142　分子の動態の可視化による中心体複製メカニズムの解明	高尾　大輔

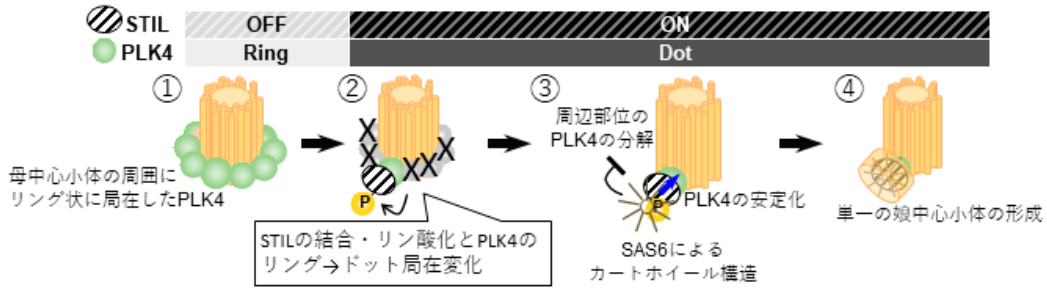
【目的】中心体は、動物細胞において進化的に保存された細胞小器官であり、微小管形成中心として働くなど多くの重要な機能を担っている。例えば細胞分裂においては、二極化した紡錘体の形成に関わっている。また、中心体は細胞周期において一度だけ複製されるよう厳密に制御されている。これにより、正常な細胞分裂が維持されている。過剰複製などの異常は、細胞癌化などの疾病につながると考えられている。

母中心小体から厳密に 1 コピーの娘中心小体が形成されるメカニズムとは何か？細胞、ひいては組織・個体の機能・発生に重要な、中心体複製の分子メカニズムを解明することが本研究の目的である。我々の最近の研究成果により、中心体複製メカニズムの概要が見えてきた (Ohta et al., 2014, Nature Communications)。我々のモデルでは、PLK4、STIL、SAS6 という少なくとも 3 つの分子が主要な役割を果たす。特に、PLK4-STIL 複合体形成と安定化により PLK4 の局在パターンがリングからドットへ変化し、その選ばれた部位だけに厳密に 1 コピーの娘中心小体が形成されるステップが重要であると考えている。

【方法】これまでの多くの研究では、主に分子生物学的手法や生化学的手法が用いられてきた。これらの手法は、分子間の相互作用やリン酸化シグナルの検出という点においては非常に有用である。しかし、PLK4 のリングからドットへの局在パターン変化に代表されるように、分子の時間的・空間的な挙動を知ることが、中心体複製メカニズムの解明には重要である。本研究では、徹底的な顕微鏡観察により主要な分子の動態を明らかにし、中心体複製メカニズムをモデル化する方法を用いた。

【結果】STED 超解像イメージングの応用により、PLK4 リングの詳細な解析を行った。これにより、これまで連続的だと思われていたリングが実はドットが数珠上に連なった離散的なリングであることを明らかにした。この観察データから簡単な数理モデルを構築した。今後さらに詳細な解析とモデルのチューニングが必要である。また、PLK4 など内在性の主要因子を長時間（30 時間）ライブ観察するシステムを構築した。これも非常に大きな成果であり、今後数理モデル化に取り組む。

厳密に 1 コピーの中心小体が複製されるメカニズム：現在のモデル



142. 分子の動態の可視化による中心体複製メカニズムの解明

高尾　大輔

*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，超解像イメージング，分子ダイナミクス

緒　言

中心体は、動物細胞において進化的に保存された細胞小器官であり、微小管形成中心として働くなど多くの重要な機能を担っている。例えば細胞分裂においては、二極化した紡錘体の形成に関わっている。また、中心体は細胞周期において一度だけ複製されるよう厳密に制御されている。これにより、正常な細胞分裂が維持されている。過剰複製などの異常は、細胞癌化などの疾病につながると考えられている。

