

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 8 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24687026

研究課題名(和文) 中心小体複製ライセンス化制御の分子機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms that license centrioles to duplicate in the right place and only once per cell cycle

研究代表者

北川 大樹 (Kitagawa, Daiju)

国立遺伝学研究所・分子遺伝研究系・教授

研究者番号：80605725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,600,000円

研究成果の概要(和文)：細胞小器官である中心小体は微小管形成中心と機能し、染色体分配、細胞分裂に重要な役割を果たしている。本研究では、細胞内の中心小体の数を制御する新規因子RBM14を同定した。RBM14は中心小体の過剰な形成を抑制することで、中心小体の数を適切に制御していることを見出した。RBM14は癌抑制遺伝子として報告されていることから、中心小体形成制御を通じてゲノム安定性維持に寄与していることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：Formation of a new centriole adjacent to a pre-existing centriole occurs only once per cell cycle. Despite being crucial for genome integrity, the mechanisms controlling centriole biogenesis remain elusive. Here, we identify RBM14 as a novel suppressor of de novo assembly of centriolar protein complexes through function of the STIL/CPAP complex. Moreover, we find that, upon RBM14 depletion, a part of the ectopic centriolar protein complexes in turn assemble into structures more akin to centrioles, presumably by incorporating cartwheel components, and cause multipolar spindle formation. We further demonstrate that such structures assemble in the cytoplasm even in the presence of pre-existing centrioles. This study sheds light on the possibility that ectopic formation of aberrant structures related to centrioles may contribute to genome instability and tumorigenesis.

研究分野：細胞生物学

キーワード：中心小体 中心体 細胞分裂 染色体分配 細胞がん化 分裂期紡錘体

1. 研究開始当初の背景

(1) 中心体は中心小体及びそれを取り囲む中心体マトリックスから構成されており、中心小体の複製が中心体全体の複製を規定している。近年、多種のモデル系におけるゲノムワイド RNAi スクリーニング、変異体を用いた遺伝学的解析、生化学的に単離された中心小体のプロテオーム解析などにより、国内外において中心小体を構成する因子群の同定が精力的に進められている。この分野における現在の傾向として、これら同定された因子群の段階的な中心小体構築過程における機能解析に主眼が置かれている事が挙げられる。

(2) 中心小体構築の分子機構の解析は著しい勢いで進んでいるが、中心小体過剰複製に介在する分子機構の研究は驚くほど進んでいない。癌の初期過程に生じる中心小体の過剰複製は染色体の不安定化を誘発し、癌の悪性化に繋がる事が推測されており、実際に多くのヒト癌細胞で中心小体の過剰複製が観察されている。その原因の一つとして中心小体複製のライセンス化制御の破綻による可能性が指摘されているが、一度複製した中心小体が一細胞周期において再び複製しないように制御する分子メカニズムに関してはほとんど明らかになっていない。さらには、新たな中心小体形成が既存の母中心小体近傍に限局されるメカニズムに関しても明らかにされていない。

2. 研究の目的

近年、機能ゲノミクスやプロテオミクスを用いた網羅的解析により中心小体構築に必須の因子群の全貌は明らかになりつつある。一方、中心小体複製のライセンス化、すなわち細胞周期ごとに一度だけ中心小体の複製が起こる事を保証し、過剰な複製を抑制する制御機構の実体は明らかにされていない。本研究では、中心小体複製ライセンス化制御、特に当研究室で同定された新規複製制御因子である RBM14 の機能解析を中心に、その分子機構を解明することを目的とした。さらに、このプロセスに介在する因子群の同定、それら因子群の細胞周期を通じた機能解析、相互作用ネットワークの解析を行うことで、新たに複製される中心小体のコピー数をモニターし、新規中心小体形成を母中心小体近傍に限局する分子基盤を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

中心小体複製ライセンス化制御における RBM14 の機能解析をヒト培養細胞をモデル系とし、細胞生物学・生化学的手法を主に用いて行う。

1) RBM14 発現抑制により、細胞質内において異所的に過剰複製された中心小体の構造

学的解析

中心小体ライセンス化の破綻により過剰に複製された中心小体の形成過程及びその構造的特徴、機能を明確にする。すなわち、RBM14 発現抑制により過剰に複製された中心小体が内在のものと構造的にどの程度類似しているかに関して、中心小体の段階的な構築過程が判別可能な各種分子マーカーを用いた免疫染色により明らかにする。さらには、tubulin 抗体、核染色剤を用いて、分裂期紡錘体形成及び染色体分配への影響についても観察する。また、相補的なアプローチとして、電子顕微鏡を用いて詳細な構造を ~5nm 程度の解像度で解析する

