

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：33920

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14703

研究課題名(和文) 新たな分裂制御機構である収縮環における収縮「速度」制御の機能解析

研究課題名(英文) The regulatory mechanism analysis of the constriction "velocity" at the contractile ring during mitosis

研究代表者

兵頭 寿典 (Hyodo, Toshinori)

愛知医科大学・医学部・講師

研究者番号：40710645

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で申請者は独自のスクリーニングで見出した新規分裂制御因子の候補LUZP1がそのC末端領域で細胞分裂期の動原体、Midbodyに局在することを明らかにした。またLUZP1はKinase Xだけでなくその基質Yとも結合することが判明し、足場タンパク質のような機能を持つことが示唆された。さらにin vitro Kinase assayにより、LUZP1がKinase Xによる基質Yのリン酸化を制御することで細胞質分裂の収縮速度を制御している可能性が示唆された。LUZP1の細胞分裂期機能は全く分かっていないため、本解析により新たな分裂制御因子の存在とその一部機能が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全ての細胞は分裂で増殖を行う。これはがん細胞や病原菌もそうである。つまり分裂を完全に制御し、これらの増殖を制御できれば、人類はがんや感染症を克服できる可能性がある。しかし分裂の制御機構にはまだ不明な点が多く残り、分裂の完全制御を成すためには、より詳細な細胞分裂機構の解明が必要になっている。そこでこれまでに申請者は細胞分裂に関与する新規因子の探索とその解析を行ってきた。本研究課題で申請者は細胞分裂に関わる新たな因子とその一部機能を明らかにした。分裂の完全制御にはまだ長い道のりが必要であるが、本研究はそれを成すための一歩になったといえる。

研究成果の概要(英文)：Previously, we performed a screening to find novel candidates which relate the mitosis, thereby we found LUZP1. In this study, we showed that LUZP1 localizes at the centromere and the central spindle, and its localization require C terminal region of LUZP1. In addition, we found that LUZP1 interacts with both Kinase X and its Substrate Y. Our kinase assay indicates that LUZP1 prevent the phosphorylation of Substrate Y by Kinase X, however it also suggests that the interaction between LUZP1 and Kinase X induces Substrate Y phosphorylation in reverse. The above findings suggest a possibility that LUZP1 regulates the constriction velocity at the contractile ring during mitosis by preventing phosphorylation of Substrate Y by Kinase X. The function of LUZP1 during mitosis has not been reported. Our findings contribute to advances the elucidation of mitosis mechanisms.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞分裂 細胞質分裂 キナーゼ リン酸化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全ての細胞は増えるために分裂を行う。これはがん細胞や病原菌もそうである。つまり分裂を完全に制御し、これらの増殖を抑制できれば、人類はがんや感染症を克服できる可能性がある。しかし分裂の制御機構にはまだ不明な点が多く残っており、分裂の完全制御を成すためには、より詳細な細胞分裂機構の解明が必要になっている。そこで申請者は siRNA と過剰発現プラスミドを用いて新たな分裂制御因子のスクリーニングを行い、その候補として LUZP1 を見出した。

2. 研究の目的

申請者の事前実験により、LUZP1 は細胞質分裂時の収縮環の収縮「速度」の制御を行っている可能性が示唆された。しかし LUZP1 の細胞分裂期における機能は全く報告されていない。申請者は本課題で収縮速度制御機構の解明とその意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 共焦点顕微鏡を用いた蛍光融合タンパク質の細胞内局在観察

35mm のグラススペースディッシュに HeLa 細胞を播種し、Lipofectamine 3000 を用いて各種 GFP 融合プラスミドを導入した。24~48 時間後、共焦点顕微鏡 (Olympus, FV1000 または FV3000) を用いて、細胞を生かしたまま GFP 融合タンパク質の細胞内局在を観察した。

