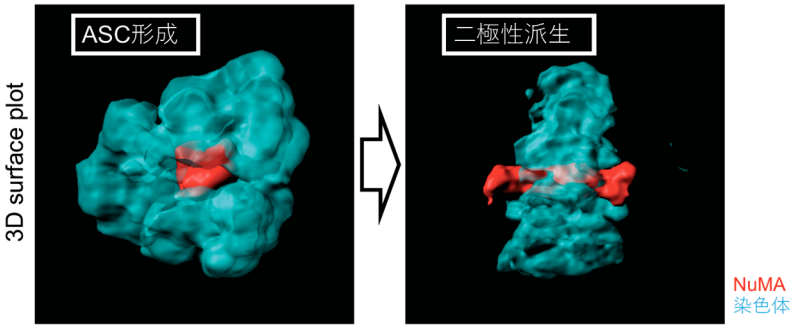
94　微小管形成中心の分子基盤の統合的解析と抗がん剤創薬	北川　大樹

【目的】細胞は分裂時に複製した染色体を正確に娘細胞に分配する必要があり、そのためには二極性の紡錘体形成が必須になる。哺乳類の体細胞分裂では、二つの中心体が極として機能することで二極性の紡錘体が形成される。その一方で、中心体を持たない卵母細胞の減数分裂では非中心体性のメカニズムが働くことで二極紡錘体形成が為される。以上のように中心体依存的・非依存的な両経路が紡錘体形成に重要であることは知られていたが、特にヒトの体細胞分裂において、どのような非中心体性メカニズムが紡錘体の二極性派生に関わるかは明らかになっていなかった。そこで、本研究では、中心体に非依存的な紡錘体形成機構を明らかにし、中心体性と非中心体性両方の微小管形成中心の構築機構を統合的に解析することで、新規抗がん作用点の同定を行うことを目的とした。

【方法】本研究では中心体の倍化に重要なキナーゼである PLK4 を阻害することで、ヒト培養細胞において非中心体性の紡錘体を誘導し、二極紡錘体形成プロセスを解析した。中心小体非依存的な微小管形成中心の構成因子を siRNA を用いたスクリーニングにより同定し、介在する複合体形成や、微小管重合活性を有する構造体としての機能解析を行った。

【結果】中心体除去時には染色体付近に紡錘体極因子 NuMA が重合して微小管を放射上に配向し、その後、微小管の逆並行スライドを担う分裂期キネシン Eg5 の働きにより紡錘体の二極性が派生し、染色体の整列と分配が起こることが明らかとなった。さらに NuMA の除去は、中心体を持たない細胞のみならず中心体を持つ細胞においても紡錘体の二極性派生に寄与することを見出した。以上より、ヒトの体細胞は NuMA に依存した非中心体性システムと中心体に依存したシステムの協調により紡錘体の二極性を派生させることが示唆された。

ヒトがん細胞における非中心体性紡錘体形成のモデル



94. 微小管形成中心の分子基盤の統合的解析と抗がん剤創薬

北川　大樹

東京大学 大学院薬学系研究科 生理化学教室

Key words：中心体，中心小体，紡錘体，微小管，抗がん剤開発

緒　言

多くの真核生物においては、進化的に保存された細胞小器官である中心小体が、微小管形成中心として主要な役割を果たしている。しかし、驚くべきことに、ヒトがん細胞から中心小体を物理的に除去しても、分裂期紡錘体が形成され細胞分裂が進行することが、最近の知見により明らかにされている。すなわち、中心小体に依存しない微小管形成中心の存在が示唆されている。現在までに、中心小体に依存しない紡錘体形成機構は、中心小体を持たない植物細胞や卵子における解析に留まっており、ヒトがん細胞における詳細は明らかにされていない。我々はこれまでの解析から、中心小体消失時のがん細胞において、通常は中心小体を取り囲むことで中心体を構成する中心体マトリックスが、中心小体非依存的に集合することで微小管形成中心として機能することを見出している［1］。そこで、この分子基盤の詳細を明らかにし、中心小体依存的・非依存的な微小管形成中心の構築機構、双方の共通点と差異に関して検討を行った。両経路を同時に阻害することで、分裂期紡錘体の形成が完全に抑制されることが推測される。微小管を直接標的とした既存の抗がん剤と比較して、細胞分裂に特異性が高く、副作用の少ない抗がん剤の創生を将来的には目指している。

方　法

1. 中心体に依存しない微小管形成中心の構築機構の解明

中心小体に必須の因子である Plk4［2～4］に対する特異的阻害剤を用いて、細胞内に中心小体非依存的な微小管形成中心を誘導し、分裂期紡錘体を形成させる。その後、中心体マトリックスに局在する因子群の網羅的ノックダウンを siRNA または、CRISPR-Cas9 sgRNA ライブラリーを用いて行い、中心小体非依存的紡錘体の形成に必須な因子を探索する。それら必須因子の分裂期における動態、紡錘体の極への集積パターンをタイムラプス顕微鏡観察により、また集積後の微細構造を超解像度顕微鏡により解析する。