2) RBM14-STIL 複合体形成の細胞周期上の時期、細胞内局在の特定

RBM14 は間期には核内パラスペックル構造に局在し、分裂期には中心小体近傍に局在することをこれまでに見出している。よって、RBM14-STIL 複合体は分裂期に中心小体近傍にて形成されることが推測される。細胞周期を同調したヒト培養細胞(U2OS 細胞)にて、両者を認識する抗体を用いて免疫染色を行い、超解像度顕微鏡システム(STED 顕微鏡)を利用して中心小体のどこでの時期に共局在するか、詳細を解析する。また、両蛋白質を二種の異なる蛍光蛋白質(GFP と mCherry)でラベルし、細胞内にて発現させてライブイメージングを行い、RBM14-STIL 複合体のダイナミクスについても検討する。

3) RBM14 複合体に結合しうる RNA の同定

RBM14 は RNA 結合ドメインを有するタンパク質であり、RBM14-STIL 複合体に相互作用する RNA を生化学、次世代シーケンシングを用いて同定し、ヒト培養細胞における中心小体形成への関与を検討する。

4. 研究成果

1) 中心小体複製制御因子のスクリーニング及び RBM14 の同定

中心小体前駆体の形成過程に関与する因子を同定する目的で、中心小体複製開始に必須である因子 HsSAS-6 と STIL の結合タンパク質の同定を試みた。方法としては、ヒト培養細胞である HeLa 及び 293T 細胞から抽出した可溶性画分を出発材料とし、HsSAS-6 または STIL 抗体を用いて各々のタンパク質を含む複合体を免疫沈降法により精製後、マスペクトロメトリー解析を行った。その結果、HsSAS-6 または STIL と細胞内で特異的に複合体を形成する可能性があるタンパク質を ~50 程度検出した。これらの結合タンパク質候補群の機能解析を行う目的で、ヒト培養細胞において各因子に対する RNAi を用いた機能ゲノミクス解析を行った。その結果、STIL

免疫沈降画分中に検出された RBM14 を RNAi により発現抑制した細胞において、中心小体マーカーである centrin の過剰形成が観察された (図 1)。

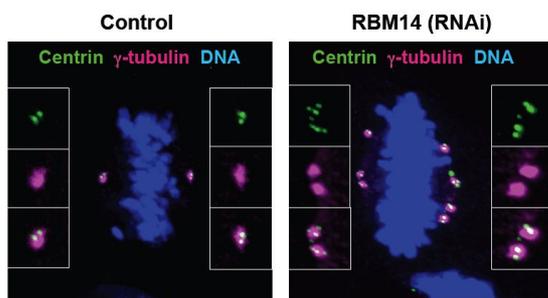


Fig. 1 RBM14発現抑制により中心小体様構造体が誘導される
Centrin (中心小体マーカー)、 γ -tubulin (中心体マーカー) ヒト培養細胞U2OS

2) RBM14 発現抑制により誘導される中心小体様構造体の解析

RBM14 の発現抑制により、centrin foci の過剰形成が観察されたが、この構造体がどの程度内在の中心小体に類似するのかを検討する目的で、各種中心小体マーカーを用いたヒト培養細胞における免疫染色、及び電子顕微鏡観察による構造学的解析を行った。これらの構造体は中心小体の middle-distal end を認識するマーカーでは染色されたが、中心小体構築の初期過程において形成され、基底部分にあたるカートホイール構造のマーカーではほとんど染色されなかった。これはまったく予想外の結果であり、これまでは中心小体構築にはカートホイール構造が必須であるとされていた定説を覆すものである。さらに、電子顕微鏡によりこの中心小体様構造体を観察したところ、そのほとんどが中心小体3連微小管を含む無定形の構造体であることを見出した。構造的には中心小体前駆体とも考えられるが、中心小体を取り囲む中心小体周辺物質 (PCM) を集積させており (図 1)、またその周囲には微小管が重合している様子も観察されたことから、微小管形成中心としての機能はある程度保持している事が推測された。