母中心小体から厳密に 1 コピーの娘中心小体が形成されるメカニズムとは何か？細胞、ひいては組織・個体の機能・発生に重要な、中心体複製の分子メカニズムを解明することが本研究の目的である。我々の最近の研究成果により、中心体複製メカニズムの概要が見えてきた［1］。図 1 に示すように、このモデルでは、PLK4、STIL、SAS6 という少なくとも 3 つの分子が主要な役割を果たす。1）リン酸化酵素である PLK4 は初め母中心小体を取り囲むリング状の配置を示す。2）何らかのきっかけにより PLK4 と STIL の結合および STIL のリン酸化が起こる。このとき、STIL と結合していない PLK4 が消失し、PLK4 の局在パターンがリングからドットへと変化する。3）PLK4-STIL 複合体が形成された部位に、SAS6 によるカートホイールと呼ばれる構造が形成される。4）カートホイール構造が核となり、娘中心小体が形成される。このように、PLK4 の局在パターンがリングからドットへ変化し、その選ばれた部位だけに厳密に 1 コピーの娘中心小体が形成されるというモデルである。そのため、PLK4-STIL 複合体形成と安定化、および周辺部位における複合体形成の阻害（図 1 ②）が特に重要だと考えている。

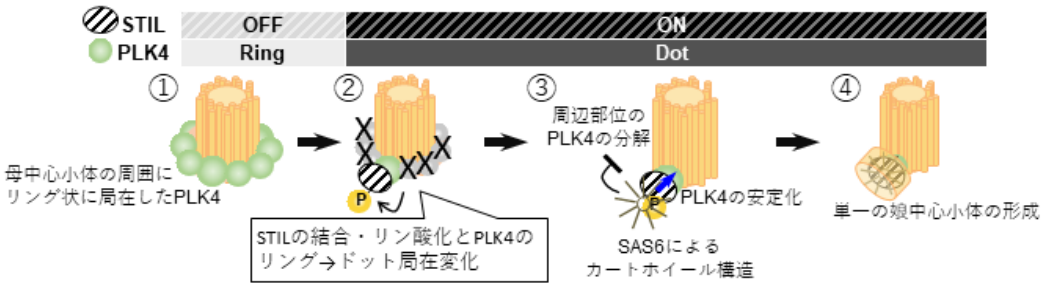


図 1. 厳密に 1 コピーの中心小体が複製されるメカニズム：現在のモデル
母中心小体周辺の超微小空間において関連因子が娘中心小体の複製起点を決定するメカニズムに関する我々のモデル。

これまでの多くの研究では、主に分子生物学的手法や生化学的手法が用いられてきた。これらの手法は、分子間の相互作用やリン酸化シグナルの検出という点においては非常に有用である。しかし、PLK4 のリングからドットへの局在パターン変化に代表されるように、分子の時間的・空間的な挙動を知ることが、中心体複製メカニズムの解明には重要である。本研究では、徹底的な顕微鏡観察により主要な分子の動態を明らかにし、中心体複製メカニズムの理論モデルを構築することを目的とした。直径 200 nm 程度という中心小体周辺の微小空間での分子の動態を可視化することはチャレンジングであるが、中心体複製メカニズムを解明する上で本質的で不可欠な情報が得られると考えた。

*現在の所属：東京大学大学院 薬学系研究科 生理化学教室

本研究では、STED 超解像イメージングの応用により、PLK4リングの詳細な解析を行った。これにより、これまで連続的だと思われていたリングが実はドットが数珠上に連なった離散的なリングであることを明らかにした。この観察データから簡単な数理モデルを構築した。今後さらに詳細な解析とモデルのチューニングが必要ではあるが、PLK4のダイナミクスが中心体複製に関わることを示唆するモデルが構築できた。また、PLK4など内在性の主要因子を長時間（30時間）ライブ観察するシステムを構築した。これも非常に大きな成果であり、今後数理モデル化に取り組む。現在、これらの成果を2報の論文として発表する準備中である。

方　法

1. 超解像イメージングによる主要分子の詳細な局在解析

超解像顕微鏡法である STED 顕微鏡法（解像度約 30 nm）を用いて、主要分子の詳細な局在解析を行った。PLK4 のリングパターンをより詳細に解析することで、中心体複製メカニズム解明の手掛かりが得られないか？このレベルでの分子局在パターン解析を行った。