(2) タンパク質精製とタンパク質結合解析 (Pull-down assay)

pGEX.5X-1 プラスミドを用いた大腸菌発現系を用いて、目的タンパク質を GST ビーズに結合させ精製した。次に目的タンパク質の結合候補タンパク質を 293T 細胞に過剰発現させ、その粗抽出液を精製 GST ビーズと反応させ、2 つのタンパク質の結合確認を行った。

(3) *in vitro* Kinase assay

市販されている活性化 Kinase、大腸菌発現系で精製した基質、ラジオアイソトープ (RI) 標識 ATP を混合し、30°C で 30 分反応させた。その後 SDS-PAGE gel を用いてタンパク質を分離し、検出器 (GE Healthcare, BAS-5000) を用いてリン酸化 (RI 標識) された基質を検出した。

(4) MTT assay (抗がん剤の細胞障害効率の測定)

96 well プレートに播種した HeLa 細胞に濃度の異なる各種抗がん剤を添加した。48 時間後、MTT アッセイ試薬を各 well に添加し、マルチモードマイクロプレートリーダー (Molecular Devices, SpectraMax M5) を用いて細胞生存率を解析した。

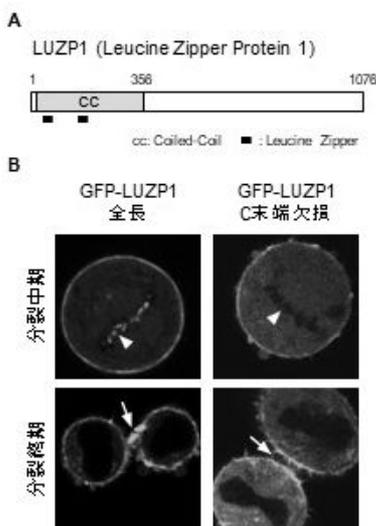


図 1 : LUZP1 の模式図と局在必要領域の解析
矢頭は動原体、矢印は Midbody を示す。

Kinase X の基質 Y とも相互作用するかを Pull-down assay により検討した。そこでまず大腸菌から基質 Y のタンパク質精製を行った (図 2 下)。次に LUZP1 を過剰発現させた 293T 細胞の粗抽出液を基質 Y が結合した GST ビーズと混合し、Pull-down assay を行った。その結果 LUZP1 タンパク質は GST タグを結合させたビーズとは共沈せず、GST-基質 Y 結合ビーズでのみ共沈することが確認できた (図 2 上)。この結果から LUZP1 はキナーゼ X だけでなくその基質 Y とも結合することが明らかとなった。

4. 研究成果

(1) LUZP1 の動原体、Midbody 局在には C 末端側領域が必要。

LUZP1 は図 1 A に示す様に N 末端側に coiled-coil ドメインを持っているが、それ以外に保存された特徴的な配列は持っていない。しかし申請者は事前実験により LUZP1 が分裂期 (M 期) 特異的な構造体である動原体、Midbody に局在することを明らかにしている。

申請者は LUZP1 のどの領域がこれらの局在に必要であるかを明らかにするため、LUZP1 を様々な領域で分割した発現プラスミドを作成し、それらの細胞内局在を解析した。その結果、LUZP1 の C 末端領域を欠損させると LUZP1 が動原体、Midbody のどちらにも局在できなくなることが判明した (図 1 B)。

(2) LUZP1 は Kinase X の基質 Y とも結合する。

申請者は事前実験により LUZP1 が Kinase X と結合することを見出している。そこで申請者は LUZP1 が

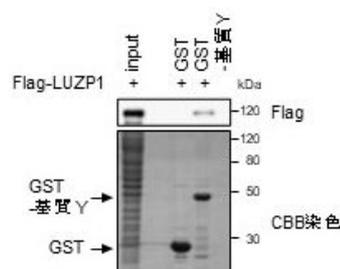


図 2 : LUZP1 と基質 Y との結合実験。
大腸菌から精製した GST と GST-基質 Y タンパク質の CBB 染色図。また Flag-LUZP1 の共沈を Flag 抗体により検出した。

