

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15042

研究課題名(和文) 中心体複製開始の分子制御機構を利用した新たな抗癌剤開発

研究課題名(英文) The mechanism underlying centrosome localization and its application to screening for anticancer agent

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：中心体数の異常は染色体不安定性を惹起し、癌の悪性度を高める。このため正常細胞では中心体複製は厳密に制御されるがその分子機構は不明である。本研究では中心体複製期に起こる中心体複製制御分子の中心体移行機構の解明を目指し研究を行った。その成果として同移行に関わる領域と、同移行を制御する新たな分子群の特定に成功した。またこの中心体移行の根底にある基本原理を利用した抗癌剤開発も試みており、有望なシード化合物の同定にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中心体の構造的・機能的異常は発癌リスクを高めるだけでなく、繊毛病または男性不妊等の主要因となる。このため中心体の機能およびその複製機構を明らかにすることは上記疾患の病態メカニズムの解明にも繋がる。そこで本研究では中心体複製期に起こる中心体複製制御分子の中心体移行機構の解明を目指して実験を実施し、同機構の根底になる基本原理を解明することに成功した。更にこの基本原理を利用することで抗癌剤として有望なシード化合物の同定にも成功した。

研究成果の概要(英文)：Centrosomes serve as the microtubule-organizing centers responsible for mitotic spindle formation and chromosome segregation. Hence centrosome amplification causes erroneous kinetochore-microtubule attachment, thereby promoting chromosome missegregation. Indeed various cancer cells have extra centrosomes, suggesting that the numerical aberration of centrosomes increase the risk of tumorigenesis. Therefore, centriole duplication is strictly regulated to once per cell cycle, but the molecular mechanism is not fully understood.

We have tried to elucidate that mechanism and found the region required for the recruitment to centrosomes. In addition, we identified several proteins involved in centrosome localization by performing mass spectrometry-based screening. Furthermore, we utilized the molecular basis of centrosome localization and identified some seed compounds that can be promising agent for cancer therapy.

研究分野：細胞生物学

キーワード：中心体 染色体不安定性 発癌 中心体複製 繊毛病 男性不妊

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

中心体は2つの微小管構造母および娘中心小体とその周囲に局在する動的構造体 Pericentriolar material (PCM) から構成される細胞内小器官で、細胞分裂、繊毛形成など多様な機能を持つ。中心体は体細胞分裂期に双極性の紡錘体極として細胞内微小管ネットワークを制御することにより染色体の均等分配を担う。中心体の異常は染色体の不均等分配(染色体不安定性)を誘発して、発癌および癌の悪性化を招く大きな要因となる。このため中心体数はG1期に1つ、S期に複製されて2つになる様に細胞周期を通して厳密に制御される。仮に正常細胞がストレス環境に曝された場合でも中心体複製は厳格に制御されて中心体数は保持されるが、その分子機構はこれまで不明であった。

### 2. 研究の目的

近年我々は、ストレス刺激に応答して活性化する2つの細胞内ストレス適応システム、即ちストレス応答 MAPK (SAPK: p38/JNK) 経路と p53 経路が、協調して「中心体複製の鍵分子 PLK4 を起点に開始する中心体複製」を調節しており、ストレス環境下での中心体複製制御と染色体安定性の保持に極めて重要な役割を担うことを見出した (Nature Communications 2013)。また申請者は中心体複製の開始において PLK4 の中心体局在とキナーゼ活性が必須であることも明らかにしてきた (Nature Communications 2013)。更に世界的にも PLK4 によって制御される中心体複製機構に関して研究が盛んに行われているが、「中心体複製の開始時期に新たに翻訳された PLK4 が中心体輸送される分子機構」に関して未だ不明な点が多い。そこで中心体複製の根底をなす分子制御機構を明らかにするため、我々は「中心体複製に先行して起こる PLK4 の中心体移行機構」の解明を目指した研究を行った。

また中心体数の異常増加は染色体の不安定性を高める要因となるため、中心体数の異常は癌の悪性度と正の相関関係にあることが知られている。そこで本研究では異常増加した中心体を標的とする抗癌剤の開発も目指した。

### 3. 研究の方法

PLK4の中心体輸送に関わる蛋白質を同定することでPLK4の中心体移行機構を明らかにする。そこで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結合分子をsiRNAによって遺伝子欠損させた場合にPLK4の中心体輸送が阻害されるか検証を行って、PLK4の中心体移行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で、PLK4の中心体輸送に関わる分子制御機構を明らかにする。