3) RBM14 は中心小体複製に必須の因子 STIL/CPAP 複合体形成を阻害する

次に、RBM14 発現抑制により中心小体様構造体が過剰に形成される分子メカニズムを検討した。RBM14 は STIL 抗体による免疫沈降画分中に存在する因子としてマスペクトロメトリーにより同定されたが、ヒト培養細胞 293T において内在の RBM14 と STIL が共沈することを確認した。さらに、酵母ツーハイブリッド法及び精製リコンビナントタンパク質を用いた GST-pull-down assay により、RBM14 の C 末端領域と STIL の N 末端領域が直接結合することを見出し

た。STIL の N 末端領域は中心小体複製に必須の因子である CPAP と結合することで複合体を形成することから、RBM14 が STIL の N 末端領域での結合を介して STIL/CPAP 複合体形成を阻害している可能性に関して検討を行った。GFP-CPAP を doxycycline により誘導可能なヒト U2OS 細胞において RBM14 の C 末端領域、または全長を過剰発現させると STIL/GFP-CPAP 複合体形成は顕著に阻害された。次に、RBM14 発現抑制により形成された STIL/CPAP 複合体が中心小体様構造体の形成に必要などうかを検討する目的で、RBM14-control、RBM14-STIL、RBM14-CPAP の組み合わせによる double RNAi 実験を行った。その結果、RBM14 発現抑制により誘導される中心小体様構造体は STIL もしくは CPAP RNAi を同時に行うことで顕著に抑制された。この結果は、中心小体様構造体の形成には STIL/CPAP 複合体の形成が必要であることを示している。

4) *de novo* 合成経路による中心小体様構造体形成

これまでは、STIL の過剰発現により多数の娘中心小体が母中心小体近傍にロゼッタ状に同時に形成されると報告されていたが、RBM14 を発現抑制した際に出現する中心小体様構造体はこのような様相を呈していなかった。そこで、中心小体様構造体がどのように形成されるのか、そのダイナミクスの詳細を観察することを目的として GFP-centrin を発現している HeLa 細胞を RBM14 RNAi 処理後に、長時間蛍光ライブイメージングを行った。その結果、驚くべきことに GFP-centrin で標識される中心小体様構造体は細胞質中において *de novo* 合成により形成されることを見出した。実際、RBM14 の発現を RNAi により抑制した細胞においては、細かい GFP-centrin foci が細胞質中にて融合することで凝集し、既存の中心小体に局在する GFP-centrin foci と同程度の大きさに成長することが観察された。これまで、新規の中心小体は既存の中心小体の近傍で構築されると考えられていたが、今回のケースにおいては既存の中心小体から離れた細胞質中にて *de novo* で中心小体様構造体が合成されるという新たな現象を見出した。また、mCherry-Histone を用いた核の形態観察から細胞周期上の大まかな時期をモニターすることにより、中心小体様構造体は G1 後期から S 期にかけてその形成が促進されることを明らかにした。

5) 中心小体様構造体は分裂期において染色体分配エラーを誘発する

これまでに RBM14 発現抑制により中心小体様構造体が形成される分子メカニズムに関して議論したが、次に、その結果分裂期紡

錘体形成や染色体分配にどのような影響が生ずるか検討を行った。観察方法としては、GFP-centrin 及び mCherry-Histone を発現させた HeLa 細胞または U2OS 細胞を用いて、中心小体 / 中心小体様構造と分裂期における染色体分配過程の観察を長時間蛍光ライブイメージングにて行った。分裂期の細胞を観察すると、RBM14 発現抑制により生じた中心小体様構造体の多くは、細胞の対極に集まり二極化した紡錘体を形成するが、その場合でも紡錘体形成に異常が生じ、lagging chromosome などが観察され、染色体分配時の fidelity の低下が生じた (図 2)。さらに、HsSAS-6 を含むカートホイール構造を取り込んだと推測される中心小体様構造体により効率的に紡錘体形成中心として機能し、分裂期における多極化した紡錘体形成に関与することを見出した。実際、RBM14 発現抑制により多極化した紡錘体形成の割合はコントロールと比較して有為に増加するが、この表現形は HsSAS-6 RNAi 処理により抑制された。

