| 161　中心体複製開始制御機構と抗癌剤開発におけるその応用 | 中村　貴紀 |
|---|---|

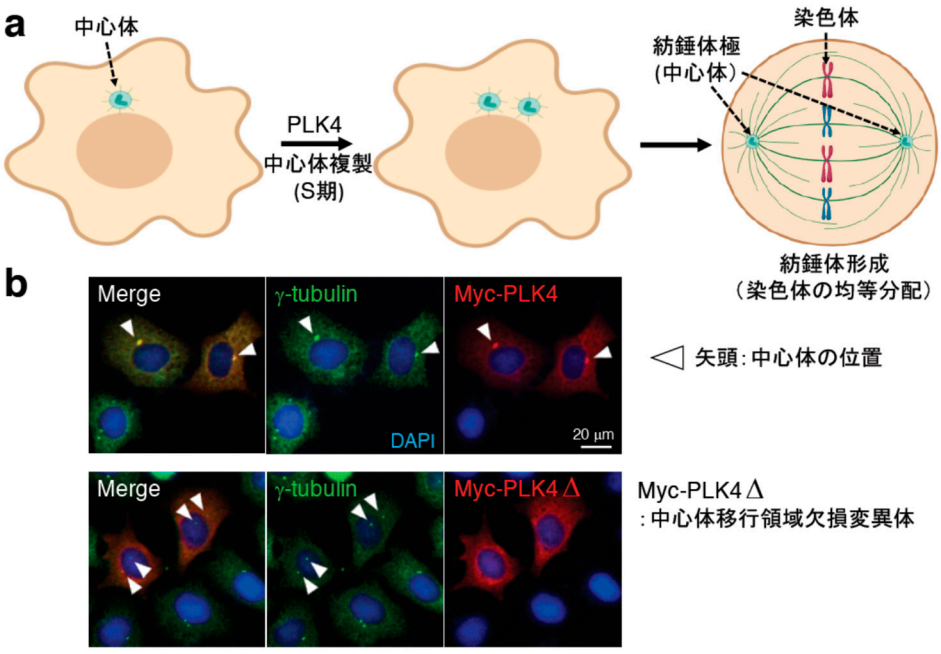
**【目的】**細胞内小器官の 1 つである中心体は、細胞分裂期に双極性の紡錘体極として機能することにより染色体の均等分配に本質的な役割を担う［1〜3］。中心体数の異常は染色体の不均等分配を惹起するため癌の悪性度を高める要因となることが知られている。実際に多くの癌細胞では DNA 損傷などのストレス刺激によって容易に中心体の過剰複製が誘導されており、中心体数の異常が臨床的予後と相関することも報告されている。このため正常細胞では Polo-like kinase 4 を介した中心体複製が細胞周期を通して 1 度だけ起こる様に厳密に制御されており、その結果中心体数は G1 期に 1 つ、S 期に複製されて 2 つになる様に保持されている［4, 5］。仮に正常細胞が様々なストレス環境下に曝された場合でも中心体複製を停止させることにより中心体数は保持されるが、その分子制御機構は不明であった。

近年我々はストレス応答 MAPK と p53 経路が協調的に PLK4 を介した中心体複製を制御することにより、中心体数と染色体安定性を保持することを見出した［6］。また我々は中心体複製の開始において PLK4 の中心体局在とキナーゼ活性が必要であることも明らかにしてきた。更に世界的にも PLK4 を介した中心体複製開始機構に関して盛んに研究が行われているが、PLK4 が中心体輸送される分子機構に関しては未だ不明な点が多く残されている。そこで我々は PLK4 の中心体移行機構の解明を目指した研究と、これを利用した抗癌剤の開発を行った。

**【方法】**PLK4 の中心体輸送に関わる蛋白質を同定することで PLK4 の中心体移行機構を明らかにする。そこで PLK4 分子と特異的に結合する分子を質量分析により網羅的に同定する。得られた PLK4 結合分子を siRNA によって遺伝子欠損させた場合に PLK4 の中心体輸送が阻害されるか検証を行って、PLK4 の中心体移行に関わる分子を特定する。更にこれら中心体輸送制御分子と PLK4 との結合様式等を調べることにより、PLK4 の中心体輸送に関わる分子制御機構を明らかにする。