### 4. 研究成果

#### (1) PLK4の中心体移行メカニズムの解明

まずPLK4の中心体移行に関わる領域を特定するために、PLK4の系統的欠損変異体を pcDNA4Myc の下流に導入したコンストラクトを作製した。次に各変異体をU2OS細胞に遺伝子導入した後に細胞を固定してMyc抗体と中心体マーカー  $\gamma$ -tubulin 抗体を用いた蛍光免疫染色によって各変異体の中心体移行性を検証した。その結果PLK4の中心体移行領域を特定した。次にPLK4の中心体移行領域に特異的に結合する分子を同定することを試みた。そこでまず中心体移行領域を安定発現させた細胞株を樹立した。この中心体移行領域の安定発現細胞株から細胞可溶液を作製した後、免疫沈降によって中心体移行領域および同領域に特異的に結合した分子を精製した。次に中心体移行領域に結合した分子を試験管内でトリプシン消化してペプチドに断面化した後に、ペプチドをイオン化して質量分析機によって検出した。得られた質量分析データを Mascot 解析にかけて、中心体移行領域に特異的に結合した分子を同定した。この中心体移行領域の結合分子を特異的に認識する siRNA を U2OS 細胞に導入して PLK4 の中心体移行量 (蛍光免疫染色シグナル) を画像解析によって定量したところ、PLK4 の中心体輸送が大きく阻害されるものを見出すことができた。更にこの新規中心体移行領域結合分子を介して制御される PLK4 の中心体輸送機構も詳細に解明することができた。

#### (2) 中心体を標的とした抗癌剤開発

通常、細胞に中心体複製ミスなどにより異常数の中心体が存在すると多極性紡錘体形成に伴う細胞分裂が起こり娘細胞に必要な数の染色体が分配されないため、多くの娘細胞で細胞死を招くことが知られている。一方多くの中心体数の異常を持つ癌細胞では異常増加した中心体をひとまとめにして見かけ上2極の紡錘体を形成するため、次世代の娘細胞は生存する。またこの時、染色体の輸送遅延が頻発するため、染色体の異数性、欠失、転座などの遺伝子変異が起こりやすくなり癌の悪性度が高まる。このように中心体数の異常と癌の悪性度には正の相関関係が見られるため、中心体を標的とした新たな抗癌剤が癌治療に有用であると考えられた。現

在創薬スクリーニングを行っており、これまでに新たな抗癌剤の候補分子を幾つか同定することに成功した。今後も得られたリード化合物を基に側鎖を改変するなどして副作用（毒性）の低く制癌作用の高い新規抗癌剤を見出す予定である。

### (3) 個体発生時に組織特異的な遺伝子発現を誘導する仕組みの解明

我々はMAPKの標的分子を探索する新たな手法として酵母three hybrid法を確立して、ERKの新規基質 MAPK-regulated co-repressor interacting protein 1 (MCRIP1)を同定した。また我々はMCRIP1が転写抑制共役因子CtBPと直接結合すること、またその結果CtBPと転写抑制因子Zeb間の結合を競合阻害して、CtBP依存的な転写抑制を解除することを明らかにした。更に上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition: EMT) における(上皮系細胞マーカー) E-カドヘリンの発現にも上記のCtBP-Zebによる調節機構が作用しており、ERKはMCRIP1をリン酸化することによりERK依存性上皮間葉転換 (EMT) を制御することも明らかにした (Molecular Cell 2015)。

次にMCRIP1ノックアウトマウスを作成して個体レベルにおけるMCRIP1の機能解析を行ったところ、大半のMCRIP1欠損マウスが生後24時間以内に呼吸不全で死亡することを見出した。また肺形成時においてMCRIP1がCtBPと転写抑制因子FOXP1/2間の結合を競合阻害してCtBP依存的なサーファクタント蛋白質の転写抑制を解除すること、更にその結果肺泡がサーファクタント蛋白質で満たされるため肺泡表面の抵抗が軽減して肺呼吸 (肺泡拡張) が可能になることを新たに見出した (Communications Biology 2019)。

### (4) 活性酸素が細胞死および炎症を誘導する分子機構の解明

我々は、ストレス応答MAPKKKの1つであるMTK1の機能解析も進めており、MTK1が酸化ストレスセンサーとして機能することも見出した。細胞が酸化ストレス環境に曝されるとMTK1が一時的に酸化され、その後還元酵素 Trxによって酸化型MTK1から還元型に戻ることでMTK1が活性化されることを明らかにした。この酸化還元に関与して活性化したMTK1は酸化ストレス環境下におけるストレス応答MAPK (p38およびJNK) の持続的な活性化を担っており、酸化ストレス環境における細胞死または炎症性サイトカイン産生など細胞運命決定に重要な役割があることを明らかにした (Science Advances 2020)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

|  |                        |
|--|------------------------|
| 1. 著者名<br>Moe Matsushita, Takanori Nakamura, Hisashi Moriizumi, Hiroaki Miki and Mutsuhiro Takekawa  | 4. 巻<br>6              |
| 2. 論文標題<br>Stress-responsive MTK1 SAPKKK serves as a redox sensor that mediates delayed and sustained activation of SAPKs by oxidative stress. | 5. 発行年<br>2020年        |
| 3. 雑誌名<br>Science Advances   | 6. 最初と最後の頁<br>eaay9778 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1126/sciadv.aay9778  | 査読の有無<br>有             |
| オープンアクセス<br>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<br>-              |

|   |                   |
|---|-------------------|
| 1. 著者名<br>Jane S. Weng, Takanori Nakamura, Hisashi Moriizumi, Hiroshi Takano, Ryoji Yao and Mutsuhiro Takekawa          | 4. 巻<br>2         |
| 2. 論文標題<br>MCRIP1 promotes the expression of lung surfactant proteins by disrupting CtBP-mediated epigenetic silencing. | 5. 発行年<br>2019年   |
| 3. 雑誌名<br>Communications Biology  | 6. 最初と最後の頁<br>227 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1038/s42003-01900478-3  | 査読の有無<br>有        |
| オープンアクセス<br>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<br>-         |

〔学会発表〕 計21件（うち招待講演 4件/うち国際学会 4件）

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>Takanori Nakamura, Nishizumi-Tokai Noriko, Takashi Nakazawa, Tatsuki Mori, Takashi Suzuki and Mutsuhiro Takekawa |
| 2. 発表標題<br>Mathematical modeling of the recruitment of centriole biogenesis regulators to mother centrioles in the S-phase  |
| 3. 学会等名<br>JSPS Core-to-Core Program "Establishing International Research Network of Mathematical Oncology"（招待講演）（国際学会）     |
| 4. 発表年<br>2020年   |

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>吉岡 大介、中村 貴紀、武川 睦寛         |
| 2. 発表標題<br>ストレス顆粒の新規構成因子およびその生理機能の解析 |
| 3. 学会等名<br>第43回日本分子生物学会年会            |
| 4. 発表年<br>2020年                      |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>中村 貴紀、渡海 紀子、中澤 嵩、森 竜樹、鈴木 貴、武川 睦寛 |
| 2. 発表標題<br>数理解析を活用した中心体複製開始を制御する分子機構の解明     |
| 3. 学会等名<br>第78回日本癌学会総会                      |
| 4. 発表年<br>2019年                             |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>中村 貴紀、西住(渡海) 紀子、中澤 嵩、森 竜樹、鈴木 貴、武川 睦寛    |
| 2. 発表標題<br>中心体複製初期に起こるPLK4の中心体輸送機構                 |
| 3. 学会等名<br>第19回日本蛋白質科学年會・第71回日本細胞生物学会 合同年次大会(招待講演) |
| 4. 発表年<br>2019年                                    |

