

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14705

研究課題名(和文) 分裂期紡錘体の二極性を保証する多様な分子基盤の解明

研究課題名(英文) Understanding of molecular machineries that ensure mitotic spindle bipolarity in human cells independently of centrosome number

研究代表者

知念 拓実 (Chinen, Takumi)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・助教

研究者番号：40775607

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)：本研究課題の目的は分裂期紡錘体の極として働く中心体の数に関わらず、細胞が二極紡錘体を形成する原理を解明することである。そのために、中心体数を増減したヒト培養細胞をモデルとした、CRISPR/Cas9ゲノムワイドスクリーニングを行った。その結果、中心体増加時に細胞死を誘導する可能性を持つ、中心体局在因子12種類の同定に成功した。さらなる詳細解析の結果、ヒット因子の一つであるCEP76は分裂期キナーゼであるPLK1の活性を適切に制御することで、正常な紡錘体配向を保証することが示唆された。今後はCEP76により制御されるメカニズムが、中心体増加時の細胞分裂に対してどのように負に働くかを検討する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞分裂時には、二つの中心体が極として機能することで二極性の紡錘体が形成される。一方で、がん細胞では中心体の異常な増加が多くみられ、近年ではその分裂メカニズムは新たな抗がん剤の標的として研究されている。本研究では中心体が増加したときに細胞死を誘導する可能性を持つ因子を同定し、さらにヒット因子の一つであるCEP76が分裂期においてPLK1活性や紡錘体配向を制御することを見出した。今後は中心体増加時にCEP76がどのように負に働くかを解析することで、中心体が増加したがん細胞における分裂メカニズムの理解を深める。そのため、本知見は直接抗がん剤の標的因子の情報を提供することに繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is understanding the mechanism through which human cells can establish spindle bipolarity, regardless of the number of centrosomes. Therefore, we had performed CRISPR/Cas9 genome wide screening upon amplification or depletion of centrosomes in human cells. By the analysis, several centrosomal factors, which might induce cell death after centrosome amplification, have been identified. Further detailed analyses revealed that CEP76, one of the hit factors, regulates PLK1 activity to ensure proper spindle orientation. Further studies are required to examine the effect of CEP76 on cell division in the centrosome amplified cells.

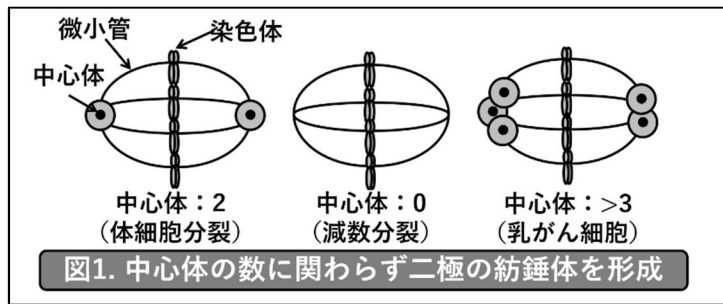
研究分野：細胞生物学

キーワード：中心体 中心体数増減 分裂期紡錘体 紡錘体二極性 PLK1 CEP76 CRISPR/Cas9ゲノムワイドスクリーニング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞は、分裂時に、複製した染色体を正確に娘細胞に分配する。染色体を二分するために分裂期紡錘体は二極である必要がある。体細胞分裂においてはその極に中心体が位置している(図1.左)。一方で卵母細胞の減数分裂においては中心体が存在しない(図1.中)。また、乳がん細胞では中心体の増加がみられる(図1.右)。しかし、いずれの場合も、細胞は常に二極の紡錘体を形成する。普遍的なシステムと条件特異的メカニズムの組み合わせにより、中心体の数によらず紡錘体の二極性が保証されていると考えられるが、詳細な分子メカニズムは明らかではない。



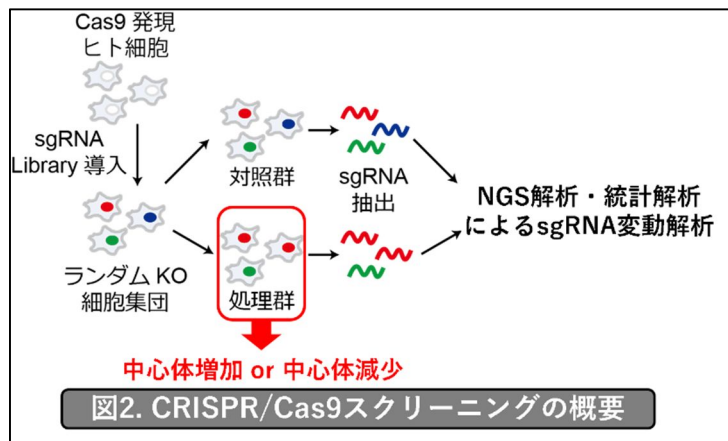
2. 研究の目的

細胞が、中心体の数に関わらず常に二極の紡錘体を形成するためのメカニズムを明らかにすることが本研究の目的である。具体的には、CRISPR/Cas9 スクリーニングを基軸として、中心体の増減時に重要な働きを担う因子群の網羅的探索と機能解析を行う。これらのアプローチにより、中心体が増減した際に機能する分子メカニズムを解析し、細胞が紡錘体の二極性を保証するメカニズムの包括的な理解を目指す。

