

多様な紡錘体形成マシナリーの統合的解析と次世代型分裂期阻害剤の創生

Comprehensive analysis of molecular machineries for mitotic spindle formation in human cells and its application to development of next generation anti-cancer drug.

課題番号：19H05651

北川 大樹（KITAGAWA Daiju）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・教授



研究の概要

本研究では、中心体複製の分子機構とその基本原理を解明する。また、多種類のヒトがん細胞をモデルとした比較解析を行うことで、細胞種に特異的で多様な分裂期紡錘体形成マシナリーの同定を行う。さらに、それらを制御する分子基盤を統合的に解析し、中心体に依存的・非依存的な分裂期紡錘体の形成機構を解明する。

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞分裂、分裂期紡錘体、中心体、染色体分配、抗がん剤開発

1. 研究開始当初の背景

近年、機能ゲノミクス、プロテオミクスを利用した網羅的解析から中心体の形成、機能に関与する複数の因子が同定された。しかしながら、中心体複製に関する根源的な問いの多くは未だ解明されていない。また、最近の研究から、ヒトがん細胞から中心体を物理的に除去しても、細胞分裂が進行することが観察されている。すなわち、ヒトがん細胞は中心体が無くても分裂期紡錘体を形成し、染色体を分配するバックアップシステムを内包している。しかし、その具体的なメカニズムや分子機構に関しては未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトがん培養細胞を用いて、中心体依存的・非依存的な紡錘体形成機構を統合的に解明する。まず、中心体複製の進化的保存性、高度な再現性を保障する基本原理の解明に正面から取り組み、新しいコンセプトの創出を目指す。

次に、様々な組織由来のがん細胞をモデル系とし、中心体除去時に駆動する紡錘体形成バックアップシステムに関与する因子群を、細胞遺伝学スクリーニングにより網羅的に同定する。さらに、介在する複合体形成や、紡錘体極を形成する構造体の機能解析を行い、その分子基盤を包括的に理解する。

3. 研究の方法

- 1) 超解像顕微鏡観察と *in vitro* 再構成系の融合による中心小体複製機構の解明
- 2) 細胞遺伝学的手法を用いた中心体を相補

する紡錘体形成マシナリーの網羅的同定と機能解析：多様ながん細胞を異なるモデル系と捉えて、その共通点と差異に関して検討を行う。

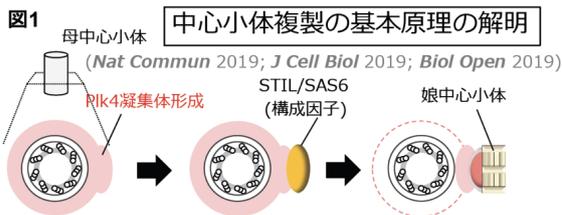
3) 血液がん細胞における中心体依存的紡錘体形成メカニズムの解明

4. これまでの成果

1) 中心小体複製機構の解明

中心小体複製の重要因子である Plk4 キナーゼが複製開始時に母中心小体近傍に局在し、天然変性領域に富んだタンパク質である STIL と物理的に結合すること、また Plk4 が STIL をリン酸化することで STIL と SAS-6 の複合体形成を促進することを報告した (*Biol Open* 2019)。また、この一連の分子機構が、中心小体の前駆体であるカートホイール構造の形成に必須であることを明らかにした (*J Cell Sci* 2019)。次に、Plk4 に存在する天然変性領域に注目し、このキナーゼが液-液相転移を起こす性質を示すこと、この特異的な性質が中心小体上に潜在的な複製開始点を与える可能性を提示した。そして、理論に基づいて得られた作業仮説を実験的に検証することで、中心小体の複製機構を明らかにしてきた (*Nat Commun* 2019)。さらには、超解像顕微鏡を用いて中心小体構成因子群の局在を定量的に解析し、数理モデリングやシミュレーションを用いて、Plk4 の自己組織化が複製開始点の決定に寄与していることを明らかにした (*J Cell Biol* 2019)。このように、中心小体複製の理論モデルを提示するという独自性の高い研究は、国際的にも