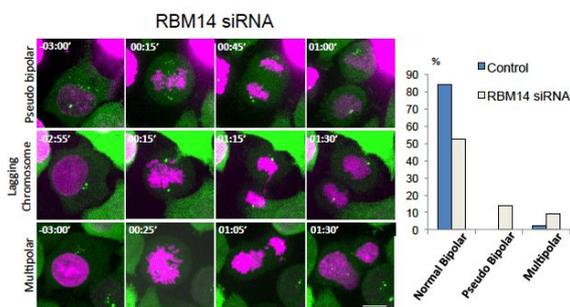


図2 RBM14発現抑制により生じる染色体分配異常
GFP-centrin (緑:中心小体マーカー), mCherry-Histone (赤:核マーカー).
HeLa細胞. 時間分.

本研究により、新しい中心小体構築のメカニズムが提示された。すなわち、これまでは新たに形成される娘中心小体は必ず母中心小体の近傍で生じると考えられていたが、本研究では既存の中心小体存在下でも *de novo* 合成経路を介して新たな中心小体様構造体が細胞質中に形成されることを示した。これまでの知見では、既存の中心小体を物理的に除去した場合のみ、中心小体 *de novo* 合成が開始されるとされており、通常は既存の中心小体何らかの形で *de novo* 合成を抑制していると考えられていた。本研究の結果は、既存の中心小体が存在していても *de novo* 合成が起こる事を示しており、また、これらの過剰な中心小体様構造体がゲノムの不安定化を誘発する可能性を提示している。実際、RBM14は腎臓がんの原因遺伝子の一つとして報告されていることから、本研究で解析したような中心小体様構造体が染色体不安定化を誘導し、細

胞がん化の引き金になる可能性が考えられる。本研究の結果により、中心小体 *de novo* 合成経路の抑制機構を含む、中心小体複製ライセンス制御に関する分子基盤の基礎的な情報が得られた。近年、中心小体の過剰複製と細胞がん化の関与が増々指摘されるようになってきており、中心小体複製の素過程における知見は細胞がん化メカニズムの解明にも寄与することが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

1. Gen Shiratsuchi and Daiju Kitagawa (2015) Suppression of the ectopic assembly of centriole proteins ensures mitotic spindle integrity. *Molecular and Cellular Oncology*, 2, e1002717-1-3, DOI:10.1080/23723556.2014.1002717 査読あり

2. Gen Shiratsuchi, Katsuyoshi Takaoka, Tomoko Ashikawa, Hiroshi Hamada and Daiju Kitagawa (2015) RBM14 prevents assembly of centriolar protein complexes and maintains mitotic spindle integrity. *The EMBO Journal*, 34, 97-114, DOI 10.15252/embj.201488979 査読あり

3. Midori Ohta, Tomoko Ashikawa, Yuka Nozaki, Hiroko Kozuka-Hata, Hidemasa Goto, Masaki Inagaki, Masaaki Oyama and Daiju Kitagawa (2014) Direct interaction of Plk4 with STIL ensures formation of a single procentriole per parental centriole. *Nature Communications*, 5267, doi: 10.1038/ncomms6267 査読あり

[学会発表](計18件)

1. 北川 大樹, 中心小体複製開始の分子基盤の解明, BMB2015, 2015年12月3日, 神戸

2. 北川 大樹, Direct interaction of Plk4 with STIL ensures formation of a single procentriole per parental centriole, Centriole and spindle pole bodies (EMBO conference), 2014年10月2日, Lisbon, Portugal

3. 北川 大樹, De novo centriole formation and chromosomal instability, International symposium Cilia and Centrosomes: from fertilization to cancer, 2013年6月17日, 神戸

〔図書〕(計1件)

1. 北川大樹 (2013) 中心小体構築と複製の分子メカニズム 細胞工学, vol. 32, No.3, 285-290

〔その他〕

https://www.nig.ac.jp/labs/CentrBio/Centrosome_Laboratory_web_Site/Publication.html (研究室HP)

6. 研究組織

(1)研究代表者

北川 大樹 (Daiju Kitagawa) (国立遺伝学研究所・分子遺伝研究系・教授)

研究者番号：80605725

(2)連携研究者

白土 玄 (Gen Shiratsuchi)(国立遺伝学研究所・分子遺伝研究系・博士研究員)

研究者番号：80625533