め中心体複製制御に関わることを予想される分子を複数同定することに成功した。得られた候補分子とSAPKを試験管内で混合してリン酸化反応を誘導したところ、いくつかの候補分子がSAPKによって直接リン酸化されることが明らかになった。更に細胞内のリン酸化をモニターした結果、候補分子の1つがストレス刺激依存的にリン酸化されることを見出した。またSAPK阻害剤で前処理した場合にはストレス刺激依存的なリン酸化は大きく減少したため、SAPK新規基質候補分子の1つがSAPKによって内在性蛋白質レベルでリン酸化されることを明らかにした。またリン酸化部位の特定にも成功し、同部位に対するアラニン変異体、リン酸化模倣変異体であるアスパラギン酸変異体およびグルタミン酸変異体も作製した。更に現在リン酸化される生理的意義の解明を行っており、中心体複製停止に関わる分子機構の全貌が明らかになりつつある。

(2)PLK4の中心体移行メカニズムの解明

我々はこれまでにPLK4の機能解析を行うことを通じて、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を質量分析により探索した結果、複数のPLK4結合分子候補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ところ、PLK4の中心体移行制御に関わるいくつかの候補分子を同定することに成功した。またこれら候補分子とPLK4との結合領域を特定す

ることにも成功し、候補分子（以下 PLK4 結合分子）が PLK4 と結合する分子機構も明らかにした。

現在これらの PLK4 結合分子を介した PLK4 中心体輸送の分子機構を解明できたため、学術論文に纏めているところである。

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 1 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）

〔学会発表〕（計 8 件）

Takanori Nakamura and Mutsuhiro
Takekawa

The molecular mechanisms that maintain
the numerical integrity of centrosomes.

2016 年 12 月 5 日 American Society of
Cell Biology (ASCB) annual meeting 2016
サンフランシスコ Moscow center (アメリ
リカ)

西住(渡海)紀子、中村貴紀、武川睦寛
ストレス応答 MAPK 経路依存的に発現調節
される miRNA の同定

2016 年 11 月 30 日、第 39 回日本分子生物
学会年会 パシフィコ横浜

Moriizumi Hisashi, Takanori Nakamura
and Mutsuhiro Takekawa

Functional analysis of

feedback-phosphorylation of MKK4 by
MAPKs

2016 年 11 月 4 日 IARU International
Symposium on Aging, Longevity and
Health、東京

Moriizumi Hisashi, Takanori Nakamura
and Mutsuhiro Takekawa、Functional
analysis of feedback-phosphorylation of
MKK4 by MAPKs、2016 年 10 月 8 日 第
75 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横
浜

Jane S. Weng、中村貴紀、武川睦寛
新規 ERK 基質分子 MCRIP1 の生理機能解
析

2015 年 12 月 3 日第 38 回日本分子生物学
学会年会・第 88 回日本生化学大会 合同大
会 神戸ポートアイランド

森泉寿士、中村貴紀、武川睦寛
癌抑制遺伝子 MKK4 のフィードバック・
リン酸化の意義

2015 年 6 月 30 日 第 67 回日本細胞生物
学会大会、タワーホール船堀（東京）

中村貴紀、西住-渡海 紀子、松下萌恵、武
川睦寛

Tumor suppressors MKK4 and p53
cooperatively maintain centrosome
integrity and chromosomal stability

2015 年 10 月 8 日第 74 回日本癌学会学術
総会 名古屋国際会議場

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**）

<http://www.mtz.co.jp/jsmm/shourei2.html>

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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：

(4) 研究協力者

()