

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870691

研究課題名(和文) 中心体複製開始機構の研究

研究課題名(英文) Study of initiation process of the centrosome duplication.

研究代表者

松尾 和彦 (Matsuo, Kazuhiko)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70599753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：申請者は、本研究において(1) kendrinのカルボキシル末端領域と中心小体複製開始に関与するCep152のカルボキシル末端領域が相互作用する事を明らかにした。また、(2) Cep152は、G2/M期では中心体にほとんど局在が見られず、細胞質分裂が起きる頃に再び中心体に集積することがわかった。(3) siRNA処理によるkendrinの発現抑制により、Cep152の蛋白質発現量が増加し、中心体に効率よく集積できることがわかった。以上より、kendrinが中心体から脱離する事でCep152が効率よく中心体へと集積し、新規中心小体複製を開始する機構がある可能性を明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study I got following three results which indicated that kendrin and Cep152 may regulate the centrosome duplication. At first, kendrin and Cep152 can interact via their carboxyl terminals. Second, although Cep152 may not localize at the centrosome during G2/M phase they were recruited to the centrosome again during cytokinesis. Third, by siRNA mediated- kendrin depletion, expression level of Cep152 were increased and Cep152 could localize at the centrosome efficiently rather than normal condition. Taken together I found that Cep152 might be recruited efficiently to the centrosome after kendrin was released and that this mechanism could facilitate centrosome duplication at next cell cycle.

研究分野：細胞生物学

キーワード：中心体 中心体複製 細胞周期 中心体周期

1. 研究開始当初の背景

中心体は2つの中心小体とそれを取り囲む中心体周辺物質(PCM)から成り(図1)、動物細胞における主たる微小管形成中心(MTOC)として、細胞内輸送、極性形成、細胞小器官の位置決定など、重要な役割を担っている。分裂期においては、中心体は紡錘体を形成し染色体の娘細胞への均等分配に重要である。紡錘体の形成異常は染色体の不均等分配を引き起こす為、中心体数の厳密な制御や中心体構造の維持は娘細胞へのゲノムの安定的な継承に必要不可欠である。

中心体複製は細胞周期につき一度だけ染色体DNAの複製と厳密に同期して行われる(図2)。これまで、申請者は中心体の主要構成

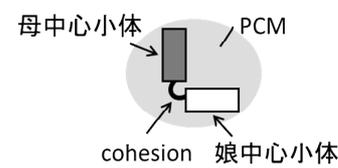


図1 中心体の構造

位置決定など、重要な役割を担っている。分裂期においては、中心体は紡錘体を形成し染色体の娘細胞への均等分配に重要である。紡錘体の形成異常は染色体の不均等分配を引き起こす為、中心体数の厳密な制御や中心体構造の維持は娘細胞へのゲノムの安定的な継承に必要不可欠である。

中心体複製は細胞周期につき一度だけ染色体DNAの複製と厳密に同期して行われる(図2)。これまで、申請者は中心体の主要構成

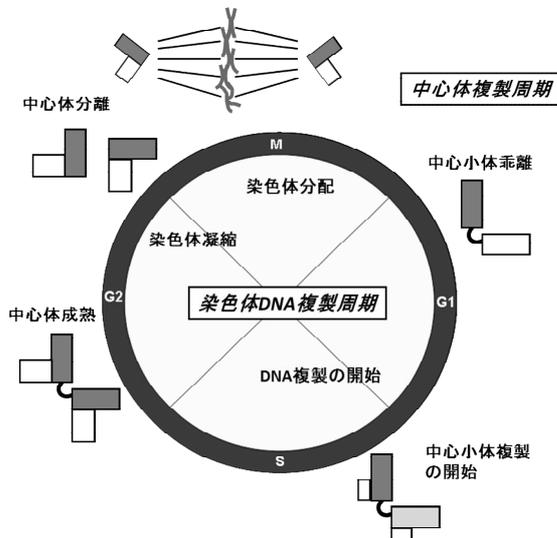


図2 細胞周期と中心体周期

蛋白質である kendrin の機能解析を通して、中心体複製周期(中心体周期)の制御機構の研究を行ってきた。Kendrin は細胞周期を通じて中心体に局在し、アンカリング蛋白質として蛋白質リン酸化酵素や脱リン酸化酵素などのシグナル伝達分子と結合する事が知られている。G2期において2つの中心体は近接して保持されているが、分裂期進入直前に両極へ移動(中心体分離)し、紡錘体を形成する。申請者は、kendrin が蛋白質リン酸化酵素 Nek2A を介して中心体分離を制御する事を明らかにした[Matsuo K. et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. (2010)]。また、分裂終期から G1 期にかけて、この時期まで維持されていた母中心小体と娘中心小体間の密着した結合が乖離(中心小体乖離)し、G1期の構造になる。この分裂期型から G1 期型への構造変換を経なければ次の中心小体複製ができない為、中心小体乖離が中心小体複製のライセンス機構として働いていると考えられている。この過程において蛋白質分解酵素 separase の活性が必要である事は

分かっていたが、基質は長年謎のままであった。申請者は、中心体における separase 新規基質が kendrin であり、中心小体複製のライセンス機構において重要な役割を担っている事を報告した[Matsuo K. et al. Curr. Biol. (2012)]。

中心小体乖離を経た母中心小体は、S 期において自身の側面から直行して新たな娘中心小体の複製を開始する(中心小体複製)。この過程は中心小体を構成する蛋白質複合体自身が鋳型となり新たな中心小体が形成されるというユニークな複製機構である。娘中心小体の構造形成に必要な蛋白質が明らかになりつつあり、Cep152 や CPAP もその1つである。しかし、Cep152 や CPAP がどのような機構で中心体に局在できるのかは不明であった。一方、これまでの研究から kendrin の過剰発現により中心体が過剰複製される事や、kendrin の siRNA による発現抑制では中心小体数が減少する事が知られている[Delaval B. et al. J. Cell Biol. (2009)]。また、kendrin、Cep152、CPAP をコードする遺伝子の異常は、小頭症を伴う小人症を発症する事が知られており、これら3因子は同じ分子機構上で働いている可能性が高い。更に、申請者は kendrin が母中心小体のみ局在し、娘中心小体複製の開始初期に関与する Cep152 と相互作用する事を見出している(未発表データ)。また、複製開始には蛋白質リン酸化酵素 Plk4 の酵素活性が必要である事が報告されているが[Habedanck R. et al. Nat. Cell Biol. (2005)]、何を基質としてリン酸化する事が重要なのかは不明である。申請者は kendrin のアミノ酸配列中には Plk ファミリーが結合できる polo box が数カ所あり、分裂期に高度にリン酸化される事を見出している。これらの現象から kendrin が中心体複製の開始に関与している可能性が高いと考えていた。

2. 研究の目的

本研究では、中心体複製開始初期の分子機構の解明を目指したいと考えている。中心体は、S 期において既にある中心小体の側面から垂直に新たな娘中心小体が形成される事で複製される。この過程は蛋白質複合体を鋳型として蛋白質複合体を構築するユニークな機構であるが、詳細な分子メカニズムは不明であった。本研究は、S 期における kendrin の機能解析を通して、中心小体複製開始の分子メカニズムを解明する事を目的とするものであり、申請者は(1) kendrin が中心小体複製開始時に Cep152 や CPAP を中心体に局在化させる可能性、(2) kendrin が Plk4 の基質である可能性、(3) リン酸化された kendrin が娘中心小体複製開始に関与している可能性について検討した。

3. 研究の方法

細胞の培養

本研究では、HEK293T 細胞、HeLa 細胞および RPE-1 細胞を用いて研究を行った。全ての細胞は恒温槽内で CO₂ 濃度 5%、37 °C の湿潤条件下で培養を行った。

遺伝子発現抑制を行った細胞の解析
kendrin や Cep152 の蛋白質の発現量を抑制する為に siRNA 及び shRNA を作成するプラスミド DNA を Lipofectamine2000 により培養細胞 (HeLa、RPE-1) に一過性に導入した後、ウエスタンブロットングや免疫蛍光染色にて解析をおこなった。

質量分析

HeLa 細胞の抽出液から kendrin を免疫沈降した試料を SDS-PAGE にて展開し、銀染色を行った後、kendrin に共沈されてきた可能性が高い蛋白質バンドをナイフにて切り出した。この試料から蛋白質を抽出し、プロテアーゼで処理後 nanoLC-MS/MS にて解析を行った。

