

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06233

研究課題名(和文) 分子ダイナミクスの定量・操作と数理モデリングによる中心体複製メカニズムの理解

研究課題名(英文) Analysis of centriole duplication process

研究代表者

高尾 大輔 (Takao, Daisuke)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：10548811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：細胞分裂時に染色体を均等に分配する二極性の紡錘体を形成するために、その極となる中心体の数は正確に2つである必要がある。そのための中心体形成プロセスを制御するメカニズムについては不明な点が多い。本研究では、これまでにない高い分解能によってこのプロセスに関わる分子の挙動を可視化し、さらにデータを基に数理モデル化することで、中心体複製プロセスの制御メカニズムの一端を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中心体の数を厳密に制御するメカニズムは正常な細胞分裂に重要であり、そのメカニズムの異常は癌化に関連することも指摘されている。このような重要な細胞機能の一端を解明できたことは、今後の生物学・医学における重要な進展である。

研究成果の概要(英文)：Centrioles are duplicated to produce a single copy of each preexisting centriole. At the onset of centriole duplication, the master regulator Plk4 undergoes a dynamic change in its spatial pattern around the preexisting centriole, forming a single duplication site. However, the significance and mechanisms of this pattern transition remain unknown. Based on results from super-resolution imaging and mathematical modeling, we proposed that the self-patterning of Plk4 is crucial for the regulation of centriole duplication. These results, defining the mechanisms of self-organized regulation, provide a fundamental principle for understanding centriole duplication.

研究分野：細胞生物学

キーワード：中心体 分子ダイナミクス 超解像イメージング 数理モデル

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

中心体は、動物細胞において微小管形成中心や分裂期における紡錘体の極の形成など多くの重要な機能を持ち、その名の通り細胞機能の中心ともいえる重要なオルガネラである。特に、細胞分裂時に染色体を均等に分配する二極性の紡錘体を形成するために、その極となる中心体の数は正確に2つである必要がある。この中心体の構成要素である中心小体は細胞周期に一度、正確に1コピーだけ複製される(図1)。すなわち、中心小体の複製を厳密に時間的・空間的に制御することで、二極性の紡錘体形成が担保されている。このように、中心小体の複製プロセスの厳密な制御は細胞機能に重要であり、過剰複製などの異常は細胞癌化などの疾病につながることも指摘されている。

細胞機能の根本に関わる重要性がありながら、複製を制御するメカニズムの詳細は未解明な部分が多い。これまで、リン酸化酵素であるPlk4やその相互作用パートナーであるSTILなどの主要因子が同定されてきた。中でも、我々の先行研究成果により、Plk4-STILの相互作用を介したダイナミックな分子局在パターン変化により単一の娘中心小体複製起点を決定するメカニズムの存在が示唆された(図1)。これは複製メカニズム解明に向けた大きな前進であったが、同時に、より詳細な分子ダイナミクスの理解が今後必要であるという課題が提示された。

Plk4など主要分子のダイナミクスがどのように中心小体複製の制御に関わっているのか?最も重要な点は、直径200nm程度という中心小体周辺の微小空間で制御される分子ダイナミクスを直接的に可視化・定量することであった。そのスケールゆえに困難であるが、主要分子の中心小体局在パターンの時空間変化をトレースすることは、中心小体複製メカニズムの解明には不可欠な課題であった。また、分子ダイナミクスが中心小体複製の時空間制御メカニズムを理解するための数理モデル化も重要な課題として残されていた。

2. 研究の目的

母中心小体から厳密に1コピーの娘中心小体が形成されるメカニズムを解明することが本研究の目的である。特に、複製に関わる主要分子の時空間ダイナミクスに着目して研究を進めた。実験的アプローチにより得られたパラメータを基に数理モデルを構築し、中心小体複製メカニズムの包括的な理解に向けた研究を計画・実行した。

3. 研究の方法

特に重要なアプローチとして、STED超解像顕微鏡法およびスピニングディスク型共焦点顕微鏡を用いて、中心小体の複製プロセスを可視化する研究に取り組んだ。スピニングディスク型共焦点顕微鏡を用いたライブ観察では、過剰発現の影響を受けやすい中心小体複製プロセスの特性を考慮し、ゲノム編集により内在性の標的タンパク質に直接蛍光タグをつける方法を用いた。これらのイメージングデータを定量的に解析し、そのデータを基に中心小体複製プロセスを時空間的に再現する数理モデルを構築した。

4. 研究成果

STED超解像イメージングにより、中心小体周辺にPlk4分子が作り出す離散的な空間パターンを可視化することに成功した。その結果、これまで連続的なリングパターンを作るとされていたPlk4が実は数珠のように連なった離散的なリングパターンを作ることを見出した。また、Plk4など主要分子の中心小体への局在の時空間変動をスピニングディスク型共焦点顕微鏡により可視化することに成功した。イメージング条件の最適化により、コピー数が少なく限られた微小空間に局在する内在性の主要分子の変動を30時間にわたってトレースできた。これにより、主要分子の中心小体周辺における局在レベルがダイナミックに変動する様子が観察された。特に、