3. 研究の方法

上記の問いにアプローチするために、中心体を増減した細胞における CRISPR/Cas9 スクリーニングによる関連因子の網羅的探索を行った。

中心体複製は PLK4(Polo-like kinase 4)により制御されており、その発現量や機能を人為的に調節することにより、細胞内の中心体数の増減を引き起こすことが可能である。本スクリーニングではまず、Cas9 を安定発現するヒト由来培養細胞 DLD-1 Tet-GFP-PLK4 において、ゲノム上の全遺伝子に対して設計された sgRNA ライブラリーを導入し、一細胞につき一遺伝子をノックアウトするよう条件を整えた。その後、中心体数の増加(PLK4 過剰発現)、または中心体数の減少(PLK4 阻害剤処理)を誘導し、各々の条件下において二週間細胞を培養した。各処理群から検出される sgRNA のリード数を CRISPR/Cas9 スクリーニング用解析ソフト MaGeCK で定量的に解析後、サンプル間で統計的有意差を示す遺伝子を抽出した(図2、CRISPR/Cas9 スクリーニングの概要)。



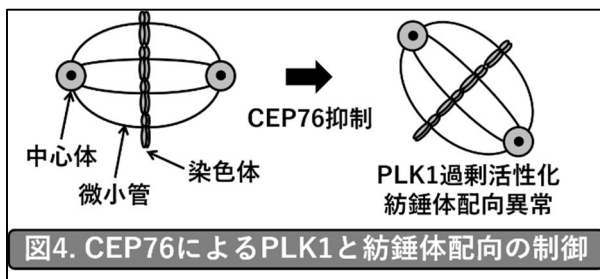
4. 研究成果

(1)上記のスクリーニングの結果、中心体が増加したときの生育低下を回復する遺伝子破壊として 48 遺伝子(グループ1)、中心体が増加したときの生育を阻害する遺伝子破壊として 6 遺伝子(グループ2)、中心体を減少させたときの生育低下を回復する遺伝子破壊として 13 遺伝子(グループ3)、中心体を減少させたときの生育を阻害する遺伝子破壊として 4 遺伝子(グループ4)を見出した(図3)。得られたこれらの因子のうち、特にグループ1に着目し、個々の遺伝子の解析を行い、中心体複製には直接作用しないが、中心体上に局在し、中心体数増加時に細胞死を誘導する可能性を持つ新規因子 12 種類の同定に成功した。

	中心体増加処理	中心体減少処理
増殖回復	Group 1 48遺伝子	Group 3 13遺伝子
増殖低下	Group 2 6遺伝子	Group 4 4遺伝子

図3. ヒット遺伝子数

(2)得られた12因子に着目して、分裂期における詳細な機能の解析を行った。RNA干渉によりヒット因子の発現を抑制して分裂期の詳細解析を行ったところ、ヒット因子のひとつであるCEP76の発現抑制により、分裂期進行に重要なキナーゼであるPLK1の異常な凝集形成が生じることを見出した。続いてCEP76とPLK1の関係性に焦点を当てた詳細解析を行い、CEP76-PLK1間の結合や、CEP76の発現抑制がPLK1の活性化を介して紡錘体配向の異常を引き起こすことを明らかにした(図4)。これらのことから、細胞はCEP76を介したシステムによりPLK1の凝集形成を抑制してその活性を適切に制御することで、正常な紡錘体配向を保證することが示唆された。現在、CEP76により制御されるPLK1動態と紡錘体配向メカニズムが、中心体増加時の細胞分裂に対してどのように負に働くかを検討中である。CEP76を基軸とした解析により、中心体増加時の紡錘体の詳細な理解が可能であり、本研究により中心体が増加したがんにおける分裂メカニズムの理解が進むと予想される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Chinen Takumi, Yamamoto Shohei, Takeda Yutaka, Watanabe Koki, Kuroki Kanako, Hashimoto Kaho, Takao Daisuke, Kitagawa Daiju	4. 巻 39
2. 論文標題 NuMA assemblies organize microtubule asters to establish spindle bipolarity in acentrosomal human cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e102378
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embj.2019102378	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7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 竹田穰、知念拓実、北川大樹
2. 発表標題 中心体構成因子による細胞分裂期のPLK1凝集抑制
3. 学会等名 第92回日本生化学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 知念拓実、山本昌平、竹田穰、渡辺紘己、高尾大輔、北川大樹
2. 発表標題 NuMAを含むタンパク質複合体は非中心体性紡錘体の二極性形成を促進する
3. 学会等名 第92回日本生化学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒木花菜子、高尾大輔、知念拓実、豊田敦、寺井悟朗、岩切淳一、浅井潔、北川大樹
2. 発表標題 ゲノムワイドCRISPRスクリーニングによる一次繊毛解体・細胞周期再エントリー制御因子の同定
3. 学会等名 第92回日本生化学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 竹田穰、山崎香穂、橋本佳歩、渡辺紘己、知念拓実、北川大樹
2. 発表標題 分裂期における中心体構成因子CEP76を介したPLK1の制御
3. 学会等名 第140回日本薬学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 知念拓実、北川大樹
2. 発表標題 ヒト非中心体性細胞における染色体分配機構
3. 学会等名 日本遺伝学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chinen T, Yamamoto S, Watanabe K and Kitagawa D
2. 発表標題 Mechanisms of the spindle bipolarity establishment in human acentrosomal cells
3. 学会等名 Joint Meeting of JSCB 70th & JSDB 51st
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chinen T, Yamamoto S, Watanabe K, and Kitagawa D.
2. 発表標題 Mechanisms of the spindle bipolarity establishment in human acentrosomal cells
3. 学会等名 EMBO EMBL Symposium Microtubules: From Atoms to Complex Systems (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
--	---------------------------	-----------------------	----