

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840060

研究課題名(和文) 微小管結合蛋白質Furryの紡錘体形成及び劣性遺伝性精神遅滞における機能解明

研究課題名(英文) Functional analysis of microtubule-binding protein, Furry, in the formation of mitotic spindle and recessive mental retardation

研究代表者

永井 友朗 (Nagai, Tomoaki)

東北大学・生命科学研究科・助教

研究者番号：10723059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Furry(Fry)は酵母からヒトに至るまで進化的に保存された遺伝子であり、酵母やショウジョウバエの細胞の極性化や形態形成に関わる一方、哺乳類細胞の分裂期紡錘体形成に必須である。しかし、Fryによる紡錘体形成の制御機構は不明である。本研究では分裂期紡錘体形成におけるFryの機能解明を目的として研究を実施し、Fryの新規結合タンパク質としてCCT複合体およびSav1を同定した。また、最近劣性遺伝性精神遅滞の原因遺伝子として同定されたFry変異体について、細胞レベルでの機能解析を行った。解析の結果、Fry変異体は微小管の安定化能、およびNDRとPlk1に対する結合能を喪失していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Furry (Fry) is a large protein that is evolutionarily conserved from yeast to human. Fry and its orthologues are implicated in the control of cell growth and morphogenesis. Mammalian Fry is essential for the formation of mitotic spindle. In this study, we investigated the role of Fry in the formation of mitotic spindle and identified CCT complex and Sav1 as novel Fry-binding proteins. Although Fry directly binds to CCT, it is not involved in the regulation of folding activity of CCT. We also investigated the role of Fry mutant (R1197X), which is the causal mutation in recessive mental retardation. This mutant (N-1196) cannot bind to Plk1, an essential kinase for the formation of bipolar mitotic spindle, due to lack of C-terminal binding region of Fry. Moreover, although Fry binds to microtubules and NDR via its N-terminal region, Fry N-1196 cannot bind to them. These results suggest that Fry R1197X mutation lacks the specific function of its wild-type.

研究分野：生物学

キーワード：分裂期紡錘体 Furry 微小管 体細胞分裂 劣性遺伝性精神遅滞

1. 研究開始当初の背景

細胞分裂時における紡錘体の正常な構築は、複製された染色体を娘細胞に均等に分配するための重要なプロセスである。紡錘体が正しく染色体を分配するためには、2つの中心体を極とした双極性の確立と、紡錘体を構成する微小管が染色体を捕捉し赤道面に整列させることが必須である。紡錘体系以上による染色体分配の失敗は、癌をはじめとする様々な疾患の原因となる染色体不安定性を引き起こす。そのため、紡錘体形成は極めて精巧なメカニズムによって制御されていると考えられているが、その全容は多くが不明である。

Furry(Fry)は酵母からヒトに至るまで高度に保存された遺伝子であり、癌抑制シグナル伝達経路であるHippo経路に属するNDRキナーゼの活性化因子であることが知られている。酵母やショウジョウバエを用いた解析によって、FryやNDRが細胞の極性化・上皮細胞の伸長および神経突起の分岐の確立に必須であることが知られている。しかし、Fryの生理機能の分子基盤は全く明らかになっていない。私たちは、哺乳類細胞におけるFryの機能解析を世界に先駆けて行い、siRNAを用いたFryの発現抑制によって、体細胞分裂中期における紡錘体の正常な構築や染色体整列に異常を生じることを見出した。また、Fryは特にN末端側において微小管結合能を有し、分裂期特異的に紡錘体微小管上に集積すること、N末端側での微小管結合を介して微小管の束化・安定化を促すとともに、チューブリン脱アセチル化酵素 Sirtuin-2 (SIRT2)の活性を抑制することで、分裂期紡錘体の微小管アセチル化を促進していることを見出した。また、FryはN末端側を介してHippo経路のキナーゼであるNuclear Dbf2-related kinase (NDR)と結合しその活性化を促していることを見出した。また、Fryは分裂期においてCyclin-dependent kinase-1 (Cdk1)、Polo-like kinase-1 (Plk1)、Aurora-Aなどの分裂期キナーゼによってリン酸化され、さらにPlk1の活性化を介して双極性紡錘体の正常な構築を制御していることを見出した。しかし、Fryが分裂期において紡錘体微小管に局在化するメカニズムや、NDR1やPlk1の活性化を介した紡錘体構築の分子機構の詳細は不明である。