|                                 |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名<br>橋本 夏葉、中村 貴紀、武川 睦寛    |
| 2. 発表標題<br>ストレス顆粒形成を制御する分子機構の解析 |
| 3. 学会等名<br>第42回日本分子生物学会年会       |
| 4. 発表年<br>2019年                 |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>渡海 紀子、中村 貴紀、武川 睦寛                        |
| 2. 発表標題<br>ストレス応答MAPキナーゼによるmiRNAの発現調節とアポトーシス誘導機構の解明 |
| 3. 学会等名<br>第78回日本癌学会総会                              |
| 4. 発表年<br>2019年                                     |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>森泉 寿士、中村 貴紀、曹 永旻、鈴木 貴、武川 睦寛   |
| 2. 発表標題<br>Mathematical analysis of the spatio-temporal regulation of the SAPK pathway |
| 3. 学会等名<br>令和元年医科学研究所研究成果発表会   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>中村 貴紀、西住 紀子、中澤 嵩、森 竜樹、鈴木 貴、武川 睦寛 |
| 2. 発表標題<br>数理解析を用いた中心体複製の開始制御機構の解明          |
| 3. 学会等名<br>日本応用数理学会 (招待講演)                  |
| 4. 発表年<br>2018年                             |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Takanori Nakamura, Nishizumi-Tokai Noriko, Takashi Nakazawa, Tatsuki Mori, Takashi Suzuki and Mutsuhiro Takekawa                |
| 2. 発表標題<br>Mathematical modeling of the recruitment of centriole biogenesis regulators to mother centrioles in centriole duplication phase |
| 3. 学会等名<br>JSPS Core-to-Core Program "Establishing International Research Network of Mathematical Oncology" (招待講演) (国際学会)                  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Hisashi Moriizumi, Takanori Nakamura, Cho Youngmin, Takashi Suzuki and Mutsuhiro Takekawa               |
| 2. 発表標題<br>Mathematical analysis of the spatio-temporal regulation of SAPK pathway                                 |
| 3. 学会等名<br>JSPS Core-to-Core Program "Establishing International Research Network of Mathematical Oncology" (国際学会) |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Takanori Nakamura, Nishizumi-Tokai Noriko, Takashi Nakazawa, Tatsuki Mori, Takashi Suzuki and Mutsuhiro Takekawa          |
| 2. 発表標題<br>The molecular mechanism that recruits centriole biogenesis regulators to mother centrioles in centriole duplication phase |
| 3. 学会等名<br>新学術領域「数理シグナル」第1回国際シンポジウム(国際学会)  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>森泉 寿士、中村 貴紀、曹 永旻、鈴木 貴、武川 睦寛 |
| 2. 発表標題<br>数理解析を活用したSAPKシグナル時空間制御機構の解明 |
| 3. 学会等名<br>新学術領域「数理シグナル」第2回若手ワークショップ   |
| 4. 発表年<br>2018年                        |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>中村 貴紀、西住 紀子、中澤 嵩、森 竜樹、鈴木 貴、武川 睦寛 |
| 2. 発表標題<br>数理解析を用いた中心体複製の開始制御機構の解明          |
| 3. 学会等名<br>新学術領域「数理シグナル」第2回若手ワークショップ        |
| 4. 発表年<br>2018年                             |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>渡海 紀子、中村 貴紀、武川 睦寛                          |
| 2. 発表標題<br>ストレス応答MAPキナーゼp38, JNKによるアポトーシス関連miRNAの発現抑制 |
| 3. 学会等名<br>第77回日本癌学会学術総会                              |
| 4. 発表年<br>2018年                                       |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>中村 貴紀、西住 紀子、中澤 嵩、森 竜樹、鈴木 貴、武川 睦寛 |
| 2. 発表標題<br>数理解析を駆使した中心体複製開始を制御する分子機構の解明     |
| 3. 学会等名<br>第41回日本分子生物学会年会                   |
| 4. 発表年<br>2018年                             |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>森泉 寿士、中村 貴紀、曹 永旻、鈴木 貴、武川 睦寛 |
| 2. 発表標題<br>数理解析を活用したSAPKシグナル時空間制御機構の解明 |
| 3. 学会等名<br>第41回日本分子生物学会年会              |
| 4. 発表年<br>2018年                        |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>渡海 紀子、中村 貴紀、武川 睦寛                   |
| 2. 発表標題<br>ストレス応答MAPキナーゼによるアポトーシス抑制性miRNAの発現制御 |
| 3. 学会等名<br>第41回日本分子生物学会年会                      |
| 4. 発表年<br>2018年                                |

|                                     |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>藤川 大地、中村 貴紀、武川 睦寛        |
| 2. 発表標題<br>ストレス顆粒形成によるアポトーシス抑制機構の解明 |
| 3. 学会等名<br>第41回日本分子生物学会年会           |
| 4. 発表年<br>2018年                     |

|                                      |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>田口 真梨、中村 貴紀、武川 睦寛         |
| 2. 発表標題<br>ストレス顆粒を構成する新規因子の同定とその機能解析 |
| 3. 学会等名<br>第41回日本分子生物学会年会            |
| 4. 発表年<br>2018年                      |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Daichi Fujikawa, Takanori Nakamura, Mutsuhiro Takekawa                                  |
| 2. 発表標題<br>Formation of stress granules suppresses apoptosis by sequestering proapoptotic proteins |
| 3. 学会等名<br>平成30年度 東京大学医科学研究所 研究成果発表会   |
| 4. 発表年<br>2018年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>森泉 寿士、中村 貴紀、武川 睦寛           |
| 2. 発表標題<br>数理解析を活用したSAPKシグナル時空間制御機構の解明 |
| 3. 学会等名<br>第18回東京大学 生命科学シンポジウム         |
| 4. 発表年<br>2018年                        |

〔図書〕 計1件

|                                |                 |
|--------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名<br>吉岡大介、中村貴紀、武川睦寛       | 4. 発行年<br>2021年 |
| 2. 出版社<br>実験医学                 | 5. 総ページ数<br>9   |
| 3. 書名<br>ストレス顆粒形成による生命機能制御と 疾患 |                 |

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学医科学研究所分子シグナル制御分野ホームページ  
<https://www.ims.u-tokyo.ac.jp/dcsmm/DCSMM/index.html>

Researchmap  
<https://researchmap.jp/NakamuraTakanori>

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(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                                  |                          |                       |  |
|---------|--|--------------------------|-----------------------|--|
| 米国      | M.D.Anderson Cancer Center               | Johns Hopkins University | Vanderbilt University |  |
| 英国      | St. Andrews University                   |                          |                       |  |
| フランス    | Reseach Center INRIA Bordeaux South West |                          |                       |  |
| ドイツ     | Deutsches Krebsforschungszentrum (DKFZ)  |                          |                       |  |