高く評価されている (*Curr Opin Struct Biol* 2021) (図 1)。

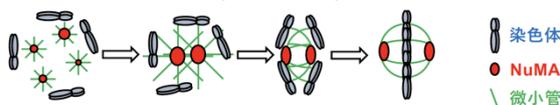


新しい展開としては、小頭症や高発癌性の遺伝性疾患である多彩異数性モザイク症候群の原因遺伝子 *Cep57* とそのパラログ *Cep57L1* の機能解析から、細胞内における中心小体間結合の異常が、疾患患者に見られる染色体不安定性の原因であることを突き止めた (*J Cell Biol* 2021a)。

2) 細胞遺伝学的手法を用いた中心体を相補する紡錘体形成マシナリーの網羅的同定と機能解析

中心体に依存しない紡錘体形成マシナリーを解析するために、本研究では、PLK4 を阻害することで、ヒト培養細胞において非中心体性の紡錘体を誘導した。中心体を完全に除去した際に、駆動する二極紡錘体形成プロセスを解析した結果、染色体付近に紡錘体極因子 NuMA が重合して微小管を放射上に配向し、その後、微小管の逆並行スライドを担う分裂期キネシン Eg5 の働きにより紡錘体の二極性が派生し、染色体の整列と分配が起こることを見出した (*EMBO J* 2020) (図 2)。さらに、中心体を一つに減少した細胞では、中心体を持たない細胞とは異なるシステムが駆動することを見出した。これらの細胞では中心体を持たない紡錘体の極に中心体マトリクスが集積し、二極紡錘体形成が促進された (*J Cell Biol* 2021b)。

図2. NuMAによる中心体に依存しない紡錘体形成メカニズム
(*EMBO J* 2020)



さらに中心体を相補するメカニズムや中心体数の変動時の細胞内恒常性の変化に関与する因子を網羅的に同定するために、DLD-1 細胞において CRISPR/Cas9 ゲノムワイドスクリーニングを行った。中心体が増幅した際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)、中心体増加時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)、中心体が減少した際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)、また中心体が減少した際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) を同定した。これらは中心体の機能と深く関係する因子である可能性が高い。グループ 1 の因子のひとつである *Cep76* を解

析した結果、*Cep76* は PLK1 の細胞質での異常な凝集を抑制することを見出した (*J Cell Sci* 2020)。さらなる解析により、*Cep76* 発現抑制により生じる PLK1 凝集体は過剰にリン酸化された活性化状態であり、これらの異常な PLK1 活性化により分裂期紡錘体配向に異常が生じることを見出した。

5. 今後の計画

項目 3 に記載した研究方法 1)-3) に関しても継続し発展させる。また、以下の研究方法も加えて、中心体・紡錘体形成を包括的に解析し、次世代型分裂期阻害剤の創生を試みる。

- 4) 分裂期紡錘体形成を特異的に阻害する低分子化合物の探索と細胞生物学的解析
- 5) 中心小体間結合の分子機構の解析

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

Ito K, Watanabe K, Ishida H, Matsushashi K, Chinen T, Hata S and Kitagawa D. *Cep57* and *Cep57L1* maintain centriole engagement in interphase to ensure centriole duplication cycle. *Journal of Cell Biology*, 220, e202005153. doi: 10.1083/jcb.202005153., 2021a

Chinen T, Yamazaki K, Hashimoto K, Fujii K, Watanabe K, Takeda Y, Yamamoto S, Nozaki Y, Tsuchiya Y, Takao D and Kitagawa D. Centriole and PCM cooperatively recruit CEP192 to spindle poles to promote bipolar spindle assembly. *Journal of Cell Biology*, 220, e202006085. doi: 10.1083/jcb.202006085., 2021b

Chinen T, Yamamoto S, Takeda Y, Watanabe K, Kuroki K, Hashimoto K, Takao D and Kitagawa D. NuMA assemblies organize microtubule asters to establish spindle bipolarity in acentrosomal human cells. *EMBO journal*, 39, e102378. doi: 10.15252/embj.2019102378., 2020

Takao D, Yamamoto S and Kitagawa D. A theory of centriole duplication based on self-organized spatial pattern formation. *Journal of Cell Biology*, 218, 3537-3547. doi: 10.1083/jcb.201904156., 2019

Yamamoto S and Kitagawa D. Self-organization of Plk4 regulates symmetry breaking in centriole duplication. *Nature Communications*, 10, 1810, doi: 10.1038/s41467-019-09847-x., 2019

7. ホームページ等

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~seiri/index.html>