

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23718

研究課題名（和文）母・娘中心小体間結合の制御機構とその破綻による疾患発症機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of regulatory mechanisms of mother-daughter centriole engagement and how defects in this system lead to the associated genetic diseases

研究代表者

渡辺 紘己（Watanabe, Koki）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・特任研究員

研究者番号：70848902

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：中心小体間結合の維持および消失は適切な中心体複製とゲノム安定性維持に必須であるが、その機構は未解明な点が多い。本研究では、染色体不安定性を伴うMVA（多彩異数性モザイク）症候群の原因遺伝子であるCep57（centrosomal protein 57kDa）とそのパラログCep57L1が中心小体の過剰複製を抑制することを明らかにした。Cep57・Cep57L1の発現を抑制した細胞では形成直後の娘中心小体が母中心小体の側面から分離し、分離した中心小体の側面のそれぞれから再び中心小体が複製された。さらにまた、過剰複製された中心小体が高頻度に染色体分配異常を引き起こすことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、中心小体間結合や中心小体複製の回数を制御する機構の新たな生物学的知見であるばかりでなく、中心小体増幅を原因とする癌や遺伝子疾患の発症機構の解明につながることを期待されます。また、これら一連の研究は、がんの治療標的の探索や悪性化の予防といった応用医療に繋がっていくことも期待されます。

研究成果の概要（英文）：The maintenance and loss of centriole engagement is essential for proper centrosome duplication and genome stability, but the mechanisms involved remain poorly understood.

In this study, we found that Cep57 (centrosomal protein 57kDa), the gene responsible for MVA syndrome, and its paralog Cep57L1 inhibit excessive replication of centrioles. In cells in which Cep57 and Cep57L1 expression was suppressed, the daughter centriole was separated from the side of the mother centriole, and a new centriole is formed from each side of the separated centrioles. We also found that, in such situation, the over-duplicated centrioles caused a high frequency of chromosome segregation defects.

研究分野：細胞生物学

キーワード：中心体 中心小体間結合 中心体複製 染色体分配

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。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

中心体は一細胞周期ごとに一度だけ複製され、分裂期紡錘体形成を促進する。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、機能に關する複数の因子が同定された。しかしながら、細胞周期進行に応じて、複数の中心小体構成因子がどのようにコントロールされ、この複雑な構造体を構築するのか？DNA複製のように中心小体を一細胞周期中に一コピーだけ複製することを保証するメカニズムとは？中心小体構造はどのように微小管形成中心としての機能を獲得するのか？等、根源的な問いの多くは未だ解明されていない。新しい中心小体は間期に既存の中心小体の側面から形成され、分裂期終期に至るまで側面に結合した状態が保たれている。二つの中心小体が細胞分裂後に分離することが次の中心小体複製のライセンスとなるため、中心小体間の結合を適切に制御することは中心小体複製サイクルの制御に重要であると考えられる。しかしながら、中心小体間結合を制御する分子機構には不明な点が多く残されており、特に間期の中心小体間結合については関連する分子すらも特定されていなかった。

### 2. 研究の目的

中心小体間結合の維持および消失は適切な中心体複製とゲノム安定性維持に必須であるが、その機構は未解明な点が多い。研究代表者は、これまでの解析から分裂期の母・娘中心小体間結合に重要な因子として Cep57 を新たに同定した。しかしながら、間期の母・娘中心小体間結合の分子基盤は未解明であった。本研究では、Cep57 およびそのパラログである Cep57L1 が協調的に母・娘中心小体間の結合を制御する可能性を検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)超解像度顕微鏡を利用した微小空間における Cep57L1 の中心体局在観察  
Cep57L1 の細胞内局在に関して、免疫染色、最新型超解像顕微鏡 (STED 顕微鏡) を用いて詳細に記述する。時系列に沿って、微小空間における Cep57L1 と Cep57 および各因子の詳細な局在をマッピングし、中心小体間結合形成がどのような分子複合体により達成されるのか、綿密に観察する。

(2)Cep57・Cep57L1 による母・娘中心小体間結合機構の解明  
Cep57・Cep57L1 を同時に発現抑制した細胞において、中心体と中心小体の動態の観察を行う。特に、細胞周期のどの時期に中心小体間の分離が起こるか？を詳細に観察する。具体的には細胞周期を同調させたり、細胞周期マーカーを用いた免疫染色を行う。また、GFP-centrin により中心小体を可視化したヒト培養細胞を用いることで、長時間ライブイメージングを行い、細胞周期に渡り中心小体の動態の観察を行う。さらに、染色体を同時に可視化することで、中心体・中心小体の表現型と染色体分配エラーの相関についての検討も加える。

