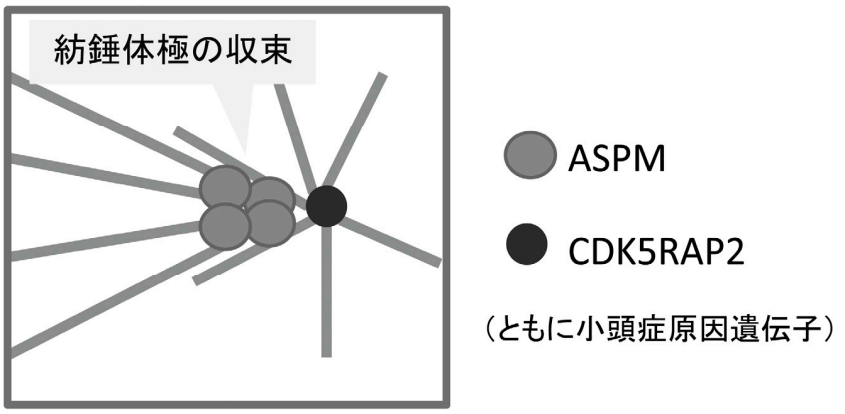
40　2つの小頭症原因遺伝子による細胞分裂制御機構の解明	五島　剛太

【目的】*ASPM* は、常染色体劣性遺伝性疾患である小頭症（autosomal recessive primary microcephaly, MCPH）の原因遺伝子として同定された。現在までに、MCPH の原因として 10 を超える遺伝子が特定されているが、そのうち最も頻繁に変異が認められるのが *ASPM* 遺伝子である。ASPM タンパク質は紡錘体の極に局在するが、細胞分裂における機能はほとんど明らかになっていなかった。

【方法】ASPM の紡錘体内機能を検証するため、ヒト培養細胞である HCT116 細胞を用いた細胞生物学的解析を行った。

【結果】まず、*ASPM* ノックアウト株を作製し、生細胞観察を行ったが、紡錘体の形態や分裂期の進行に関する異常は認められなかった。ところが、別の小頭症原因遺伝子で中心体に局在する CDK5RAP2 を分解すると、*ASPM* ノックアウト株で紡錘体の極収束異常と分裂期の著しい遅延が引き起こされることを発見した。これにより、紡錘体の極形成過程において、ASPM が CDK5RAP2 と冗長的に機能することが示された。さらに、小頭症患者の *ASPM* 変異が細胞内で及ぼす影響を検証するため、患者から同定された *ASPM* 変異を導入した株を作製した。その結果、CDK5RAP2 が存在しない条件で、同じような極収束異常が観察された。

ASPM と CDK5RAP2 による紡錘体極収束



40. 2 つの小頭症原因遺伝子による細胞分裂制御機構の解明

五島　剛太

*名古屋大学 大学院理学研究科 生命科学専攻 機能調節学講座

Key words：小頭症，紡錘体，微小管，細胞分裂，ASPM

緒　言

細胞分裂の際に遺伝物質を正確に配分することは、遺伝情報を維持する上で非常に重要である。紡錘体は、遺伝物質である染色体の分配に必要とされる巨大な構造物であり、主に微小管と呼ばれる極性を持った細胞骨格によって形成される。動物細胞の有糸分裂では、紡錘体は 2 つの極を持った菱形をしており、微小管のプラス端側が紡錘体中央に、マイナス端側が極に集積することが知られている。紡錘体の極には中心体と呼ばれる微小管形成を行う構造体が存在する。そのため長い間、中心体から伸長した微小管が紡錘体を形成することで、極を持った紡錘体構造が形成されると考えられていた。ところが、近年、中心体非依存的な微小管形成経路が明らかになったことで、紡錘体形成機構が改めて見直されるようになった。現在では、紡錘体内部にも様々な長さの微小管が存在しており、それらのマイナス端が何らかの働きで収束することで、紡錘体の極が形成されると考えられている。しかしながら、これまでに報告された極形成に関するモデルはどれも限定的であり、不明な点が多い。