(3) *in vitro* Kinase assay

(2)の結果から LUZP1 が Kinase X の基質 Y リン酸化に影響を与える可能性が示唆された。そこで各種精製タンパク質を用いて *in vitro* Kinase Assay を行った。申請者はまず Kinase X と基質 Y のみで Kinase assay を行い、Kinase X が GST タグをリン酸化せず、基質 Y のみをリン酸化することを確認した (図 3 A)。次に、LUZP1 の量を徐々に増やしたサンプルで Kinase assay を行ったところ、LUZP1 の容量依存的に Kinase X の基質 Y リン酸化が阻害されることが判明した (図 3 B, C)。また Kinase X とは結合できない LUZP1 を準備し、その LUZP1 でも Kinase assay を行ったところ、興味深いことに Kinase X 非結合 LUZP1の方が Kinase X の基質 Y リン酸化を強く阻害することが明らかになった (図 3 B, C)。この結果から、LUZP1 は基質 Y のリン酸化を阻害する機能を持っているが、LUZP1 と Kinase X の結合はその阻害効果を弱める働きがあることが示唆された。

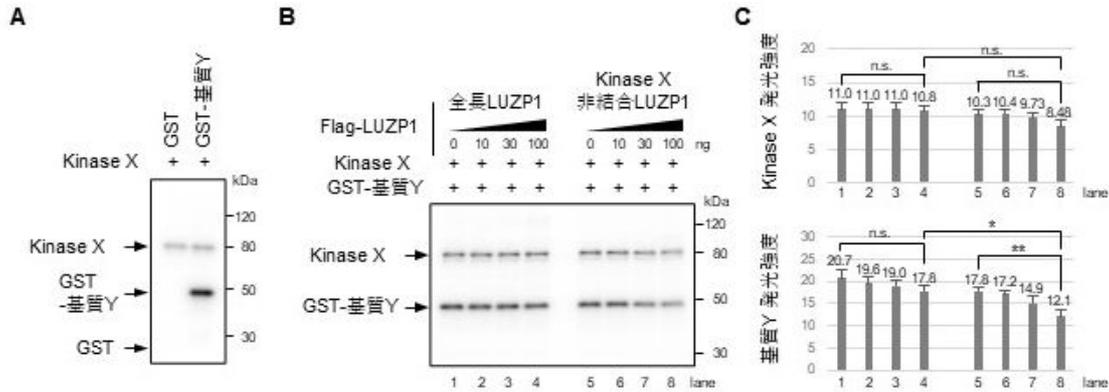


図 3 : LUZP1、Kinase X、基質 Y の *in vitro* Kinase assay.
 A, R 標識した ATP、Kinase X、GST または GST-基質 Y を混合し、Kinase X による基質 Y へのリン酸化反応を行った。
 B, R 標識した ATP、Kinase X、GST-基質 Y、さらに LUZP1 全長または Kinase X 非結合 LUZP1 を濃度を変えて加えて混合し、Kinase X による基質 Y へのリン酸化反応を行った。
 C, B の Kinase Assay を 3 回を行い、各バンドの濃さを ImageJ で解析し R 蛍光強度の統計解析を行った。n.s.: 有意差なし;
 *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$

(4) 申請者は LUZP1 による細胞質分裂時の収縮速度の制御は、分裂の安全性を高める効果があるのではないかと考えた。そこで siRNA を用いて LUZP1 の発現を抑制し、そこに各種抗がん剤を添加することで抗がん剤の効果を増強できるのではないかと考えた。以上の仮説を MTT assay による細胞数を測定することで検証したところ、Cisplatin, Cyclophosphamide, Doxorubicin, Everolimus を作用させた場合において、LUZP1 の発現抑制の有無で細胞障害効果が増強することは確認できなかった (図 4)。

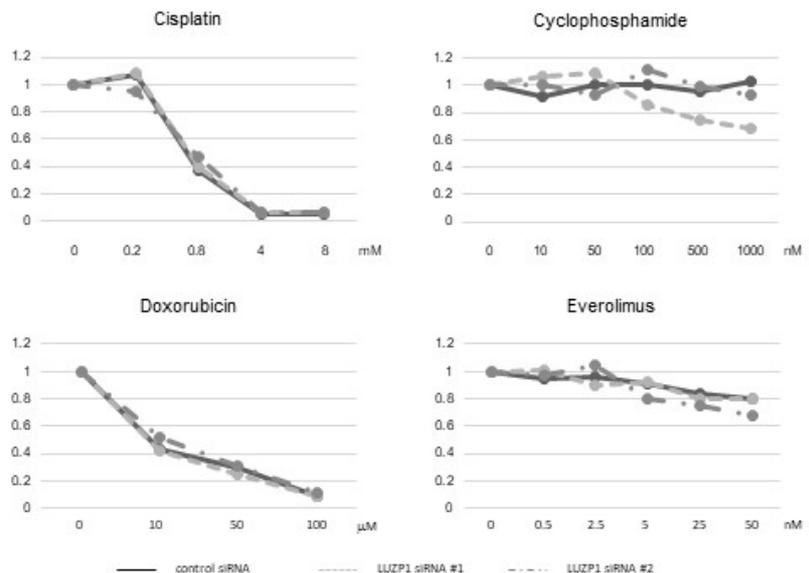


図 4 : LUZP1 抑制と各種抗がん剤の併用による細胞生存率の検討。
 HeLa 細胞の LUZP1 発現を siRNA を用いて抑制し、24 時間後に表記の抗がん剤を加え 48 時間培養した。そして MTT assay により細胞生存率を測定した。

(5) まとめと考察

以上の研究より、LUZP1 の動原体、Midbody への局在必要領域が明らかになった。また LUZP1 が Kinase X とその基質 Y どちらとも結合することが判明し、特徴的な機能ドメインを持たない LUZP1 が足場タンパク質として機能している可能性が示唆された。さらに *in vitro* Kinase assay により、LUZP1 が Kinase X の基質 Y リン酸化を制御することで細胞質分裂の収縮速度を制御している可能性が示唆された。申請者は LUZP1 による収縮速度の制御の意義は分裂時の安全性を高める (失敗を減らす) 効果と予測した。そこで LUZP1 の発現抑制した細胞に抗がん剤を作用させた場合の細胞障害効率を検証した。しかし LUZP1 の発現抑制により細胞障害の効率は変化しなかった。LUZP1 の収縮速度を制御する意義はいまだ不明であるが、本研究により細胞分裂期における LUZP1 の機能が一部明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Hyodo Toshinori, Rahman Md. Lutfur, Karnan Sivasundaram, Ito Takuji, Toyoda Atsushi, Ota Akinobu, Wahiduzzaman Md, Tsuzuki Shinobu, Okada Yohei, Hosokawa Yoshitaka, Konishi Hiroyuki	4. 巻 30
2. 論文標題 Tandem Paired Nicking Promotes Precise Genome Editing with Scarce Interference by p53	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1195 ~ 1207.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.12.064	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 Rahman Md. Lutfur, Hyodo Toshinori, Hasan Muhammad Nazmul, Mihara Yuko, Karnan Sivasundaram, Ota Akinobu, Tsuzuki Shinobu, Hosokawa Yoshitaka, Konishi Hiroyuki	4. 巻 41
2. 論文標題 Flow cytometry-based quantification of targeted knock-in events in human cell lines using a GPI-anchor biosynthesis gene <i>PIGP</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BSR20212231	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 Rahman Md. Lutfur, Hyodo Toshinori, Karnan Sivasundaram, Ota Akinobu, Hasan Muhammad Nazmul, Mihara Yuko, Wahiduzzaman Md, Tsuzuki Shinobu, Hosokawa Yoshitaka, Konishi Hiroyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Experimental strategies to achieve efficient targeted knock-in via tandem paired nicking	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-01978-w	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 Tsuzuki S, Yasuda T, Kojima S, Kawazu M, Akahane K, Inukai T, Imaizumi M, Morishita T, Miyamura K, Ueno T, Karnan S, Ota A, Hyodo T, Konishi H, Sanada M, Nagai H, Horibe K, Tomita A, Suzuki K, Muramatsu H, Takahashi Y, Miyazaki Y, Matsumura I, Kiyoi H, Hosokawa Y, Mano H, Hayakawa F	4. 巻 1
2. 論文標題 Targeting MEF2D-fusion Oncogenic Transcriptional Circuitries in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Blood Cancer Discovery	6. 最初と最後の頁 82 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/2643-3230.BCD-19-0080	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 Ota Akinobu, Hanamura Ichiro, Karnan Sivasundaram, Inaguma Shingo, Takei Norio, Lam Vu Quang, Mizuno Shohei, Kanasugi Jo, Wahiduzzaman Md, Rahman Md Lutfur, Hyodo Toshinori, Konishi Hiroyuki, Tsuzuki Shinobu, Ikeda Hiroshi, Takami Akiyoshi, Hosokawa Yoshitaka	4. 巻 40
2. 論文標題 Novel Interleukin-6 Inducible Gene PDZ-Binding Kinase Promotes Tumor Growth of Multiple Myeloma Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Interferon & Cytokine Research	6. 最初と最後の頁 389 ~ 405
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1089/jir.2020.0111	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 Karnan Sivasundaram, Ota Akinobu, Murakami Hideki, Rahman Md Lutfur, Hasan Muhammad Nazmul, Wahiduzzaman Md, Hanamura Ichiro, Quang Vu Lam, Inoko Akihito, Hyodo Toshinori, Konishi Hiroyuki, Tsuzuki Shinobu, Hosokawa Yoshitaka	4. 巻 6
2. 論文標題 Identification of CD24 as a potential diagnostic and therapeutic target for malignant pleural mesothelioma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41420-020-00364-1	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 Karnan S, Hanamura I, Ota A, Takasugi S, Nakamura A, Takahashi M, Uchino K, Murakami S, Wahiduzzaman M, Quang VL, Rahman ML, Hasan MN, Hyodo T, Konishi H, Tsuzuki S, Yoshikawa K, Suzuki S, Ueda R, Ejiri M, Hosokawa Y, Takami A	4. 巻 7
2. 論文標題 CD52 is a novel target for the treatment of FLT3-ITD-mutated myeloid leukemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death Discovery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41420-021-00446-8	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 Rahman Md. Lutfur, Hyodo Toshinori, Hasan Muhammad Nazmul, Mihara Yuko, Karnan Sivasundaram, Ota Akinobu, Tsuzuki Shinobu, Hosokawa Yoshitaka, Konishi Hiroyuki	4. 巻 -
2. 論文標題 Correction of a CD55 mutation to quantify the efficiency of targeted knock-in via flow cytometry	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Biology Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11033-022-07422-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 兵頭 寿典、Md Lutfur Rahman、Karnan Sivasundaram、太田 明伸、都築 忍、細川 好孝、小西 裕之
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 nickaseによるノックインはp53を活性化しない
3. 学会等名 第4回日本ゲノム編集学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

愛知医科大学 生化学講座 https://www.aichi-med-u.ac.jp/su06/su0607/su060702/03.html#iLink04 DNAの2本鎖切断を起こさない安全で正確なゲノム編集法に関する研究成果について https://www.aichi-med-u.ac.jp/su03/su03_2020/su03_2020_01/1210815_5196.html DNAの2本鎖切断を起こさないゲノム編集方法 ~安全なゲノム編集治療への応用に期待~ https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2020/01/research-highlights_ja/pr20200129.html DNAの2本鎖切断を起こさないゲノム編集方法 https://www.genome-sci.jp/research_results#2 教員紹介 https://www.aichi-med-u.ac.jp/data/profile/Staff_0281.html
--

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
---------	---------