2. ライブイメージングによる主要分子の時空間的な動態の定量

中心体複製の主要因子である PLK4、STIL、および SAS6 が、どのタイミングで中心小体周囲に集まってくるのかを、内在性タンパク質の蛍光ラベルとライブイメージングの組み合わせにより可視化・定量化するシステムを開発した。このシステムでは、CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集技術を用いて、内在性の標的タンパク質に直接蛍光タンパク質をタグ付けするアプローチを用いた。これにより、過剰発現の影響を受けやすい中心体複製プロセスにおいて、外因的な影響を極力排除しながら標的タンパク質の動態を観察できるシステムとした。ただし、内在性タンパク質は、一過性過剰発現させたタンパク質に比べて分子の数が圧倒的に少ない。そのため、蛍光シグナルが微弱すぎて検出できない、観察中に退職してしまう、などの問題が予想された。実際、予備実験では、通常のコンフォーカル顕微鏡による内在性タンパク質のライブ観察は難しいことが分かった。そこで、観察には、高解像度かつ長時間の観察に適したスピニングディスク型共焦点顕微鏡を用いた。スピニングディスク型共焦点顕微鏡は、弱い励起光を短時間かつ多点で照射する方式のため、退色や細胞への光毒性の点でアドバンテージがありながら、解像度も比較的高いという特徴があり、本研究でのライブイメージングには適していた。

3. イメージングデータの解析と数理モデル化

上記の方法で得られたイメージングデータを現在のモデルに還元することで、数理モデル化を試みた。詳細は次項に記載する。

結　果　お　よ　び　考　察

1. 超解像イメージングによる主要分子の詳細な局在解析

STED 超解像顕微鏡法を応用し、中心体複製プロセスの主要因子である PLK4 の局在解析を行った。従来の顕微鏡法の解像度では連続的なリングに見えていた PLK4 の局在パターンが、実は PLK4 のドットが数珠上に連なった離散的なリングであることを発見した（図 2）。超解像イメージングとイメージプロセッシングにより初めて達成できた、本研究の最も重要な成果の一つである。

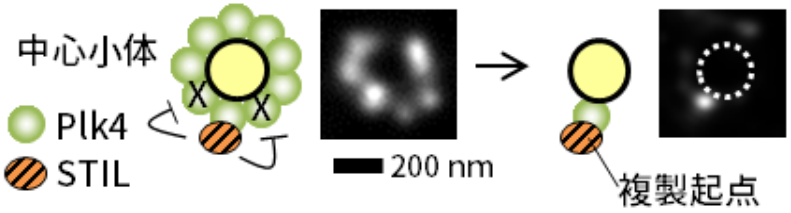


図 2. PLK4 の中心小体周囲の局在パターン

STED 超解像イメージングによる PLK4 の中心小体周辺における局在パターン。リング（左）とドット（右）の 2 パターンについて、模式図と併記してある。これまで考えられていたような連続的なリングではなく、ドットが連なった数珠上のパターンとして観察された。

2. 内在性タンパク質の長時間ライブイメージング

中心体複製プロセスにおける主要因子の局在パターン変化を追跡するため、長時間ライブイメージングを行った。関連因子が母中心小体の周辺に順次集まり、娘中心小体の複製起点を構築していくというのが、我々のモデルである。よって、これら因子がどのようなタイミングで中心小体周辺に集まってくるのかを理解することが重要である。また、中心体複製においてこれら因子の数は厳密に制御されていることから過剰発現による影響を受けやすい。よって、CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集システムにより、内在性の PLK4、STIL、SAS6 に蛍光タンパク質をタグ付けするアプローチを採用し、これに成功した。内在性タンパク質は数が少なく長時間の蛍光イメージングに耐え得るかどうかが懸案であったが、スピニングディスク型共焦点顕微鏡を応用する本研究のアイディアが功を奏し、中心体複製プロセスの長時間ライブイメージングシステムを確立できた。十分な時間分解能を得るためタイムラプス間隔を 10 分とし、細胞周期全体をカバーするため 30 時間にわたって観察を行った。中心体におけるこれら因子の局在を検出するために十分な空間分解能も得られた。内在性タンパク質の微弱なシグナルをこれだけの時間・空間分解能かつ長時間にわたってライブ観察するシステムを確立できた意義は大きい。内在性 PLK4 のダイナミクスを可視化した例を図 3 に示す。