### 4. 研究成果

(1)Cep57・Cep57L1 は間期の中心体数を制御する  
分裂期の中心小体間結合の維持に Cep57 が重要であることは報告していたが、間期の中心小体間結合を担っている分子実体は不明である。先行研究の機能ゲノミクススクリーニングでも間期の中心小体間結合に必要な分子は未同定であることから、二種類以上の分子が冗長的に間期の中心小体間結合を制御している可能性を想定した。そこで、分裂期の中心小体間結合に重要な PCNT、Cep57 に Cep57 のパラログである Cep57L1 を加えた 3 つのタンパク質を候補として、うち二種類の遺伝子発現を同時に抑制した際の中心小体の動態を観察した。この目的のため、中心小体マーカーの CP110、中心体マーカーの Cep192 の二つの抗体を用いて免疫染色を行った。その結果、三つの候補遺伝子の内、Cep57 と Cep57L1 の発現を同時に抑制した場合にのみ、中心体の数が間期に 3 点以上に増加することが観察された。また中心小体は、約 20%の細胞で分離した 4 点として観察され、約 10%の細胞では中心小体が 5 点以上に増幅することが明らかになった。また、中心体や中心小体に発生した表現型は Cep57L1 の別のエキソン領域の配列をターゲットする siRNA を用いても、別の細胞種 (U2OS 細胞) に siRNA を処理しても観察された。

(2)Cep57 と Cep57L1 は間期の中心小体間結合を制御する  
Cep57/Cep57L1 の発現を抑制した間期の細胞において、4 点の中心小体が離れている状態が観察された。この表現型は、複製された中心小体が間期に早期分離することで生じた可能性のほかに、細胞質分裂のエラーによって分裂期に存在する二対の中心小体の一つの細胞に受け継がれ、細胞分裂後に通常通り分離したことで生じた可能性が考えられた。これらの可能性を見分けることを目的として、中心小体のマーカーとして一般的に使用されている centrin の抗体に加えて、ODF2 (Outer dense fiber 2) の抗体を用いた免疫染色実験を行った。ODF2 は間期の細胞に二つ含まれる母中心小体のうち、前の細胞周期でも存在していた古い母中心小体のみを集積するこ

とが知られている。もし離れた4点の中心小体が間期の早期分離の結果であるならば ODF2 は1点の中心小体上に、細胞分裂の失敗の結果であるならば2点の中心小体上に観察される。この実験の結果、centrin のシグナルで判断される4点の離れた中心小体のうち、ODF2 のシグナルが共局在していたものは大多数で1点のみであった。この結果から、Cep57/Cep57L1 発現抑制細胞の中心小体は通常と同様に娘細胞に二つずつ受け継がれて複製され、複製後の S 期・G2 期に早期分離していることが明らかになった。また、中心小体マーカーである GFP-Centrin1 を恒常的に発現する HeLa 細胞を用いて中心小体のライブイメージング観察を実施し、Cep57/Cep57L1 発現抑制細胞において分裂期に入る前に中心小体が早期分離の様子が観察された。多くの場合において、S 期中期以降から G2 期に分離していると判断された。さらに、染色体も同時に可視化し、細胞分裂期における影響を観察することで、過剰複製された中心小体が高頻度に染色体分配異常を引き起こすことを見出した。これらの結果から、Cep57 と Cep57L1 は協調的に間期の中心小体間結合を維持し、中心体/中心小体の数や染色体の安定性も維持していることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takumi Chinen, Kaho Yamazaki, Kaho Hashimoto, Ken Fujii, Koki Watanabe, Yutaka Takeda, Shohei Yamamoto, Yuka Nozaki, Yuki Tsuchiya, Daisuke Takao and Daiju Kitagawa	4. 巻 220
2. 論文標題 Centriole and PCM cooperatively recruit CEP192 to spindle poles to promote bipolar spindle assembly	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e202006085
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.202006085.	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 -
1. 著者名 Kei Ito, Koki Watanabe, Haruki Ishida, Kyohei Matsushashi, Takumi Chinen, Shoji Hata and Daiju Kitagawa	4. 巻 220
2. 論文標題 Cep57 and Cep57L1 maintain centriole engagement in interphase to ensure centriole duplication cycle	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 e202005153.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1083/jcb.202005153.	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 -
1. 著者名 Takumi Chinen, Shohei Yamamoto, Yutaka Takeda, Koki Watanabe, Kanako Kuroki, Kaho Hashimoto, Daisuke Takao and Daiju Kitagawa	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 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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yutaka Takeda, Kaho Yamazaki, Kaho Hashimoto, Koki Watanabe, Takumi Chinen and Daiju Kitagawa	4. 巻 133
2. 論文標題 The centriole protein CEP76 negatively regulates PLK1 activity in the cytoplasm for proper mitotic progression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs241281
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.241281.	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 渡辺 紘己, 北川 大樹
2. 発表標題 Cep57-pericentrin複合体による分裂期中心体の制御機構-MVA症候群とMOPD病の発症機構の解明
3. 学会等名 第71回 日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2019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
---------	---------