**【結果】**今回我々は PLK4 の系統的欠損変異体を作製してその中心体移行性を検証することにより、PLK4 の中心体移行領域を特定した。また我々はこの PLK4 分子内の中心体移行領域に特異的に結合する分子を質量分析によって探索した結果、複数の候補分子を同定することに成功した。更にこれらの分子を介した PLK4 の中心体移行機構の解明にも成功した。また中心体を標的とする新たな抗癌剤のシード化合物を得ることにも成功した。

染色体の均等分配を担う中心体は、PLK4 を介した複製により中心体数が厳密に制御される



# 161. 中心体複製開始制御機構と抗癌剤開発におけるその応用

中村　貴紀

東京大学 医科学研究所 基礎医科学部門 分子シグナル制御分野

Key words：中心体，中心体複製，染色体安定性，PLK4，中心体輸送

## 緒　言

細胞内小器官の１つである中心体は、細胞分裂期に双極性の紡錘体極として機能することにより染色体の均等分配に本質的役割を担う［1〜3］。中心体数の異常は染色体の不均等分配を惹起するため癌の悪性度を高める要因となることが知られている。実際に多くの癌細胞ではDNA損傷などのストレス刺激によって容易に中心体の過剰複製が誘導されており、中心体数の異常が臨床的予後と相関することも報告されている。このため正常細胞ではPolo-like kinase 4を介した中心体複製が細胞周期を通して１度だけ起こる様に厳密に制御されており、その結果中心体数はG1期に１つ、S期に複製されて２つになる様に保持されている［4，5］。仮に正常細胞が様々なストレス環境下に曝された場合でも中心体複製を停止させることにより中心体数は保持されるが、その分子制御機構は不明であった。

近年我々はストレス応答MAPKとp53経路が協調的にPLK4を介した中心体複製を制御することにより、中心体数と染色体安定性を保持することを見出した［6］。更に我々は中心体複製の開始においてPLK4の中心体局在とキナーゼ活性が必要であることも明らかにしてきた。また世界的にもPLK4を介した中心体複製開始機構に関して盛んに研究が行われているが、PLK4が中心体輸送される分子機構に関しては未だ不明な点が多く残されている。そこで我々はPLK4の中心体移行機構の解明を目指した。

また中心体数の異常増加は染色体の不安定性を高める要因となるため、中心体数の異常は癌の悪性度と正の相関関係にあることが知られている。そこで本研究では異常増加した中心体を標的とする抗癌剤の開発も目指した。

## 方　法

### 1.　細胞培養

HEK293A細胞およびU2OS細胞は、DMEM（1.0 g/L D-（＋）-Glucose）に10%牛血清を加えた培養液で細胞培養を行った。

### 2. 免疫染色

カバーガラス上に播種した細胞にプラスミドDNAを遺伝子導入試薬XtremeGene9によって一過的に遺伝子発現させた後に、細胞を氷冷メタノールで固定した。細胞をPBSで洗浄して、更に0.1% Triton X-100入りPBSで５分間処理して細胞に膜透過処理を加えた後に、1% BSA入りPBSでブロッキング処理を加えた。次に１次抗体処理３時間、２次抗体処理１時間行った後に、細胞が播種されたカバーガラスを封入剤FluorSave reagent （Calbiochem）を用いてスライドガラスに封入した。調製したサンプルスライドを蛍光顕微鏡TiE （Nikon）を用いて観察した。

１次抗体として、Myc-tagマウスモノクローナル抗体（9B11、Cell Signaling Technology （CST）、IgG2a）を1:8,000希釈、γ-tubulinマウスモノクローナル抗体（GTU-88, Sigma, IgG1）を１：5,000希釈で使用した。また２次抗体として、Alexa488 マウスIgG1抗体（Invitrogen）、Alexa568マウスIgG2a抗体（Invitrogen）をそれぞれ１：1,000希釈で使用した。核は4',6-diamidino-2-phenylindole（DAPI）で染色した。

