

30. 超微小空間における中心小体形成初期の分子機構の解明

北川 大樹

情報・システム研究機構 国立遺伝学研究所 分子遺伝研究系 中心体生物学研究部門

Key words : 中心体, 中心小体, 細胞生物学, 細胞分裂, 超解像顕微鏡

緒言

中心体は動物細胞において進化上保存された自己複製する細胞小器官であり微小管形成中心として機能する。中心体複製は細胞周期ごとに一度だけ起こるように厳密に制御されており、分裂期における二極化した紡錘体の形成過程において重要である。中心体複製は娘細胞への均等な染色体分配、正常な細胞分裂に必須であるばかりでなく、その結果としてゲノム安定性維持にも深く関与している。癌の初期過程におこる中心体の過剰複製は癌の悪性化に繋がること指摘されており、実際に多くのヒト癌細胞で中心体の過剰複製が観察されている。中心体はその核として機能する中心小体及びそれを取り囲むPCM (pericentriolar material) から構成されている。また、中心小体は精子鞭毛や繊毛の形成を調節しており中心小体が正常に機能しないと鞭毛や繊毛が形成されず、様々な疾病が起きることが報告されている (ciliopathy、男性不妊症など)。中心小体は9回対称性を有した円筒状の特徴的な構造体で、その不思議な自己複製機構は未解明な部分が多く、細胞生物学の最大の謎の一つとされている。中心小体は幾つかの段階を経て構築される。初期過程では、基底部分であるカートホイール構造が構築され、伸長及び成熟過程を経てその構築が完了する。各過程は細胞周期に同調して進行するが、どのような分子間相互作用を介して中心小体が段階的に構築されるかは不明な点が多い。

我々は、中心小体構築開始の分子機構を解明することを目的とし、カートホイール構造に局在し、中心小体複製に必須かつ進化上保存された蛋白質である SAS-6 (Spindle ASsembly abnormal protein-6) に着目し、その機能解析を行ってきた¹⁻⁵⁾。これまでに 1) 線虫初期胚を用いて、SAS-6 のカーゴ分子である SAS-5 が PP2A ホスファターゼにより脱リン酸化されることで細胞質中に存在する SAS-6 を中心小体近傍まで能動的に輸送することを示した¹⁾。2) さらに、X 線構造解析及び超遠心分析を用いて、クラミドモナス SAS-6 二量体が自己会合することでカートホイール構造の中心部を形成し、進化上保存された中心小体の 9 回対称構造を規定することを初めて証明した⁵⁾。しかし、ヒトを含む高等真核生物において、SAS-6 が同様の分子特性、特にカートホイール構造のコンポーネントとして機能するか？また、カートホイール構造の中心小体形成における役割など、ヒト培養細胞における解析が立ち遅れていた。本研究では、最新の超解像顕微鏡技術と電子顕微鏡解析を用いた *in vitro* 再構成系を融合し、SAS-6 高次複合体形成を中心にした、中心小体構築初期のアッセンブリー機構を高解像度で明らかにすることを主目的とした。

方法

1. 最新型超解像顕微鏡を利用した微小空間における中心小体構築のモデリング

ヒト中心小体構築の初期過程において、構成因子がどのように段階的に複合体を形成することで基底部分であるカートホイール構造が構築され、伸長していくのかを免疫染色、最新型超解像顕微鏡 (Gated-STED 顕微鏡; 解像度~30 nm) を用いて詳細に記述した。レファレンスとして、中心小体の外郭、伸長の程度をモニターできる Cep192 抗体を用いた。細胞周期を同調させたヒト培養細胞を用いて各ステージにおける中心小体構成因子 (HsSAS-6, STIL, Plk4) の微小空間における局在、量、因子間の距離を測定した。特に、抗体で認識されるシグナルの量、形などはイメージプロセッシングにより定量化した。また、RNAi 法や阻害剤などを併用することで、各因子の中心小体局在における階層性の検討を行った。以上の解析から、初期過程において形成されるカートホイール構造の高解像度分子マッピングを行った。

2. Lipid-Monolayer 法を用いた中心小体構築の *in vitro* 再構成

中心小体の複製はその基底部にあたるカートホイール構造から始まる。これまで、中心小体複製に必須の蛋白質であるクラミドモナス SAS-6 が自己会合することで、カートホイール構造の中心部分が構築されるモデルを提唱してきた⁵⁾。本研究では、HsSAS-6 が複合体を形成することで、どのようにカートホイール構造の形成を開始できるのか、HsSAS-6 リコンビナント蛋白質を用いた *in vitro* 再構成系を用いて明らかにした。複合体形成の効率化を図るために、脂質一重膜上において蛋白質を二次元上で集約、結合させる Lipid-Monolayer 法を用いた。また、電子顕微鏡画像を用いたイメージプロセッシングによる HsSAS-6 複合体の構造モデルの確立を行った。

結果および考察

1. 超解像顕微鏡によるカートホイール構造構成因子の局在解析

ヒト培養細胞である U2OS 細胞において内在の Plk4、STIL、HsSAS-6 の細胞周期依存的な細胞内局在、特に娘中心小体形成過程での詳細な局在を観察した (図 1)。この三因子は中心小体形成に必須の進化的に保存された因子であり、各々単独の過剰発現で娘中心小体を同時に複数形成できる限られた因子である。娘中心小体形成過程の全てにおいて、この 3 因子は局在を共にしていた。最初に、母中心小体壁上に約 100 nm 幅のドット上に 3 因子は共局在し、興味深いことに、細胞周期が G1 期から S 期に進行すると、ドット状から縦方向に伸長していく様子が観察された。これまでの電子顕微鏡の観察などから、これはカートホイール構造が幾つかの層として積み上げられ、娘中心小体の基底部を形成する過程を現していると推測される。Cep192 が娘中心小体細胞壁に局在する前から、上記の 3 因子の共局在が観察されることから、かなり早期の段階で 3 因子のアッセンブリーから、秩序だったカートホイール構造の層形成が完了していることが示唆される。着目すべきは、Cep192 がマークする娘中心小体細胞壁の位置を考慮すると、3 因子のアッセンブリーが娘中心小体基底部から約 100 nm ほど離れた場所から始まり、その後縦方向に伸びていく点である。想定外ではあるが、母中心小体壁近傍で一度 3 因子は複合体を形成したのちに、カートホイール構造として取り込まれることが推測される。

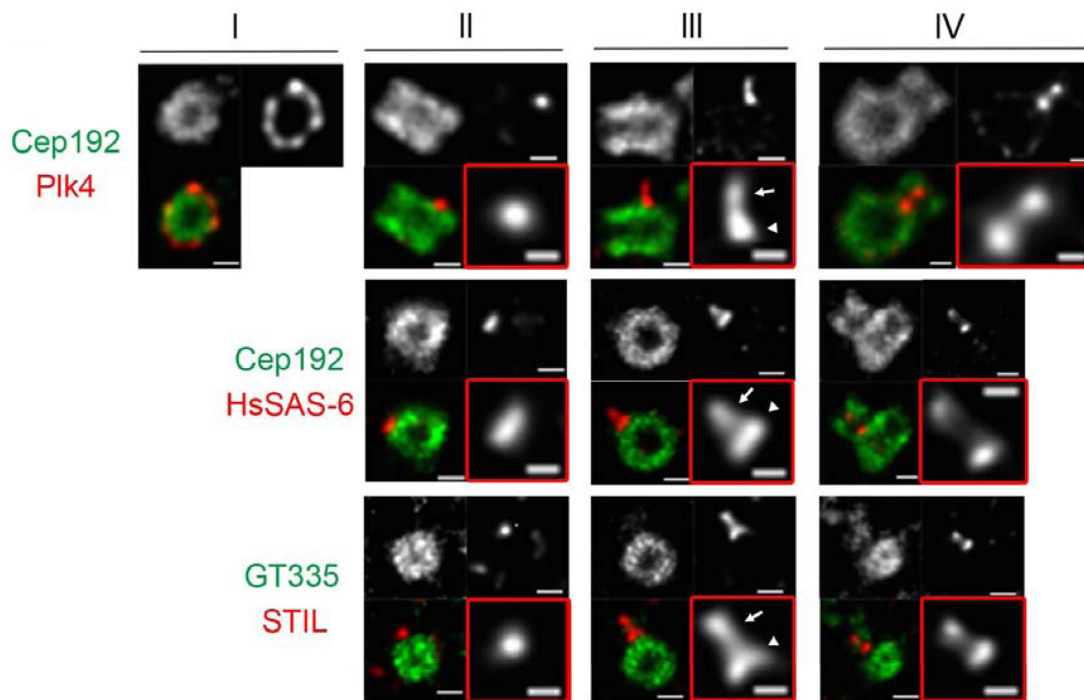


図1. 超解像顕微鏡観察による中心小構成因子の局在

ヒト U2OS 細胞を用いた免疫染色。超解像顕微鏡 (STED) による各因子の中心小体における局在解析。Cep192 により中心小体壁がマークされ、母中心小体の形が判別できる。I-IV ステージがそれぞれ G1、G1/S、S、G2 期に大体相当する。III ステージにおいて、Plk4、STIL、HsSAS-6 ドットが縦方向に伸長している様子が観察される。中心小体基底部のカートホイール構造が形成され、積み上げられることに起因すると推測される。スケールバー: 100 nm。

次に、カートホイール構造の役割を明確にすることを目的に、AID (Auxin-inducible-degron) 法を用いて、内在 HsSAS-6 を短時間でタンパク分解により除去できる HCT116 細胞株の作製を行った (図2)。この細胞株においては、植物ホルモンであるオーキシンを添加することにより、細胞質に存在する HsSAS-6 は 30 分程度、中心小体に局在する HsSAS-6 は 3~6 時間程度で分解することが確認された。G1 期から HsSAS-6 を分裂期にいたるまで分解し続けると、予想どおり、娘中心小体の形成は完全に阻害された。一方、S 期中期に一過的にオーキシンを添加した場合においては、娘中心小体は形成され、次の細胞周期においても微小管形成中心として機能した。これら一連の結果は、カートホイール構造が娘中心小体形成初期には重要であるが、形成途中から前駆体の安定性には必要でないことを示している。S 期中期においては、幾つかの進化的に保存された因子の娘中心小体へのリクルートが観察されたことから、これら因子群が娘中心小体前駆体の安定性を保証している可能性が考えられた。これらの結果は、細胞周期の中心小体形成過程におけるカートホイール構造の役割を明確に示した初めての知見である。

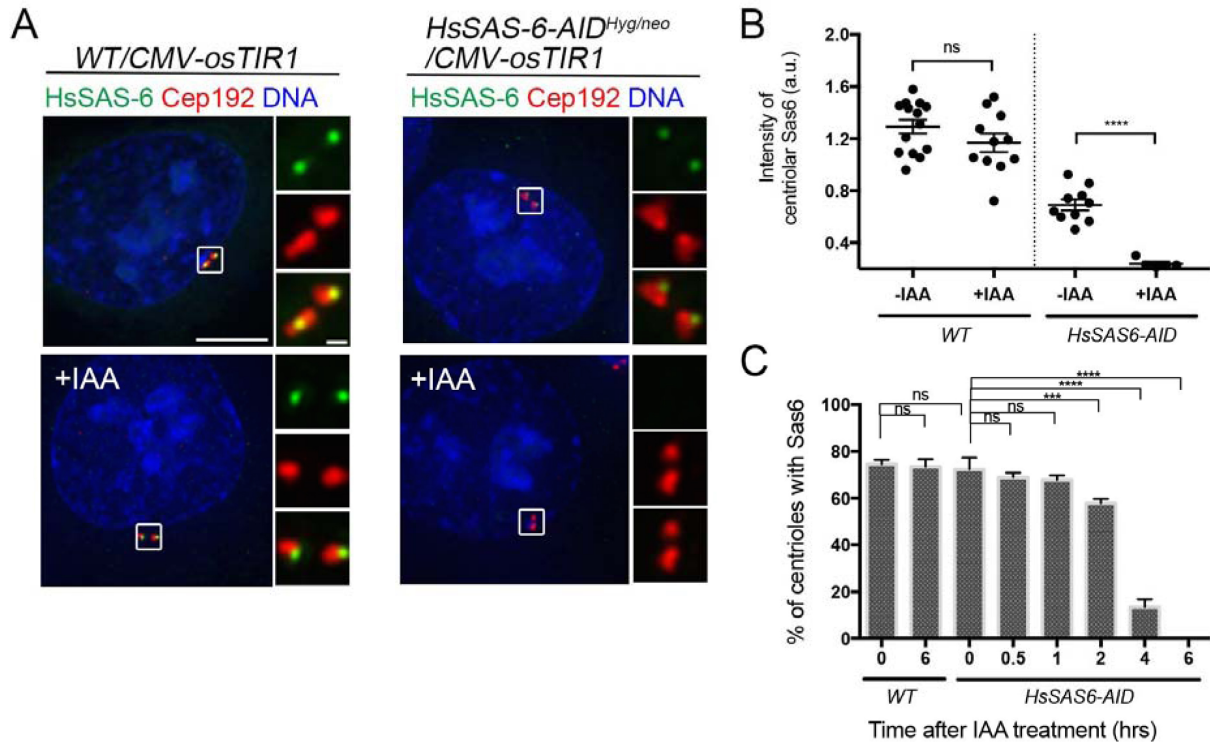


図2. AID システムによる HsSAS-6 デグロン細胞の作製

ヒト HCT116 細胞を用いて、内在 HsSAS-6 が短時間にタンパク質分解を介して除去される細胞を作製。この細胞では、TIR が過剰発現されており、内在の SCF 複合体と結合し、植物ホルモンであるオーキシン存在下、AID tag を付加された内在 HsSAS-6 を分解する。Crispr-Cas9 を用いて内在 HsSAS-6 に AID を付加した。(A) 内在 HsSAS-6 はオーキシン (IAA) の添加により分解される。(B、C) HsSAS-6 分解のキネティクス。(B) 細胞質 HsSAS-6 の分解。(C) 中心体に局在する HsSAS-6 の分解。国立遺伝学研究所鐘巻研究室との共同研究。Scale Bar: 10 μ m. 統計処理は one-way ANOVA を用いた。***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$; ns, not significantly different ($p > 0.05$)。

2. HsSAS-6 精製タンパク質を用いたカートホイール構造中心部の再構成

これまで、SAS-6 精製タンパク質を用いた *in vitro* 再構成実験はクラミドモナス SAS-6 に限られていた。我々は、C 末端領域を一部欠損した HsSAS-6 (Human SAS-6) リコンビナントタンパク質を大腸菌から精製した。最初に、クラミドモナス SAS-6 と同様の方法で *in vitro* 再構成を試みたが、クラミドモナス SAS-6 の際に観察されたような、カートホイール構造中央部に類似した複合体は観察されなかった。そこで、複合体形成の効率化を図るために、脂質一重膜上において蛋白質を二次元上で集約、結合させる Lipid-Monolayer 法を用いた。その結果、カートホイール構造に類似したリング様構造を形成させることに成功した (図3)。リングの直径、また SAS-6 二量体間の形成する角度を多数定量し、平均値や SD 値を算出した結果、約 20 nm 直径の 9 回対称性を有したリング様であることが明らかとなった。この結果は、SAS-6 の分子特性、複合体様式が進化的によく保存されていること、カートホイール構造の中心部は SAS-6 複合体により形成され、中心小体の 9 回対称構造が構築されることを示している。さらに、HsSAS-6 の細胞生物学的、生化学的解析から、HsSAS-6 のコイルドコイルドメインを含む C 末端領域は STIL との結合、カートホイール構造の形成に重要であることから、この領域がカートホイール中央部と外枠部との連結に重要であることを見出した。以上の一連の結果は、ヒト中心小体基底部に存在するカートホイール構造の分子基盤の詳細を明らかにしたものである。

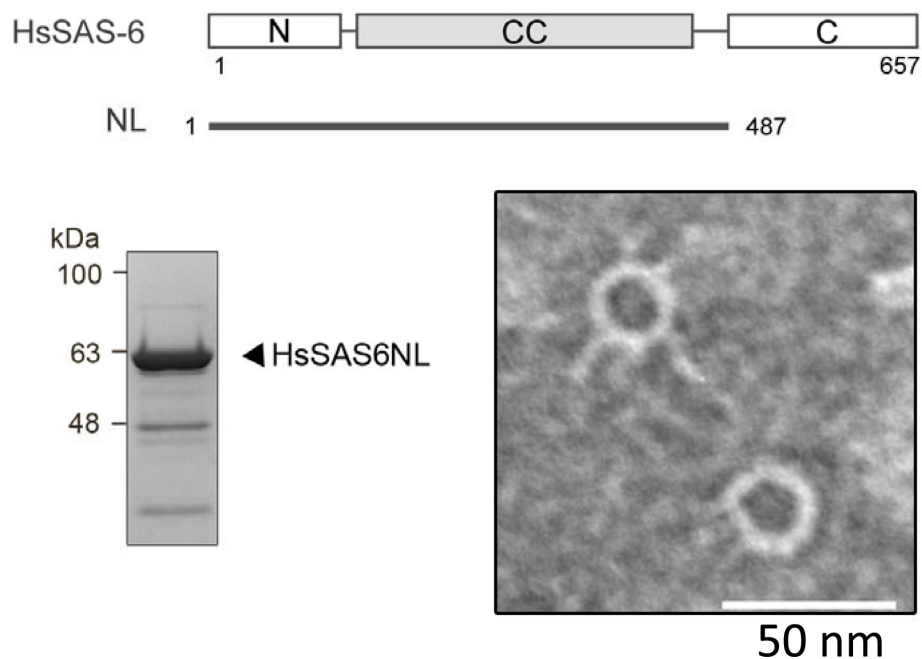


図 3. HsSAS-6 複合体-9 回対称性を有するリング構造の *in vitro* 再構成

精製 HsSAS-6 リコンビナントタンパク質を大腸菌から精製。C 末端欠損の HsSAS-6NL (N-long)。Lipid-monolayer 法を用いた電子顕微鏡観察像。リング様構造が観察される。リング中央から伸びるスポークスの角度を計測した結果、9 回対称性を有することを見出した。

以上、一連の研究結果は現在論文として取りまとめ、国際科学雑誌に投稿中である (Yoshida S. *et al.* (submitted))。

共同研究者

本研究の共同研究者は、国立遺伝学研究所分子遺伝研究系中心体生物学研究部門の吉場聡子助教、国立遺伝学研究所分子遺伝研究系分子機能研究部門の鐘巻将人教授である。

文 献

- 1) Kitagawa D., Flückiger I., Polanowska J., Keller D., Reboul J. and Gönczy P. (2011) PP2A phosphatase acts upon SAS-5 to ensure centriole formation in *C. elegans* embryos. *Developmental Cell*, 20, 550-562.
- 2) Tsuchiya Y., Yoshida S., Gupta A., Watanabe K. and Kitagawa D. (2016) Cep295 is a conserved scaffold protein required for generation of a bona fide mother centriole. *Nature Communications*, doi: 10.1038/ncomms12567.
- 3) Shiratsuchi G., Takaoka K., Ashikawa T., Hamada H. and Kitagawa D. (2015) RBM14 prevents assembly of centriolar protein complexes and maintains mitotic spindle integrity. *The EMBO Journal*, 34, 97-114.
- 4) Ohta M., Ashikawa T., Nozaki Y., Kozuka-Hata H., Goto H., Inagaki M., Oyama M. and Kitagawa D. (2014) Direct interaction of Plk4 with STIL ensures formation of a single procentriole per parental centriole. *Nature Communications*, doi: 10.1038/ncomms6267.
- 5) Kitagawa D., Vakonakis I., Olieric N., Hilbert M., Keller D., Olieric V., Bortfeld M., Erat M.C., Flückiger I., Gönczy P. and Steinmetz M.O. (2011) Structural basis of the 9-fold symmetry of centrioles. *Cell*, 144, 364-375