2. 中心体依存的・非依存的微小管形成中心、両方の経路に共通する重要因子の同定と分子機構の解明

通常は、中心小体の周囲に中心体マトリックスがリクルートされることで、微小管重合活性を有する機能的な中心体が形成される。中心体非依存的な紡錘体形成の場合は、中心体マトリックス構成因子の一部が紡錘体極に集合することで紡錘体を構築することが、これまでの我々の解析から見出されている。そこで、中心体依存的・非依存的、双方の微小管形成中心の構築過程に共通する因子群、その分子機構に関して解析を行う。具体的には、上記 1 で見出した中心体非依存的な経路に必要な因子が、中心小体に依存する通常の経路にも必要であるかどうかの検討を行う。その後、同定した因子の分子機能や分子間結合に重要なドメインに関して、免疫沈降法や精製たんぱく質を用いた生化学解析、分子変異体を用いた細胞生物学的解析等により統合的に検討を加え、微小管形成中心に必須の分子機構、構造的基盤を理解し、薬剤スクリーニングの対象とする因子、ドメイン構造の絞り込みを行う。

結果および考察

哺乳類の体細胞では、微小管形成中心として働く中心体の働きにより効率よく二極性を有した紡錘体が形成される。一方で、卵母細胞における減数分裂時には中心体に依存しない紡錘体形成機構により染色体の分配が為される。これまで、マウスの卵母細胞やアフリカツメガエルの卵抽出物、線虫やショウジョウバエの卵母細胞を用いた研究が行われてきた。一方で、その使用の難しさからヒト卵母細胞の解析はあまり進んでいない。さらに興味深いことに中心体を除去してもヒトがん細胞は二極化紡錘体を形成して分裂を続けることが示されている。このことは卵母細胞と体細胞において、共通する非中心体性紡錘体形成メカニズムの存在を示唆している。しかしながら、特にヒトがん細胞における非中心体性紡錘体の二極性成立機構は明らかになっておらず、その理解は紡錘体の基礎マシナリーの理解のみならず、染色体分配エラーにより引き起こされる疾患の理解にも繋がると考えられる。本研究においては、ヒトの細胞における、中心体に依存しない紡錘体二極性派生メカニズムの理解を目指して詳細な解析を行った。

1. PLK4 キナーゼ阻害剤による中心体の人為的除去、非中心体性紡錘体の形成誘導、および ASC の発見

中心体を除去するために、中心体の倍化を制御する PLK4 キナーゼの特異的な阻害剤 centrinone を複数のヒトがん細胞（A549、DU145、GI-1、HCT116、HeLa、MCF7、PANC1、SKOV3、U2OS）に処理して、数日間培養した。様々な紡錘体や中心体の構成因子を観察した結果、中心体を除去したヒトがん細胞では、分裂期の初期に、紡錘体極の因子である NuMA が凝集体（Acentrosomal spindle core（ASC）と命名）を形成することを見出した（図 1）。

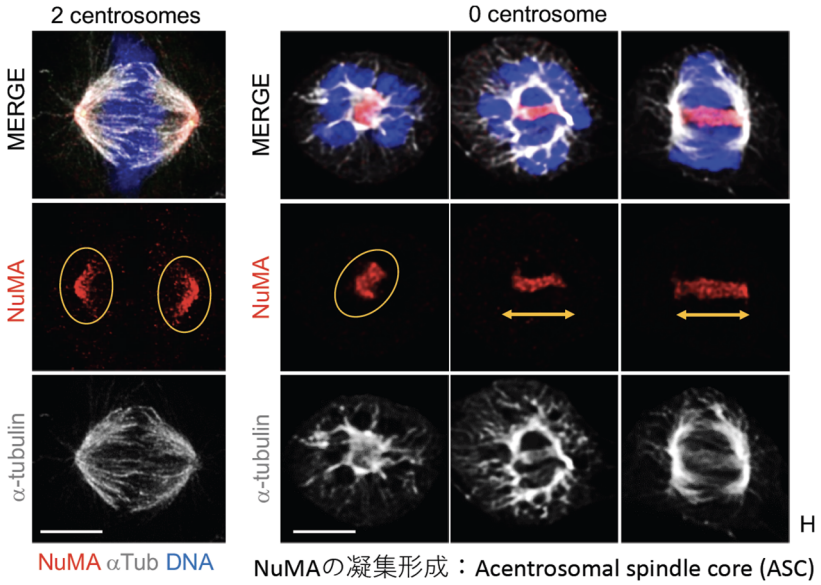


図 1. ヒトがん細胞における中心体非依存的な紡錘体形成機構

HeLa 細胞における紡錘体形成。中心体が二つの場合と中心体を Plk4 阻害剤により除去した場合。

免疫染色は NuMA、微小管、DNA それぞれを可視化できるように行った（スケールバー：5μm）。

2. ASC 形成における NuMA の機能解析に関して

FRAP 法により、NuMA の性質を解析したところ、中心体を含む紡錘体極上の NuMA と比較して、ASC 内の NuMA はより安定であることが明らかになった。続いて ASC の形成機構や紡錘体二極性派生への ASC の寄与を調べるため、Auxin-Inducible Degron（AID）法により、NuMA を効率的に分解し紡錘体形態を観察した（図 2）。NuMA を分解した非中心体性細胞においては単極の紡錘体が形成されたことから、ASC は非中心体性紡錘体の二極性成立において重要であることが示唆された。

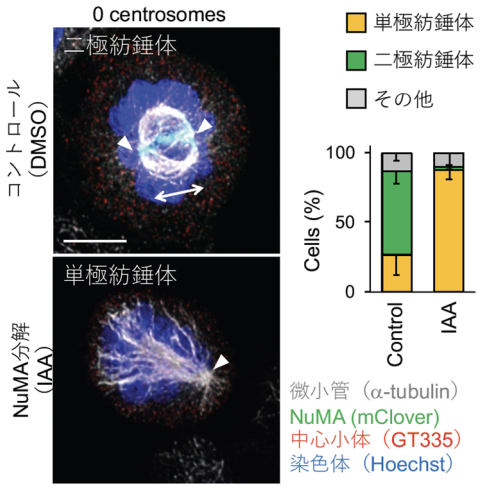


図 2. NuMA/ASC による紡錘体二極性派生

HeLa 細胞における紡錘体形成。中心体を Plk4 阻害剤により除去した場合。

AID システムにより NuMA を分解した場合（下）、コントロール（上）。

免疫染色は NuMA、微小管、中心体、DNA それぞれを可視化できるように行った。

（スケールバー：5μm）。

3. NuMA の自己集合と ASC 形成機構に関して

NuMA が自己集合することが、細胞膜近傍における微小管制御において重要であることが報告されている。そこで、内在の NuMA の自己集合活性を低下させた変異型に置き換えて、ASC 形成を観察した。その結果、NuMA の自己集合活性が ASC の形成に重要であることが示唆された。

4. Eg5 による ASC 二極性派生の促進と二極化紡錘体形成

ASC の形成後に、Eg5 モーター活性により ASC 内から二極性が派生し、安定なキネトコアー微小管結合により、二極の分離が促進されることを見出した。以上の結果から、細胞は NuMA の自己集合活性を介して形成される ASC により紡錘体の二極性を派生させることで、中心体に依存せずに染色体を分配することが可能であることが示唆された。

これまでに、旺盛ながん細胞の増殖を抑制するための有効な化学療法としてtubulinの阻害薬が用いられてきた。しかしながらこれらの薬剤は神経突起内の微小管に影響を及ぼすことで末梢神経痛等の副作用を示すことが問題として知られていた。一方で、本研究は既存の微小管ネットワークに全く作用しない、分裂期の微小管形成中心を阻害するという、これまでにない抗がん剤標的を設定している。最新の細胞生物学、細胞遺伝学などをベースにした基礎生物学な手法を駆使し、効果的な抗がん作用点を浮き彫りにしながら、独創的な視点に立脚した創薬研究を目指した。中心体はこれまで分裂期紡錘体形成に機能することから、分裂期に特異的に作用する抗がん剤のターゲットとして注目されてきた。しかし、最近の PLK4 キナーゼ阻害剤の開発、及びそのヒトがん細胞における抗がん活性の解析から、多くのヒトがん細胞においては中心体を除去するだけでは細胞分裂を抑制できないことが明らかにされた。本研究では、それと相補的に働く中心体非依存的な紡錘体の形成機構の一旦を明らかにした。今後は、中心体と非中心体経路、両方を阻害する作用点をより明確にしていくことで、有効な抗がん活性を持つ分裂期特異的な阻害剤の設計が可能になると期待している。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京大学大学院薬学系研究科生理化学研究室の知念拓実助教である。

文　献

1) Chinen T, Yamamoto S, Takeda Y, Watanabe K, Kuroki K, Hashimoto K, Takao D, Kitagawa D. NuMA assemblies organize microtubule asters to establish spindle bipolarity in acentrosomal human cells. EMBO J. 2020 Jan 15;39(2):e102378. doi: 10.15252/embj.2019102378. Epub 2019 Nov 29. PMID: 31782546

2) Takao D, Yamamoto S, Kitagawa D. A theory of centriole duplication based on self-organized spatial pattern formation. J Cell Biol. 2019 Nov 4;218(11):3537-3547. doi: 10.1083/jcb.201904156. Epub 2019 Aug 26. PMID: 31451615

3) Yamamoto S, Kitagawa D. Self-organization of Plk4 regulates symmetry breaking in centriole duplication. Nat Commun. 2019 Apr 18;10(1):1810. doi: 10.1038/s41467-019-09847-x. PMID: 31000710

4) Watanabe K, Takao D, Ito KK, Takahashi M, Kitagawa D. The Cep57-pericentrin module organizes PCM expansion and centriole engagement. Nat Commun. 2019 Feb 25;10(1):931. doi: 10.1038/s41467-019-08862-2. PMID: 30804344