Asp は、ショウジョウバエで同定された極形成因子である。Asp の機能を阻害すると、紡錘体の極領域で微小管マイナス端が収束せずに広がり、染色体の分配異常が誘発される。Asp と全長にわたりアミノ酸配列が相同なヒト遺伝子は *ASPM* であり、小頭症原因遺伝子としてよく知られている。しかしながら、ASPM タンパク質が極形成時に機能を果たすというデータはこれまで得られていなかった。

方　法

実験はヒト HCT116 細胞を用いて行われた。AID 法では HCT116 Tet-OsTIR1 細胞を用いた。*ASPM* ノックアウト株（*ASPM* KO）は、sgRNA 配列と SpCas9 配列を持った CRISPR/Cas9 プラスミドと、相同配列の間にネオマイシン耐性遺伝子を持つドナープラスミドを用意し、オリジナルの HCT116 細胞へ同時に導入した。*ASPM* の完全ノックアウト株（*ASPM* KOC）は、sgRNA 配列と SpCas9 配列のセットを 2 つ持ち、それぞれが ASPM のアミノ末端とカルボキシル末端を標的にしている CRISPR/Cas9 プラスミドと、相同配列の間にネオマイシン耐性遺伝子を持つドナープラスミドを用意し、オリジナルの HCT116 細胞へ同時に導入した。mAID タグを持った CDK5RAP2 の分解には、OsTIR1 発現を誘導するドキシサイクリンと mAID 融合タンパク質の分解を誘導する IAA を利用した。細胞観察にはスピニングディスク共焦点顕微鏡を用いた。

結果および考察

1. HCT116 細胞における *ASPM* ノックアウトは有糸分裂異常を引き起こさない

本研究では、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集を利用し、*ASPM* 遺伝子がノックアウトされた HCT116 細胞株の作製を試みた。*ASPM* の翻訳領域全てを欠失させ、薬剤耐性遺伝子と入れ替えた細胞株を作製した（取得した株は KO-C と記載）。2 対立遺伝子が破壊された細胞のクローン株を取得し、抗 ASPM 抗体を用いた免疫染色を行ったところ、極に存在する ASPM の完全な欠失が観察された。これにより、取得したクローン株で *ASPM* 遺伝子は完全に破壊されおり、残存タンパク質を発現しないことが証明された。そこで、この株をライブイメージングしたところ、有

*現在の所属：名古屋大学 大学院理学研究科 生命理学専攻 機能調節学講座

糸分裂紡錘体の形成や有糸分裂の進行に全く異常が見られなかった（図 1）。これにより、HCT116 細胞では、*ASPM* は有糸分裂に必須の遺伝子ではないことが示された。

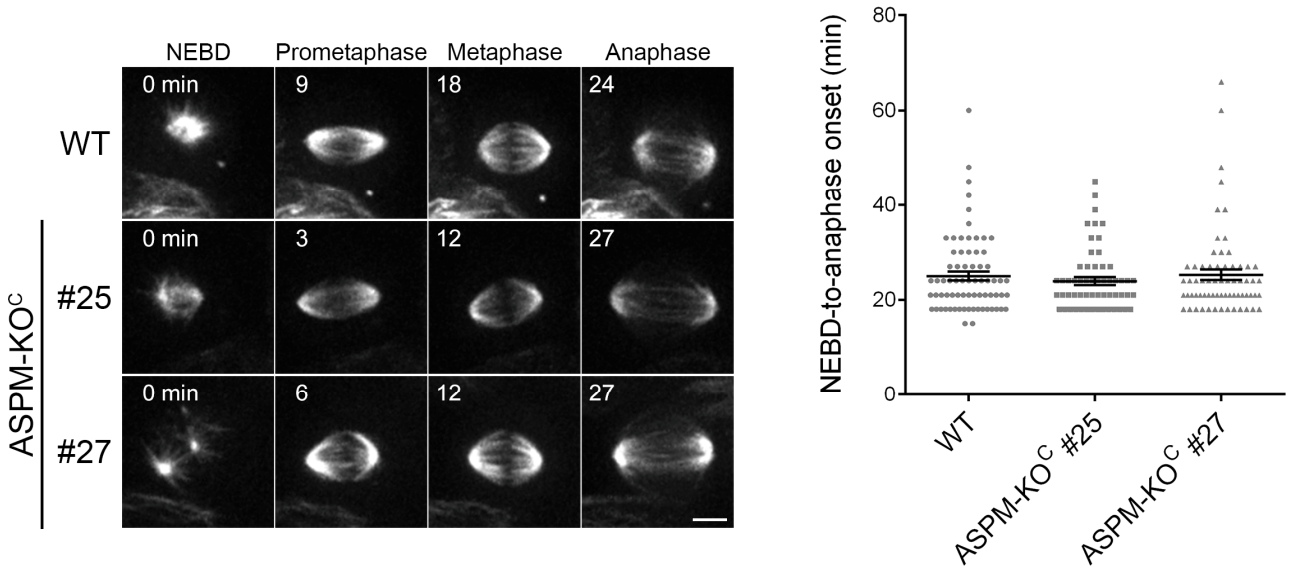


図 1. *ASPM* ノックアウト細胞では紡錘体形成や分裂期進行に異常が現れない

（左）野生株（WT）および *ASPM* 完全ノックアウト細胞（#25、#27 の 2 つのライン）における紡錘体動態。（右）核膜崩壊（NEBD）から分裂後期進入までにかかる時間のプロット。エラーバーは標準誤差を表す。スケールバーは 5 μm。図は文献［9］より転載。

2. ASPM と CDK5RAP2 の二重欠損は紡錘体極の収束異常を引き起こす

ASPM 単独の欠失で表現型が観察されない原因として、中心体の影響が挙げられる。ハエや哺乳類では、中心体が極の収束に必須ではないことが示されている。しかしながら、モータータンパク質や微小管結合タンパク質が相互作用するための微小管を提供する存在として、紡錘体微小管の収束に補助的な役割を担っているとも考えられる［1，2］。そのため、HCT116 細胞では中心体から伸長した微小管が多く存在するために、ASPM 欠失による異常が検出されない可能性がある。

この仮説を検証するため、小頭症原因遺伝子としても知られている CDK5RAP2（別名：CEP215）の欠損を利用した［3］。CDK5RAP2 は、ショウジョウバエの中心体タンパク質 Cnn のオーソログであり、中心体にγ-チューブリン複合体を付着させる働きが報告されている［4］。本実験では、*ASPM* exon1 ノックアウト細胞とコントロール細胞に対して、オーキシンデグロン（auxin-inducible degron, AID）システム［5］を使った CDK5RAP2 の分解を行った。

実験の結果、内在性の ASPM を有する細胞では、たとえ CDK5RAP2 のシグナルが見られない場合であっても、収束した極を持つ双極性の紡錘体が観察された（図 2、2 段目）。具体的には、観察した 22 細胞のうち 21 細胞が正常な紡錘体を有しており、僅かな遅延は見られたものの全て後期へ進行した（核膜崩壊から後期開始までの時間は 22 個の細胞で 30±8 分［平均±標準偏差］であった）。また、ASPM を欠失した細胞株の内部コントロールでは、23 細胞中 22 細胞が収束した極を持つ紡錘体を形成しており、遅延することなく後期へ進行した（24±3 分、n = 22）。ところが一転して、*ASPM* ノックアウト株で CDK5RAP2 が分解されると、中期紡錘体は持続的な極の形成を維持することができなくなった（図 2、最下段）。そのような表現型を見せる細胞は、観察した 83 細胞中 66 細胞存在し、後期開始までの時間が著しく遅延した（核膜崩壊から後期開始まで 1 時間以上必要とする細胞が 44 個観測された）。この結果から、CDK5RAP2 の機能が損なわれた場合、ASPM が紡錘体極の微小管収束に必要であると結論付けられた。

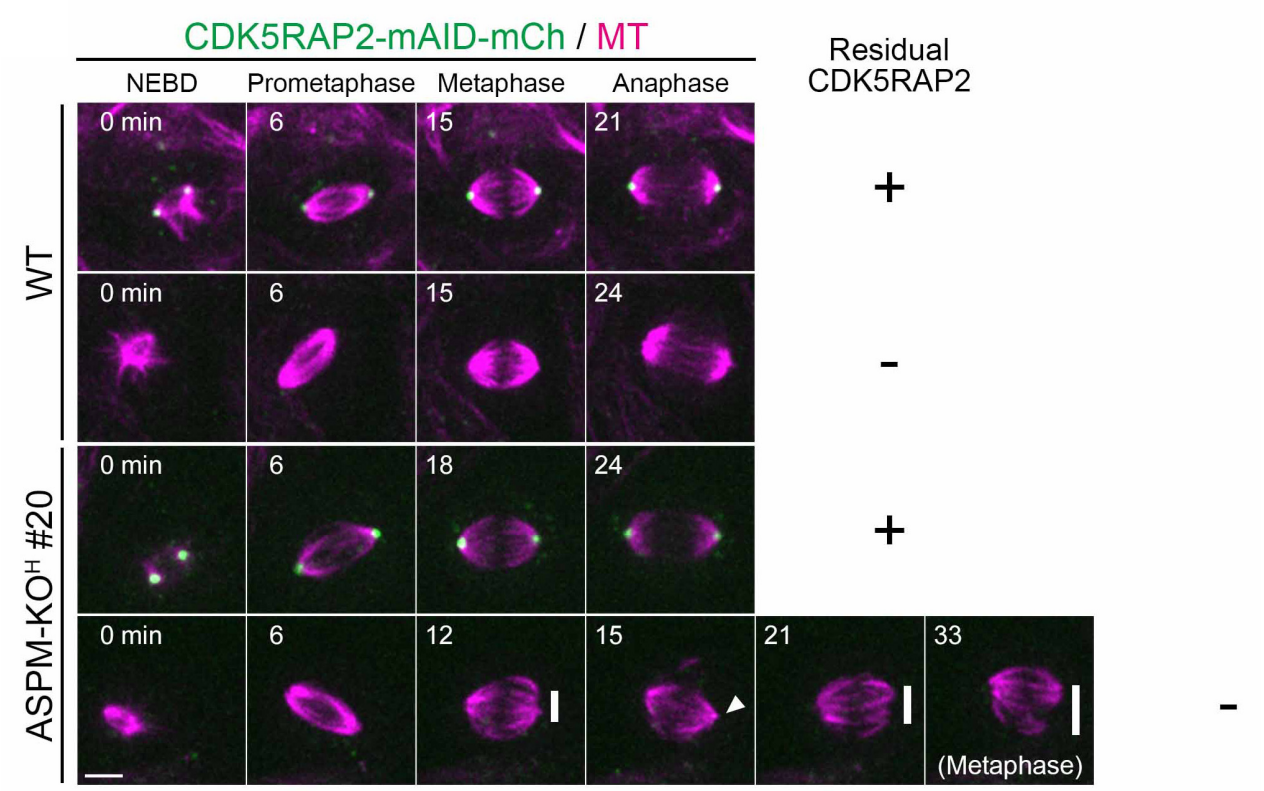


図 2. ASPM と CDK5RAP2 を同時に欠失させると紡錘体極収束異常が引き起こされる

野生株（WT）および *ASPM* ノックアウト細胞（#20 ライン）での紡錘体（マゼンタ）および CDK5RAP2-mCherry（緑）の観察。CDK5RAP2 を欠失した *ASPM* ノックアウト細胞においてのみ紡錘体極の収束異常が認められた（下段）。スケールバーは 5 μm。図の一部は文献［9］より転載。

3. 小頭症の原因となる *ASPM* 変異は CDK5RAP2 非存在下で極の収束異常を引き起こす

小頭症患者で見られる *ASPM* 変異が紡錘体極形成にどのような影響を及ぼすかを検証するため、小頭症変異を導入し、CDK5RAP2 を分解した際に見られる表現型を観察した。これまでの研究から、小頭症患者から同定された *ASPM* の劣性変異が遺伝子配列の様々な部位に存在していること、その多くが早期の終止コドンを誘導する終止変異であることが報告されている［6〜8］。本研究では、最も長い部分欠失断片を発現する変異を模倣することを試みた。最もカルボキシル末端側に位置するホモ接合型変異は、これまでに 2 つ同定されている。1 つは 3233 アミノ酸で起こる終止変異、もう 1 つは 3252 アミノ酸で 1 塩基失われることで 3261 アミノ酸に終止コドンが誘導される変異である。変異を導入するにあたり、CRISPR による遺伝子切断に適した配列を検索したところ、3233 アミノ酸に近い部位に最適な配列が見つかった。そのため、3232 アミノ酸の後ろに mClover タグを挿入することで、小頭症変異を模倣した株（*ASPM* 変異株, ASPM［1-3,232］-mClover）を作製した。また、コントロールとして、*ASPM* 遺伝子のカルボキシル末端に mClover を挿入した株（全長 ASPM 発現株、ASPM-mClover）も同様に作製した。

まず、CDK5RAP2 の分解を起こさずに各株の mClover シグナルを観察したところ、ASPM-mClover と同じく、ASPM［1-3,232］-mClover も極へ局在することがわかった。また、CDK5RAP2 が存在している状態では、*ASPM* 変異株であっても、紡錘体の極収束に異常は見られなかった。ところが CDK5RAP2 を AID システムによって分解すると、*ASPM* 変異株で *ASPM* ノックアウト株と同じような極収束異常が観察された（図 3）。これにより、小頭症患者の変異を模倣した細胞では、ASPM の極形成に関わる機能が損なわれていることが明らかになった。他の小頭症患者から同定された *ASPM* 変異はさらに上流の配列に存在するため、全ての変異で同じような極収束異常が観察されると推測される。

以上、本研究を通じ、小頭症原因遺伝子 *ASPM* と *CDK5RAP2* の紡錘体極収束に対する寄与が初めて明らかにされた。

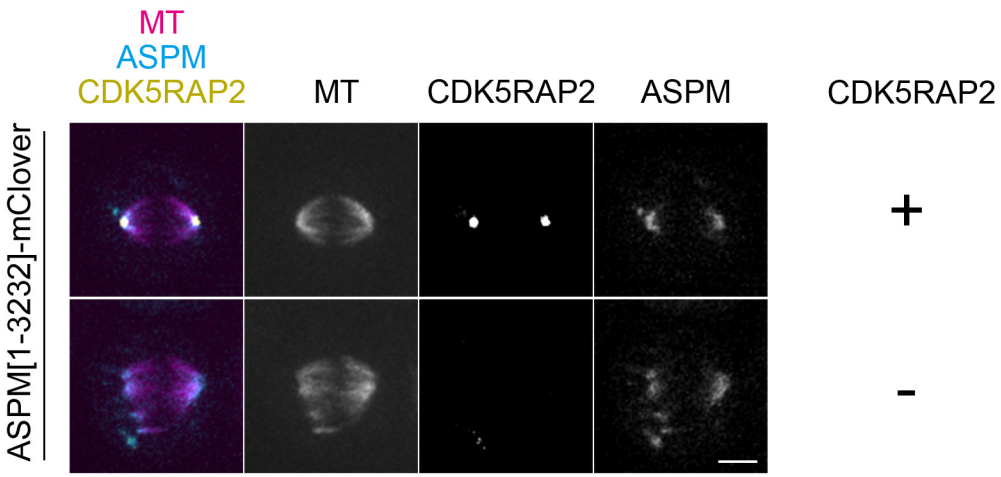


図 3. 小頭症患者で認められる ASPM 部分欠失断片は機能不全である
ASPM 全長を ASPM［1-3,232］-mClover に置き換えた細胞ラインでは、CDK5RAP2 の分解に伴い紡錘体極収束異常が認められた。スケールバーは 5 μm。図は文献［9］より転載。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、名古屋大学大学院理学研究科・細胞内ダイナミクス研究室の伊藤亜実博士、Elsa Tungadi 氏、清光智美博士である。

文　献

1) Baumbach J, Novak ZA, Raff JW, Wainman A. Dissecting the function and assembly of acentriolar microtubule organizing centers in Drosophila cells in vivo. PLoS Genet. 2015;11(5):e1005261. doi: 10.1371/journal.pgen.1005261. PubMed PMID: 26020779; PubMed Central PMCID: PMC4447278.

2) Chavali PL, Chandrasekaran G, Barr AR, Tatrai P, Taylor C, Papachristou EK, et al. A CEP215-HSET complex links centrosomes with spindle poles and drives centrosome clustering in cancer. Nat Commun. 2016;7:11005. doi: 10.1038/ncomms11005. PubMed PMID: 26987684; PubMed Central PMCID: PMCPMC4802056.

3) Bond J, Roberts E, Springell K, Lizarraga SB, Scott S, Higgins J, et al. A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size. Nat Genet. 2005;37(4):353-5. doi: 10.1038/ng1539. PubMed PMID: 15793586.

4) Fong KW, Choi YK, Rattner JB, Qi RZ. CDK5RAP2 is a pericentriolar protein that functions in centrosomal attachment of the gamma-tubulin ring complex. Mol Biol Cell. 2008;19(1):115-25. doi: 10.1091/mbc.E07-04-0371. PubMed PMID: 17959831; PubMed Central PMCID: PMCPMC2174194.

5) Natsume T, Kiyomitsu T, Saga Y, Kanemaki MT. Rapid Protein Depletion in Human Cells by Auxin-Inducible Degron Tagging with Short Homology Donors. Cell Rep. 2016;15(1):210-8. doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.001. PubMed PMID: 27052166.

6) Bond J, Roberts E, Mochida GH, Hampshire DJ, Scott S, Askham JM, et al. ASPM is a major determinant of cerebral cortical size. Nat Genet. 2002;32(2):316-20. Epub 2002/10/02. doi: 10.1038/ng995. PubMed PMID: 12355089.

7) Tan CA, del Gaudio D, Dempsey MA, Arndt K, Botes S, Reeder A, et al. Analysis of ASPM in an ethnically diverse cohort of 400 patient samples: perspectives of the molecular diagnostic laboratory. Clin Genet. 2014;85(4):353-8. doi: 10.1111/cge.12172. PubMed PMID: 23611254.
8) Nicholas AK, Swanson EA, Cox JJ, Karbani G, Malik S, Springell K, et al. The molecular landscape of ASPM mutations in primary microcephaly. J Med Genet. 2009;46(4):249-53. doi: 10.1136/jmg.2008.062380. PubMed PMID: 19028728; PubMed Central PMCID: PMCPMC2658750.
9) Tungadi EA, Ito A, Kiyomitsu T, Goshima G. Human microcephaly ASPM protein is a spindle pole-focusing factor that functions redundantly with CDK5RAP2. J Cell Sci. 2017;130(21):3676-84. doi: 10.1242/jcs.203703. PubMed PMID: 28883092.