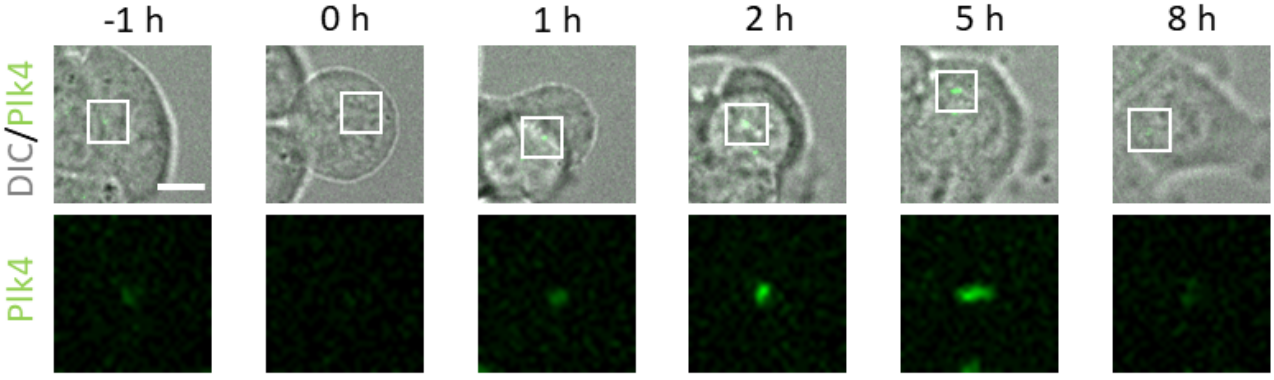


図 3. 内在性 PLK4 の中心体における局在パターン変化

スピニングディスク型共焦点顕微鏡を用いた長時間ライブイメージングによる PLK4 の中心小体周辺における局在パターン。上段：明視野（DIC）像と重ねて細胞全体を表示。下段：中心体周辺（上段の四角）を拡大し PLK4 シグナルのみ表示。時間は細胞分裂期のメタフェーズを 0 として表示。スケールバー = 5 μm。

細胞分裂が終わり細胞が G1 期に入ると PLK4 が中心体に集積してくる様子が分かる。前項の超解像イメージングのデータと併せて考察すると、PLK4 リングが構成されていると推測される。長時間ライブイメージングでは解像度がある程度犠牲になってしまうが、超解像イメージングのデータと相補的に解析することで、今後さらに詳しく中心体複製

プロセスにおける PLK4 ダイナミクスの意義を調べたい。

STIL や SAS6 などの因子も同様に解析し、我々のモデルから予想されるように PLK4 の集積に追随して中心体に集まる様子が確認された。数理モデル化に向け、これらのデータをさらに解析している。

3. 数理モデル化による PLK4 ダイナミクスの理解

上記 1 に記した通り、本研究の超解像イメージングデータから、PLK4 リングは離散的であることが示された。どのようなメカニズムでこの離散的なリングが形成されるのかを、次にシミュレーション解析により調べた。数理解析ソフト Mathematica を用いて独自のプログラムを作成し、予備段階ながらも、PLK4 の離散的リングが作られるようなモデルを作成することに成功した（図 4）。

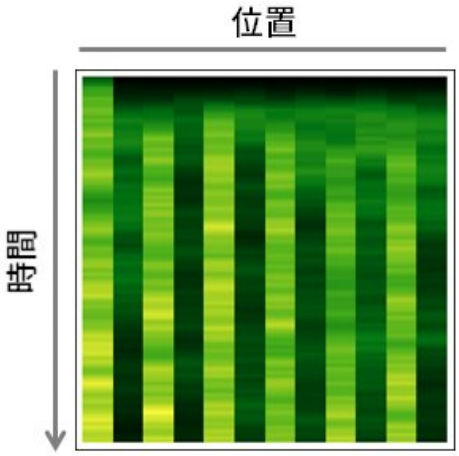


図 4. PLK4 ダイナミクスのシミュレーション解析
PLK4 のダイナミクスから離散的なリングパターンが形成される過程を数理モデルによりシミュレーションした。PLK4 の性質から数珠状のパターンが形成され得ることを示した。

超解像イメージングや長時間ライブイメージングによる本研究のこれまでの成果は、中心体複製の制御メカニズム解明に向けた大きな前進である。さらに、細胞機能における超微細パターン形成の意義を見出し今後の研究の発展性に寄与した点にも大きな意義がある。一方で、中心体複製の完璧な数理モデル化には今後さらに解析を進める必要がある。本研究テーマをさらに発展させ、今後の研究につなげたい。

共同研究者・謝辞

本研究は、国立遺伝学研究所中心体生物学研究部門の北川大樹教授および研究室メンバーとの有意義なディスカッションにより支えられた。ここに謝意を表したい。

文　献

1） Ohta M, Ashikawa T, Nozaki Y, Kozuka-Hata H, Goto H, Inagaki M, Oyama M, Kitagawa D. Direct interaction of Plk4 with STIL ensures formation of a single procentriole per parental centriole. Nat Commun. 2014 Oct 24;5:5267. PMID: 25342035 DOI: 10.1038/ncomms6267.