

令和 4 年 5 月 31 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：2020～2021

課題番号：20K22701

研究課題名（和文）KIFC3による中心体の分離タイミング制御機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of KIFC3-mediated timely centrosome separation

研究代表者

畠 星治（Hata, Shoji）

東京大学・大学院薬学系研究科（薬学部）・特任講師

研究者番号：80609743

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）：本研究では、紡錘体形成を開始させる中心体分離のタイミング制御機構に主眼を置き、この過程で重要な役割を果たす逆行性キネシンの1つであるKIFC3の機能解析を行った。その結果、モータードメインや二量体形成ドメインといった一般的なモータータンパク質の機能に重要な領域に加えて、C末端に存在する7つのアミノ酸により構成される部位が、KIFC3の機能に重要であることを見出した。また、KIFC3の中心体への局在化は、CEP170との相互作用を介していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、最近同定された、中心体分離のタイミング制御機構に重要な役割を果たすKIFC3の機能メカニズムの一端を明らかにすることができた。異常なタイミングでの中心体分離は、その後の染色体分配異常を引き起こし、がんの発症原因となることが示されている。このため、本研究によって新たに見出された知見は、基礎生物学のみならず医学的にも重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the timing control mechanism of centrosome separation that initiates bipolar spindle formation and analyzed the functional mechanism of KIFC3, the minus-end directed kinesin that plays an important role in this process. We found that in addition to the motor domain and the dimerization domain, a C-terminal region consisting of seven amino acids is also important for KIFC3 function. In addition, we revealed that KIFC3 interacts with CEP170 for its localization at the centrosome.

研究分野：細胞生物学

キーワード：中心体 紡錘体

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

分裂期紡錘体によって担われる娘細胞への染色体の正確な分配は、がんなどの疾患の原因となる染色体異常を防ぐために重要なプロセスの1つである。微小管を主な構成要素とする紡錘体の形成には、その両極に位置し微小管形成中心として機能する2つの中心体が主要な役割を果たす。分裂期とは異なり間期の細胞では2つの中心体は互いに近傍に位置しており、それぞれの中心体を起点とした微小管ネットワークが合わさって統御されることで、細胞遊走といった細胞機能が制御されている。この中心体接着は、繊維状タンパク質によって構成される中心体リンカー同士との結合によって担保されている。分裂期に入るとこの中心体リンカーが乖離し、接着性を失った中心体は順行性のホモ四量体キネシンEG5が生み出す力によって分離され、二極性の紡錘体が形成される。この中心体分離が生じるタイミングは厳密に制御されており、異常なタイミングでの中心体分離は染色体分配異常を引き起こすことが知られている。これまでの我々の研究成果により、この中心体分離のタイミングを制御する分子として逆行性キネシンのKIFC3が同定された(Hata et al. Nat. Cell Biol. 2019)。しかし、KIFC3を中心とした中心体の分離タイミング制御機構には、不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

中心体の分離タイミング制御機構の理解を深めるために、中心的な役割を果たすKIFC3がどのように機能しているかを、分子生物学的および細胞生物学的手法により解明することを目的とした。特に、KIFC3の機能ドメインを同定することで、KIFC3の機能メカニズムを明らかにすることを目指した。また、中心体の分離タイミングを制御するために、KIFC3がどのような機構によって中心体に局在化しているのかについて解明を試みた。

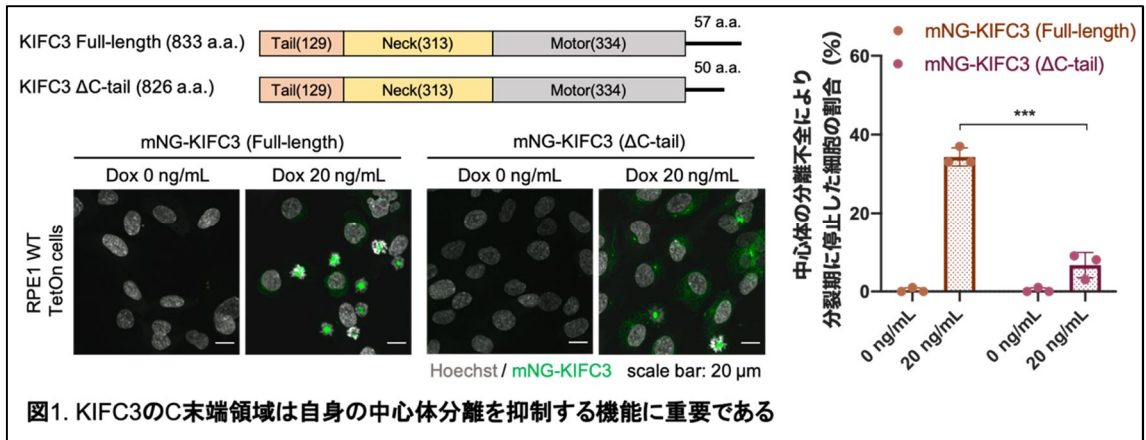
3. 研究の方法

ヒト培養細胞をモデルとし、細胞周期の進行に従って変化する中心体の接着、分離、機能獲得といった現象を、免疫染色・超解像顕微鏡観察やライブセルイメージングなどにより詳細に観察した。この際には、薬剤処理などにより細胞周期を同調させるか、各周期特異的なマーカーを組み合わせることで行った。また、中心体のそれぞれの微小領域における各構成分子の局在量などについては、免疫染色の際に抗体によって認識されるシグナルについて、形状や量などをイメージプロセッシングにより定量化し、各分子の相関関係について統計学的解析により検討した。KIFC3や関連分子の機能分子機序について、RNAiやCRISPR-Cas9システムによる遺伝子欠損、TetOnシステムによるコントロールされた過剰発現系などを用いて検討を加えた。

4. 研究成果

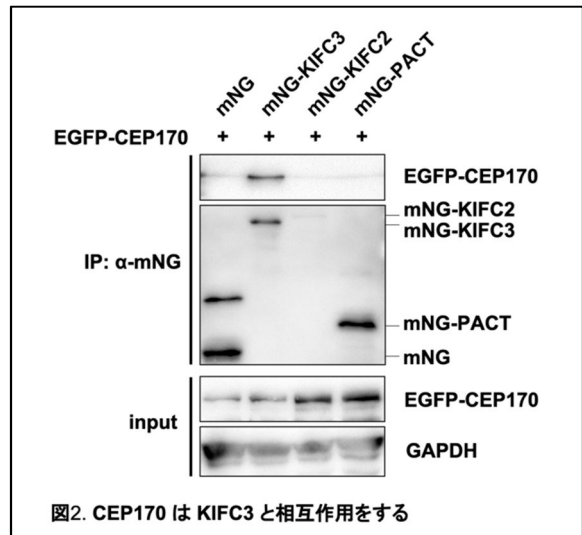
1) 中心体分離を抑制するKIFC3の機能分子機序の解明

ヒト正常二倍体細胞であるRPE1細胞を用いて、KIFC3が中心体の分離タイミングを制御する際に必要とする自身の領域について解析を行った。逆行性キネシンの1つであるKIFC3は、他の逆行性キネシンと同様にC末端領域にモータードメインがあり、そこからN末端側へと二量体化ドメイン、テールドメインの順番で構成されている。そこで、それぞれのドメインを欠失させたコンストラクトを作成し、中心体を接着させるのに必要なKIFC3の領域の同定を試みた。KIFC3を過剰発現させることで中心体の分離が阻害され、分裂期に入った細胞が、双極ではなく単極の紡錘体を形成したままの状態細胞周期停止することが知られている。そこで、この表現系を指標に、それぞれの部位を欠失させたKIFC3の機能を評価した。その結果、いずれのドメインを欠失させたコンストラクトにおいても、単極の紡錘体を伴う分裂期停止が観察されなかったことから、これらのドメインはKIFC3が有する中心体分離抑制の機能に重要であることが示唆された。また、KIFC3の特徴の1つとして、モータードメインよりもC末端側に、57個のアミノ酸で構成される長いテイル領域が存在することが挙げられる。これは、他の逆行性キネシンには見られないものである。そこで、この領域を欠失させたコンストラクトを検討した結果、この特徴的な領域もKIFC3の機能に重要であることが明らかとなった(図1)。興味深いことに、KIFC3の複数のアイソフォームは、C末端の7つのアミノ酸を有していない。そこで、これらアイソフォームの機能を同様に検討した結果、全長のアイソフォームに比べて、中心体の分離を阻害する能力が著しく低いことを見出した。これらの結果により、KIFC3による中心体分離のタイミング制御機構の理解が深まると共に、KIFC3の機能的多様性が存在することが示唆された(Harada T., et al. 論文投稿準備中)。



2) KIFC3 の中心体局在化機構の解明

KIFC3 の機能には、中心体に付加された、サブディスタル・アペンデージという微小管を繫留する構造体が必要であることが知られている。KIFC3 は微小管上を移動してこの構造体に局在化するが、この局在化がどのような分子との相互作用を介したものであるかは未解明であった。そこで、相互作用スクリーニングを行った結果、この構造体の先端部に局在する CEP170 と KIFC3 が相互作用することを見出した (図 2)。siRNA を用いて CEP170 を発現抑制すると、KIFC3 の中心体への局在量が低下した。この低下がサブディスタル・アペンデージ微小管の機能低下を介した二次的なものであるかを判別するために、この微小管の機能を間接的に測る新たなアッセイ系を確立した。この解析の結果、CEP170 はサブディスタル・アペンデージ微小管の機能には大きな影響を与えずに、この構造体への KIFC3 の局在化に必要であることを見出した。また、CEP170 の発現抑制によって、KIFC3 が機能しない場合と同様に、中心体の早期分離が引き起こされた。これらの結果より、KIFC3 のサブディスタル・アペンデージへの局在化と中心体の分離タイミングを制御する機能において、CEP170 が重要な役割を果たすことが明らかとなった (Harada T., et al. 論文投稿準備中)。



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 1件）

1. 著者名 Ito Kei K., Watanabe Koki, Ishida Haruki, Matsuhashi Kyohei, Chinen Takumi, Hata Shoji, Kitagawa Daiju	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 -
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 Schweiggert J?rg, Habeck Gregor, Hess Sandra, Mikus Felix, Beloshistov Roman, Meese Klaus, Hata Shoji, Knobloch Klaus Peter, Melchior Frauke	4. 巻 40
2. 論文標題 SCF ^{Fbxw5} targets kinesin 13 proteins to facilitate ciliogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	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） 10.15252/embj.2021107735	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 馬淵陽、畠星治、北川大樹
2. 発表標題 ヒト正常二倍体細胞に対する簡便かつ高効率な内在性タギング手法の開発
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢吹凌一、畠星治、山本昌平、北川大樹
2. 発表標題 初代培養を必要としない、多繊毛細胞の新たな分化実験系の開発
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢吹凌一, 山本昌平, 畠星治, 北川大樹
2. 発表標題 多繊毛細胞における中心小体増幅のメカニズム解明へ向けた実験系確立
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小森琢磨, 畠星治, 北川大樹
2. 発表標題 CRISPR/Cas9システムを用いた長距離遺伝子欠損とその定量的評価
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 馬淵 陽, 畠 星治, 北川 大樹	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 -
3. 書名 実験医学増刊 Vol.39 No.10	

〔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
---------	---------