### 3. 質量分析

1×Flag-中心体移行領域を安定発現させた HEK293A 細胞から細胞可溶液を作製した。試験管内の細胞可溶液に Flag 抗体を加えて 5 時間混合した後に Protein G ビーズを加えて 1 時間更に混合反応させた。次に Flag ペプチドを試験管に加えて 1×Flag-中心体移行領域および同領域に特異的に結合する分子を液層に抽出した。抽出された 1xFlag-中心体移行領域および同領域に特異的に結合する分子に Trypsin 処理を加えて蛋白質をペプチド消化した。断片化されたペプチドを Nano-LC-Q-MS／MS によって検出した全データを Mascot 解析にかけて PLK4 の中心体移行領域に結合した分子を特定した。

### 4. siRNA を用いた gene silencing

各標的分子に対する siRNA を設計した。siRNA を Lipofectamine RNAiMAX （Invitrogen）を用いて細胞に導入して 72 時間後に実験に使用した。

## 結果および考察

### 1. PLK4 の中心体移行メカニズムの解明

先ず PLK4 の中心体移行に関わる領域を特定するために、PLK4 の系統的欠損変異体を pcDNA4Myc の下流に導入したコンストラクトを作製した。次に各変異体を U2OS 細胞に遺伝子導入した後に細胞を固定して Myc 抗体と中心体マーカー γ-tubulin 抗体を用いた蛍光免疫染色によって各変異体の中心体移行性を検証した。その結果 PLK4 の中心体移行領域を特定した。

次に PLK4 の中心体移行領域に特異的に結合する分子を同定することを試みた。先ず中心体移行領域を安定発現させた細胞株を樹立した。この中心体移行領域の安定発現細胞株から細胞可溶液を作製した後、免疫沈降によって中心体移行領域および同領域に特異的に結合した分子を精製した。次に中心体移行領域に結合した分子を試験管内でトリプシン消化してペプチドに断面化した後に、ペプチドをイオン化して質量分析機によって検出した。得られた質量分析データを Mascot 解析にかけて、中心体移行領域に特異的に結合した分子を同定した。

この中心体移行領域の結合分子を特異的に認識する siRNA を U2OS 細胞に導入して PLK4 の中心体移行量の変化を蛍光免疫染色データを基にした画像解析によって定量したところ、PLK4 の中心体輸送が大きく阻害されるものを見出すことができた。更にこの新規中心体移行領域結合分子を介して制御される PLK4 の中心体輸送機構も詳細に解明することができた。

### 2. 中心体を標的とした抗癌剤開発

通常、細胞に中心体複製ミスなどにより異常数の中心体が存在すると多極性紡錘体形成に伴う細胞分裂が起こり娘細胞に必要な数の染色体が分配されないため、多くの娘細胞で細胞死を招くことが知られている［7］。一方多くの中心体数の異常を持つ癌細胞では異常増加した中心体をひとまとめにして見かけ上 2 極の紡錘体を形成するため、次世代の娘細胞は生存する［7，8］。またこの時、染色体の輸送遅延が頻発するため、染色体の異数性、欠失、転座などの遺伝子変異が起こりやすくなり癌の悪性度が高まる。

このように中心体数の異常と癌の悪性度には正の相関関係が見られるため、中心体を標的とした新たな抗癌剤が癌治療に有用であると考えられた。現在創薬スクリーニングを行っておりその内容に関しては守秘義務があるため詳細は割愛させて頂くが、これまでに新たな抗癌剤の候補分子を幾つか同定することに成功した。今後も得られたシード化合物を基に側鎖を改変するなどして副作用（毒性）の低く制癌作用の高い新規抗癌剤を見出す予定である。