また、最近劣性遺伝性精神遅滞・知的障害の原因遺伝子を探索するための大規模シーケンシング解析において、Fryの変異体(R1197X)が同定された。そこで、疾患の原因となるFry変異体の機能解析を細胞レベルで行うことによって、未だ明らかでなかったFryの生理機能や疾患との関連が解明されるとともに、精神遅滞の分子基盤の解明に貢献することが期待された。

2. 研究の目的

私たちは、先行研究においてFryが微小管

結合能を有し、分裂期特異的に紡錘体微小管上に集積すること、Hippo経路のキナーゼであるNDR、分裂期キナーゼであるPlk1の活性化を介して双極性紡錘体の正常な構築を制御していることを見出した。FryのN末端側を介した微小管・NDR・SIRT2との相互作用は分裂期特異的であること、また分裂期においてC末端側がリン酸化されることから、FryのN末端側におけるタンパク質相互作用は、間期においてC末端側との分子内結合によって阻害されており、分裂期におけるFryのリン酸化によって分子内結合が外れ、紡錘体への局在化・NDRの活性化が引き起こされるのではないかと予想された。本研究では、Fryの分裂期特異的な紡錘体微小管への局在化機構、Fryによる紡錘体構築の分子機構の解明を目指す。また、Fryの劣性遺伝性精神遅滞の原因となる変異体に相当するN末端断片変異体を作製し、細胞レベルでの変異体の機能解析を行う。

3. 研究の方法

本研究では、哺乳類細胞の分裂期紡錘体形成におけるFryの役割を明らかにするため、以下の解析を行った。まず、FryのN末端側とC末端側の分子内結合を免疫沈降法によって解析し、C末端側のリン酸化が与える影響を検証する。また、Fryによる紡錘体構築機構を明らかにするために、LC-MS/MS法による質量分析を用いたFry新規結合タンパク質の探索を行う。新規結合タンパク質とFryの相互作用を免疫沈降法およびpull-down法によって検証するとともに、Fryの発現抑制によってその機能に与える影響を検証する。また、Fryの劣性遺伝性精神遅滞の原因となる変異体(R1197X)はFryの1197番目のアルギニンが終止コドンに置換したナンセンス変異であり、N末端断片変異体(Fry N-1196)がこれに相当する。そこで、Fry N-1196変異体を作製し、これをもちいて微小管・NDR・Plk1との結合能を解析する。微小管の結合能については、Fry N-1196変異体を過剰発現させた細胞における微小管の束化・アセチル化の亢進を解析することにより評価し、NDR・Plk1との結合能については免疫沈降法により評価した。

4. 研究成果

(1) Fryの分子内結合による紡錘体局在化制御機構の検証

FryのN末端側およびC末端側の断片変異体をHEK293T細胞に発現させ、免疫沈降を行った結果、FryのN末端側とC末端側同士が細胞内で結合することを見出した。この分子内結合が分裂期において乖離するかどうかを、断片変異体を発現させたHEK293T細胞をダブルチミジンプロック法および微小管重合阻害剤ノコダゾール処理によって分裂期に同調させた細胞を用いて検証したが、分裂期における分子内結合の変化は見られな

った。また、Fry の N 末端断片の過剰発現による微小管の束化が、C 末端断片との共発現によって阻害されるかどうかを検証したが、顕著な阻害効果は見られなかった。また、Cdk1 阻害剤ロスコピチンやキナーゼ阻害剤スタウロスポリンの処理による分子内結合への影響を検証したが、顕著な影響は認められなかった。以上の結果から、Fry の N 末端断片と C 末端断片は細胞内で互いに結合したが、分子内結合による微小管結合能の阻害や分裂期におけるリン酸化の効果は認められなかった。