細胞周期の同調

HeLa 細胞をチミジンで 20 時間処理し、PBS (-) で洗った後、完全培地にて 8 時間培養を行う。その後、再びチミジンで 16 時間処理して、細胞周期を G1/S 期に停止させる。必要に応じて PBS (-) で洗い、再度、完全培地にて培養を続けた。

4. 研究成果

申請者は、本研究を始めるきっかけとして、kendrin と Cep152 が相互作用する事を見出した (図 3)。

さらに、kendrin および Cep152 の欠失変異体を用いて相互作用する領域についてウエスタンブロットングにて検討した結果、

kendrin のカルボキシル末端領域と Cep152 のアミノ末端領域が相互作用している可能性が高いと考えられた (図 4)。

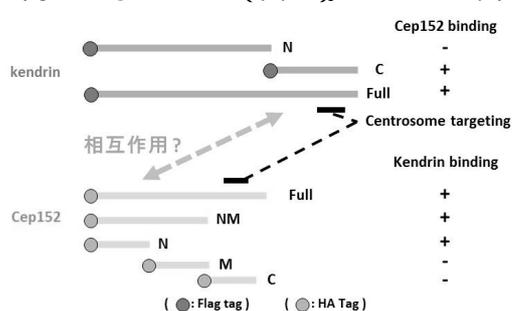


図4. KendrinとCep152の相互作用

では以前、申請者らが報告した通り G1 期から M 期初期にかけて中心体領域に集積し M 期中期に Separase による限定分解を受けた後、M 期中期から中心体から脱離すると考えられる。Cep152 に関しては中心体における挙動が不明であったため、Cep152 の細胞全体および中心体での蛋白質量の変化について、それぞ

れウエスタンブロットング及び免疫蛍光染色により検討した。まず、細胞全体での Cep152 の蛋白質量は、G1/S 期から解放後すぐにタンパク質量は減少しはじめ、分裂期から脱出する時期に再び増加がみられた。免疫染色による中心体での Cep152 の観察においても、Cep152 の蛍光強度は G2/M 期から分裂期においては非常に弱い、細胞質分裂期になると強くなる事がわかった。これらのデータから、Cep152 が中心体複製のライセンスを終えた直後に中心体へと局在し、新たな中心体複製の開始に関与する可能性が高いと考えられた。

中心体複製の開始には Cep152 の他にも Sas6、CPAP など多くの蛋白質の関与が報告されている。そこで申請者は、kendrin に中心体複製に関与する他の蛋白質が相互作用する可能性が考えられるため、kendrin を免疫沈降した後、共沈される蛋白質を質量分析にて解析をおこなった。しかしながら、共沈された多くがシャペロン蛋白質であったため、中心体複製に関与する可能性は低いと考えた。現在は酵母ツーハイブリット法により結合蛋白質の解析を続けている。

図 4 で示したように、kendrin は中心体複製の開始時期に活性化する蛋白質リン酸化酵素 PLK4 と相互作用していることが分かった。新規中心体複製には母中心体の側面にある基質を PLK4 がリン酸化する事が必要である事が分かっているが、その基質が何かは不明である。今後、kendrin が PLK4 の基質である可能性を検討する為に、蛋白質リン酸化酵素活性測定を、kendrin を基質として行いたいと考えている。

次に、申請者は kendrin および Cep152 の蛋白質発現を抑制した際の細胞の表現型について検討した。HeLa 細胞において kendrin を siRNA 処理により発現抑制を行ったところ、Cep152 の発現の増加が観察できた。一方、Cep152 の siRNA 処理を行った場合は kendrin の発現量の顕著な増加は観察されなかった。これより、kendrin が Cep152 の中心体への集積に抑制的に働く事が明らかになった (図 5)。

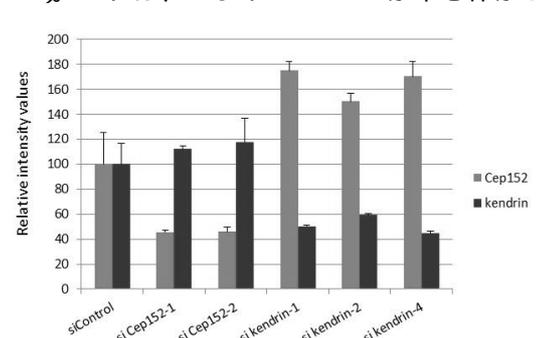


図5. siRNA処理による中心体局在の変化

脱離した後、Cep152 が効率よく中心体へと集積する事で、新たな中心体複製を開始できると考えられる。

さらに、kendrin の発現抑制を行った細胞を G1/S 期に同調し、解放 8 時間後では細胞が S 期を通過し G2 期にあるが、この状況下では中心体の新たな複製が阻害されている事がわかった。同様の条件下で Cep152 の発現抑制を行った細胞についても新規の中心体複製が抑制されている可能性が明らかになった(図 6)。

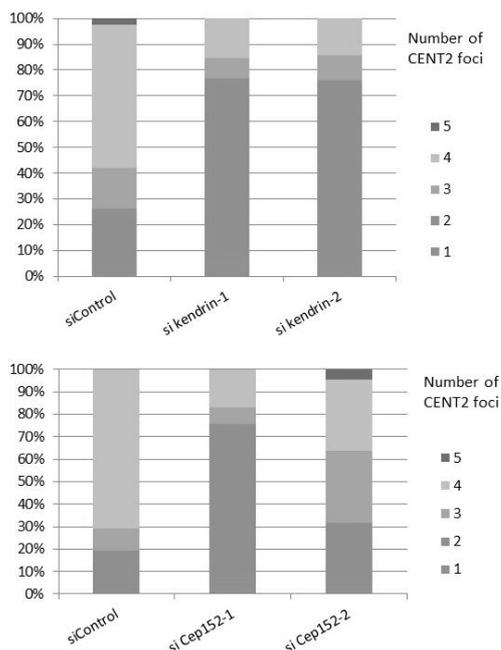


図6. KendrinおよびCep152のsiRNAによりS期での中心体複製は抑制される。

本研究では、kendrin の中心体複製開始初期での機能解析を行ってきたが、申請者は本課題を遂行している際に G1 期において kendrin の発現抑制を行うと一次繊毛の形成が阻害される可能性を見出した。今後は更に G1/G0 期の中心体における kendrin の機能解析を行う事で、中心体複製周期を通した kendrin の役割を明らかにし、中心体複製機構の詳細なメカニズム解明を目指したいと考えている。

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 2件)

Tsuji T, Matsuo K, Nakahari T, Marunaka Y and Yokoyama T

Structural base of the Inv compartment and ciliary abnormality in the Inv mutant mice. Cytoskeleton(Hoboken) 73 巻、2016、45-56
DOI:10.1002/cm.21264. 査読あり

Takahashi M, Matsuo K

More isn't always better: limiting centrosome size in interphase. Cell Cycle 12 巻、2013、1482

DOI:10.4161/cc.24853 査読なし

[学会発表](計 3件)

松尾和彦、中張隆司、丸中良典、横山尚彦
第 121 回日本解剖学会総会・全国学術集会
ビックパレット福島(福島県郡山市)

2016年3月28日~30日

若年性ネフロン癆(NPHP)原因遺伝子 Inv/Nphp2 の網膜および気管上皮における機能解析

Matsuo K, Tsuji T, Nakahari T, Marunaka Y and Yokoyama T

FASEB Science Research Conference: Biology of Cilia Flagella
Snowmass, Colorado, USA.

Jul. 19 - 24 (2015)

Structural base of the Inv compartment and ciliary abnormality in the Inv mutant mice.

松尾和彦、高橋美樹子

第 86 回日本生化学会

パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

2013年9月11日~13日

Functional analysis of centrosomal protein kendrin in centriole duplication.

[図書](該当なし)

[産業財産権](該当なし)

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/anat2/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

松尾 和彦(MATSUO, Kazuhiko)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号: 70599753

(2)研究協力者

高橋 美樹子(TAKAHASHI, Mikiko)

帝京平成大学・薬学部・教授

大隅 圭太(OHSUMI, Keita)

名古屋大学・大学院理学研究科・教授

洲崎 敏伸(SUZAKI, Toshinobu)

神戸大学・大学院理学研究科・准教授