

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18541

研究課題名(和文) 中心小体形成におけるカートホイール構造構築の分子機構の解明

研究課題名(英文) The role of the cartwheel structure in human centriole duplication

研究代表者

吉場 聡子 (Yoshiba, Satoko)

国立遺伝学研究所・分子遺伝研究系・助教

研究者番号：70642213

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)：中心小体は、動物細胞において、細胞分裂における正常な染色体分配およびゲノムの安定性維持に必須の細胞小器官であり、細胞周期と同調して一細胞周期に一度だけ複製される。複製に必要な分子の多くは明らかにされているが、その段階的な形成過程は未だ不明な点が多い。本研究では、標的タンパク質を時期特異的に分解するauxin-degronシステムおよび超解像顕微鏡技術を用いて、中心小体の形のテンプレートとなるカートホイール構造の新たな機能を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：At the onset of centriole formation, a structure called the cartwheel is formed adjacent to the pre-existing centriole. SAS-6 proteins are supposed to constitute the hub of the cartwheel structure. However, the exact functions of the cartwheel in the process of centriole formation have not been well characterized. In this study, we focus on the functions of human SAS-6 (HsSAS-6). Using in vitro reconstitution with recombinant HsSAS-6, we first find its conserved molecular property forming the centre part of cartwheel structure. Furthermore, we uncover the critical functions of the cartwheel using a combination of auxin-inducible SAS-6-degron system and super-resolution microscopy in human cells. Our results demonstrate that the cartwheel is required not only for the initiation of centriole formation, but also for the stabilization of centriole intermediates. Overall, these findings illustrate the conserved and fundamental functions of the cartwheel in centriole duplication.

研究分野：細胞生物学

キーワード：中心小体 カートホイール SAS-6

1. 研究開始当初の背景

中心小体は、動物細胞において微小管形成中心として働く細胞小器官であり、細胞周期と同調して一細胞周期に一度だけ複製される。網羅的 RNAi スクリーニングや変異体解析の知見を元に、近年、複製に必須な分子群、およびそれらの分子機能や相互作用は徐々に明らかになってきていたが、その構造体としての構築過程は不明な点が多かった。従来 RNAi や遺伝子ノックアウトなどの機能解析では、段階的に形成される中心小体を構成する分子それぞれが、いつどのように働くのかを特定するのが難しく、またそれまでの顕微鏡技術では、この微小な構造体を分解する解像度に達していなかった。

中心小体複製の開始においては、カートホイール構造とよばれる 9 回対称の構造体が形成され、中心小体形成のテンプレートとして働くことが知られている。この構造体の主要構成因子は、タンパク質 Sas-6 であることがわかっており、自己集合して 9 回対称の構造を形成することがクラミドモナスなどを使った研究で示されてきた (Kitagawa, 2011)。一方で、Sas-6 のその高度なアミノ酸配列の相同性にもかかわらず、ヒトをはじめとする高等動物の細胞においては、Sas-6 の性質、及び他構成因子とどのように協調的にカートホイール構造を構築し維持しているのか未だに明らかにされていない。

2. 研究の目的

中心小体は、動物細胞において微小管形成中心として機能し、分裂時における正常な染色体分配およびゲノムの安定性に必須の細胞小器官である。その本体は、9 本の三連微小管を対称に配した数百 nm 立方のシリンダー型の微小構造体である。中心小体の複製は、一細胞周期に一度だけ行われるよう厳密に制御されており、近年、その形成に必要な分子、およびそれらの機能や相互作用が徐々に明らかになってきているが、その構造体としての構築過程は未だに不明である。本研究は、中心小体形成のテンプレートになると考えられているカートホイール構造に着目し、その構築過程と、形成に必要な分子の作用点を明らかにすることを目的とする。タンパク質を時期特異的に分解する AID システムや超解像顕微鏡などを用いて、この構造体の形成・維持に関与する分子の相互関係、および作用起点を明らかにし、これらの分子を *in vivo* および *in vitro* 両方向から可視化することにより、初期の中心小体形成過程について理解する。

3. 研究の方法

1) AID 法および Crispr/Cas9 システムによる中心小体形成因子の作用点の同定

中心小体形成における分子それぞれの作用点を特定するため、標的タンパク質を時期特異的に knockdown できる auxin-inducible degron (AID) システムを利用する。まず、中心小体に局在しその形成に必須である、進化的に保存されたタンパク質のうち、カートホイール形成に関与することが予想されるタンパク質、human Sas-6 (HsSAS-6)、STIL、CPAP、Cep135、Cep152、Cep295 に関して、Crispr/Cas9 システムにより内在の標的遺伝子に AID-tag を付与した細胞ラインを樹立する。そして、それぞれの分子を分解したときの中心小体の形成過程を段階的にモニターしながら、その構築過程を明らかにする。

2) *in vivo* における中心小体形成過程の可視化

1) と平行して、これら中心小体形成に必要な分子に関して、その分子動態について超解像顕微鏡技術を用いて数十から数百 nm まで分解し可視化する。そして、上記 AID システムや RNAi による阻害実験の結果と合わせて、その形成過程を理解する。

3) 精製タンパク質を用いたカートホイール構造の *in vitro* 再構成

1) や 2) で得られた結果をもとに、カートホイール構造形成に必要なタンパク質精製を行い、*in vitro* での再構成をこころみる。

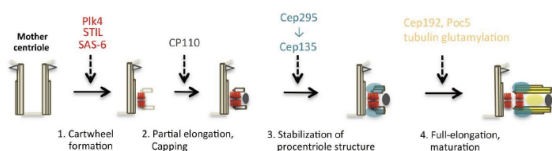
4. 研究成果

中心小体形成に必要な分子それぞれの作用点を特定するため、AID システムを用いて、標的タンパク質に対し時期特異的な knockdown を行なった。

具体的にはまず、中心小体に局在しその形成に必須である進化的に保存されたタンパク質のうち、カートホイール構造の主要構成因子である HsSAS-6 に対して、Crispr/Cas9 システムを用いて、内在の HsSAS-6 の両方の allele に AID-tag を付与したヒト培養細胞ラインを樹立した (HsSAS-6-AID 細胞)。親細胞には、auxin-degron による分解に必要な osTIR を恒常的に発現させた HCT116 細胞 (Natsume, 2016) を用いた。

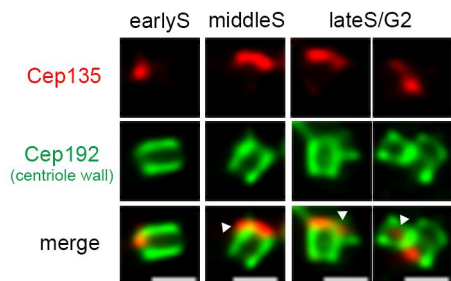
HsSAS-6-AID 細胞に auxin/IAA を作用させたところ、RNAi による knockdown と同

様に、中心小体の複製が阻害された。次に、段階的な中心小体形成過程において、HsSAS-6/cartwheel がどの段階まで必要であるのかを明らかにするため、薬剤により細胞周期を同調させて、段階的に AID による knockdown を行なった。その結果、S 期に Cep295 と、その後 Cep135 が娘中心小体にリクルートされ、中心小体の proximal 部分が形成されるまでは、HsSAS-6 が必要であることがわかった (図 1、2)。



(図 1) 段階的な中心小体の形成

Cep295 は、新しく形成される娘中心小体が、成熟して母中心小体となるために必須の分子であり(Tsuchiya, 2016)、一方 Cep135 は、HsSAS-6 と相互作用することで、cartwheel の口バスタな 9 回対称構造を保證すると考えられている。これらの分子が娘中心小体に取り込まれて構造が安定化することで、HsSAS-6/cartwheel の中心小体形成のテンプレートとしての役割は、それ以降必須ではなくなると考えられた (図 2)。

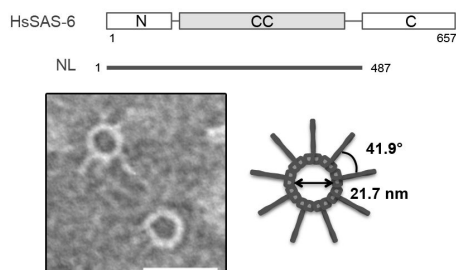


(図 2) 超解像顕微鏡による中心小体形成過程の可視化。矢印は新しい中心小体の位置。Leica/SP8 Hyvolution; scale bar, 500nm。

本研究により、これまでの研究手法では追跡できなかった、段階的な中心小体形成の詳細なメカニズムの一端が明らかになった。本研究の成果については現在論文投稿中である。また、カートホイール構造の形成に関わると考えられる他の分子についても AID cell line を作成し、解析を引き続き行なっている。

さらに、カートホイール構造を *in vitro* で再構成することを試みた。HsSAS-6 のタンパク質のフラグメントを精製し、lipid-monolayer 上で濃縮したところ、自己会合して 9 回対称のカートホイール構造の中心部分の形を作ることがわかった (図 3)。

これにより、SAS-6 の自己会合する性質が、進化的に保存されていることが直接的に示された。一方で vivo において、SAS-6 がどのように他の分子と相互作用してカートホイール構造を作るのかについては、さらなる研究が必要である。



(図 3) recombinant human SAS-6 の透過型電子顕微鏡像。scale bar, 50nm

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)

1. Tsuchiya Y, Yoshiba S, Gupta A, Watanabe K, Kitagawa D. Cep295 is a conserved scaffold protein required for generation of a bona-fide mother centriole. **Nature Communications**, 2016, Aug 26;7:12567. (査読あり)

[学会発表](計 2 件)

1. Yoshiba S, Kitagawa D. Crucial functions of cartwheel structure in human procentriole formation. **EMBO Conference, Centrosomes & Spindle Pole Bodies, 24-27 Sep. 2017**, Heidelberg, Germany (poster presentation)
2. Yoshiba S, Ohta M, Tsuchiya Y, & Kitagawa D. Mechanisms of the onset of centriole duplication in human cells. **JSCB meeting 14-16 June 2017**, Sendai, Japan (selected oral presentation)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉場 聡子 (YOSHIBA, Satoko)
国立遺伝学研究所・分子遺伝研究系・助教
研究者番号 : 70642213

(4)研究協力者

北川 大樹 (KITAGAWA, Daiju)
国立遺伝学研究所・分子遺伝研究系・教授
研究者番号 : 80605725