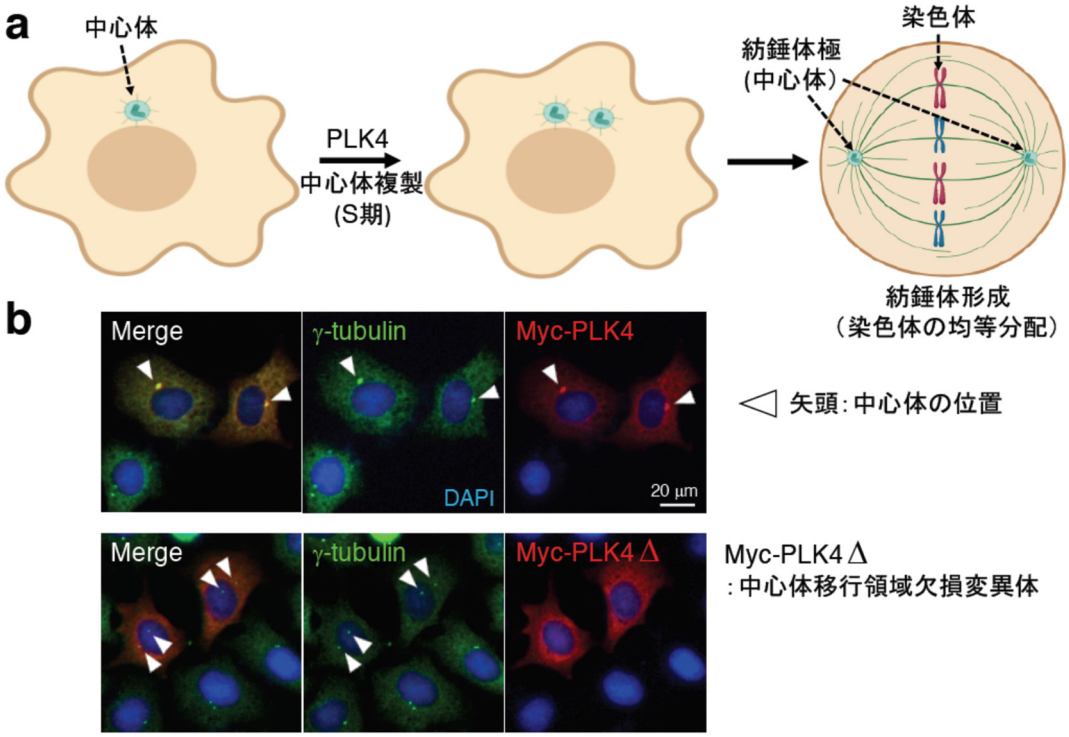



図 1. 染色体の均等分配を担う中心体は、PLK4 を介した複製により中心体数が厳密に制御される

a) 中心体は、S 期に PLK4 を介した複製により 2 つになる。倍加した中心体は細胞分裂期において双極性の紡錘体極として機能することにより染色体の均等分配を担う。

b) PLK4 の中心体移行領域を特定。Myc-PLK4 を U2OS 細胞に一過的に発現させた後、細胞を固定してから Myc 抗体（赤）、中心体マーカー γ-tubulin 抗体（緑）で免疫染色を行った。また核は DAPI（青）で染色した。スケールバーは 20 μm で、矢頭は中心体の位置を示す。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学医科学研究所分子シグナル制御分野の武川 睦寛教授と西住 紀子博士である。また本研究は、上原記念生命科学財団研究奨励のサポートの下に行った研究である。

## 文　献

1) Nigg EA, Stearns T. The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. Nat Cell Biol. 2011 Oct 3;13(10):1154–1160. PMCID: PMC3947860

2) Fu J, Hagan IM, Glover DM. The centrosome and its duplication cycle. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2015 Feb 2;7(2):a015800. PMID: 25646378

3) Nigg EA, Holland AJ. Once and only once: mechanisms of centriole duplication and their deregulation in disease. Nat Rev Mol Cell Biol. 2018 May;19(5):297–312. PMCID: PMC5969912

4) Habedanck R, Stierhof Y-D, Wilkinson CJ, Nigg EA. The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication. Nat Cell Biol. 2005 Nov;7(11):1140–1146. PMID: 16244668

5) Bettencourt-Dias M, Rodrigues-Martins A, Carpenter L, Riparbelli M, Lehmann L, Gatt MK, Carmo N, Balloux F, Callaini G, Glover DM. SAK/PLK4 is required for centriole duplication and flagella development. Curr Biol. 2005 Dec 20;15(24):2199–2207. PMID: 16326102

6) Nakamura T, Saito H, Takekawa M. SAPK pathways and p53 cooperatively regulate PLK4 activity and centrosome integrity under stress. Nature Communications. 2013;4:1775. PMID: 23653187
7) Ganem NJ, Godinho SA, Pellman D. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. Nature. 2009 Jul 9;460(7252):278–282. PMCID: PMC2743290
8) Quintyne NJ, Reing JE, Hoffelder DR, Gollin SM, Saunders WS. Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering. Science. 2005 Jan 7;307(5706):127–129. PMID: 15637283