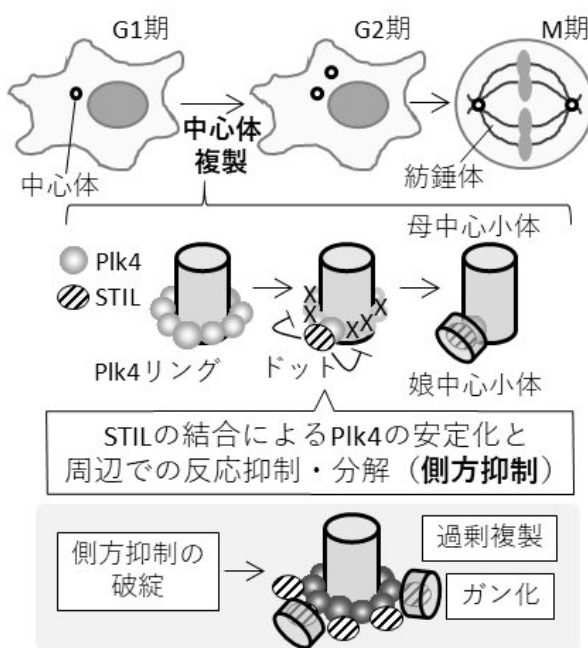


図1 中心体複製と本研究のモデル

P1k4 の局在レベルの上昇から少し遅れて STIL の局在レベルが上昇し、それと同時に P1k4 の局在レベルが低下する時間変化をトレースすることに初めて成功した。これは、P1k4 のリングパターン形成と STIL によるシングルポイントへのパターン変化を捉えたものであることも示唆された。以上を合わせ、非常に高い空間・時間分解能で中心小体の複製プロセスを直接的に可視化することができた。中心小体の複製プロセスを制御するメカニズムを理解するため、これらのデータをさらに解析した。

STED 超解像イメージングにより発見した P1k4 分子の離散的なリングパターンを詳しく解析したところ、この空間パターンは中心小体周辺の足場となる CEP152 との相互作用により形成されることが示唆された。実験データを基に、P1k4 が CEP152 を足場として自発的に離散的なリングパターンを形成するモデルを構築し、シミュレーションを行ったところ、実験データをよく再現する結果が得られた。このことから、P1k4 の分子ダイナミクスの状態変化と相互作用による自己組織化メカニズムが、中心小体複製ポイントの作成起点を作り出すというモデルを提唱した。

P1k4-STIL の相互作用が中心小体複製ポイントの決定に必要なことは知られていた。上記のような P1k4 の自己組織化メカニズムにより作られた弱いバイアスが、P1k4-STIL の相互作用によって固定されるというモデルを構築し、この仮説を検証した。このモデルによるシミュレーション結果は、長時間ライブイメージングによる主要分子の中心小体局在の時系列トレースとよく一致した。さらに、主要分子のノックダウンによる阻害実験の結果も、シミュレーションにより再現できた。

以上により、本研究では、中心小体複製プロセスの制御メカニズムの完全な理解につながる重要な進展があったと結論する。特に、中心小体複製プロセスをこれまでにない高い空間分解能で可視化し、さらにその時間変化のトレースや数理モデル化という、当初計画していた本研究の目標は十分に達成された。その後、国外からも類似の研究報告が相次いだことを踏まえると、本研究が中心体研究分野をリードする成果につながったと言える。

また、解析を進める中で、細胞周期に伴う細胞内の微細な構造パターンの変化を検出可能なアプローチの開発にも成功した。ディープラーニングと従来型の画像定量解析手法を組み合わせたアプローチである。これにより、人の目では識別が難しいわずかな細胞内の構造の変化を検出することが可能になった。中心体だけでなく、DNA やオルガネラなどの細胞内構造の微細な時間的・空間的变化を幅広く解析可能であり、細胞生物学の発展への貢献が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takao Daisuke, Yamamoto Shohei, Kitagawa Daiju	4. 巻 218
2. 論文標題 A theory of centriole duplication based on self-organized spatial pattern formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 3537 ~ 3547
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.201904156	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takao Daisuke, Watanabe Koki, Kuroki Kanako, Kitagawa Daiju	4. 巻 8
2. 論文標題 Feedback loops in the PIK4-STIL-HsSAS6 network coordinate site selection for procentriole formation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology Open	6. 最初と最後の頁 bio047175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/bio.047175	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takao Daisuke, Yamamoto Shohei, Kitagawa Daiju	4. 巻 N/A
2. 論文標題 A theory of centriole duplication based on self-organized spatial pattern formation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 N/A
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/424754	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nagao Yukiko, Sakamoto Mika, Chinen Takumi, Okada Yasushi, Takao Daisuke	4. 巻 31
2. 論文標題 Robust classification of cell cycle phase and biological feature extraction by image-based deep learning	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Biology of the Cell	6. 最初と最後の頁 1346 ~ 1354
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1091/mbc.E20-03-0187	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高尾大輔、長尾幸子、岡田康志
2. 発表標題 細胞内微細構造ダイナミクスの定量イメージング
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会（COVID-19感染拡大の影響により誌上開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Daisuke Takao
2. 発表標題 Modeling the pattern formation of Plk4 towards fundamental understanding of centriole duplication
3. 学会等名 ASCB/EMBO meeting（国際学会）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------