(2) Fry 新規結合タンパク質の同定

Fry の新規結合タンパク質として、アクチンやチューブリンなどの細胞骨格タンパク質をはじめとするタンパク質のフォールディングや品質管理に関わる Cytosolic chaperonin complex (CCT) 複合体のコンポーネントを同定した。Fry と CCT1 のリコンビナントタンパク質を、バキュロウィルスシステムを用いて精製し、pull-down 法によって両者が直接的に相互作用していることを明らかにした。Fry の断片変異体を用いた結合解析から、Fry と CCT1 が N 末端側および C 末端側で相互作用することを明らかにした。また、CCT のタンパク質折り畳み活性に対する Fry 発現抑制の効果も、アクチンを基質とした *in vitro* folding assay によって検証したが、コントロール細胞と比較して顕著な影響は見られなかった。以上の結果から、Fry と CCT 複合体は直接的に相互作用するが、CCT の活性には影響しないことが示された。

さらに、Fry の新規結合タンパク質として、Hippo 経路のコンポーネントである Sav1 を同定した。Sav1 は MST キナーゼの活性化に関わることが知られており、このことから Fry は PIK1 や NDR に加えて、MST キナーゼの機能にも寄与している可能性が考えられる。

(3) 劣性遺伝性精神遅滞の原因となる Fry 変異体の機能解析

劣性遺伝性精神遅滞の原因遺伝子として同定された Fry の変異体は、1197 番目のアルギニンが終始コドンに置換したナンセンス変異 (R1197X) である。この変異体に相当する Fry の N 末端断片変異体 (N-1196 変異体) を作製し、HeLa 細胞に発現させ微小管の安定化能を検証した。微小管の安定化能は、安定化した微小管の指標であるアセチル化チューブリンに対する抗体染色により評価した。その結果、1-730AA の N 末端断片を過剰発現させるとアセチル化微小管の強い束化および染色強度の著しい増大が見られた一方、Fry N-1196 の過剰発現では、微小管の束化およびアセチル化レベルの亢進は見られなかった。このことは、Fry N-1196 変異体では N 末端側でみられる微小管安定化能が著しく低下していることを示唆している。さらに、Fry の結合タンパク質である NDR や PIK1 との相互

作用を解析した。両者の相互作用は、HEK293T 細胞に Fry N-1196 と NDR1 または PIK1 の発現プラスミドを共発現させ、免疫沈降法により解析した。私たちは以前に Fry は PIK1 と C 末端側で結合することをすでに見出しており、予想通り Fry N-1196 変異体では PIK1 との相互作用は認められなかった。また、Fry は N 末端側において NDR と相互作用するが、Fry N-1196 変異体では NDR との相互作用も認められなかった。以上の結果から、Fry N-1196 は C 末端側の欠損だけでなく、N 末端側の機能も著しく損なっていることが明らかになり、このことから R1197X 変異体が NDR や PIK1 に対する活性化能を著しく損なっていることが示唆された。微小管の安定化・NDR1 および PIK1 の活性化はいずれも分裂期紡錘体形成に深く関わっていることが知られていることから、R1197X 変異体による精神遅滞には紡錘体形成異常が関与している可能性が考えられる。

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1件)

Nagai, T., Mizuno, K. Multifaceted roles of Furry proteins in invertebrates and vertebrates. *J. Biochem.*, 査読有、155巻、2014年、137-146、10.1093/jb/mvu001.

[学会発表](計1件)

Irie, K., Nagai, T., Mizuno, K., Functional roles of Furry, a causal protein of neurological disorders, in microtubules, The 2nd Taiwan-Tohoku University Neuroscience Workshop for Young Scientists, 2014年11月30日~12月4日、宮城蔵王ロイヤルホテル(宮城県・仙台市)

[図書](計1件)

永井友朗、水野健作 哺乳類 NDR キナーゼの細胞機能-もう一つの Hippo 下流キナーゼ、医歯薬出版、医学のあゆみ「広がる Hippo pathway 研究-癌から各種疾患へ」、2014年、251巻5号、365-370ページ

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

http://www.biology.tohoku.ac.jp/lab-www/mizuno_lab/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永井 友朗 (NAGAI, TOMOAKI)
東北大学・大学院生命科学研究科・助教
研究者番号：10723059

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし