

中心小体複製の分子機構における普遍的原理の解明

国立遺伝学研究所 新分野創造センター 中心体生物学研究室
北川 大樹

1. はじめに

中心体は中心小体及びそれを取り囲むPCM (pericentriolar material)から構成されており、中心小体の複製が中心体全体の複製を規定している。中心小体の複製は基底部分にあたるカートホイール構造の形成から開始され、その後、伸長及び成熟過程を経て完了する。近年、多種のモデル系におけるゲノムワイドRNAiスクリーニング、変異体を用いた遺伝学的解析、生化学的に単離された中心小体のプロテオーム解析などにより、国内外において中心小体を構成する因子群の同定が精力的に進められている。この分野における現在の傾向として、これら同定された因子群の段階的な中心小体構築過程における機能解析に主眼が置かれている事が挙げられる。しかし、一度複製した中心小体が一細胞周期において再び複製しないように制御する分子メカニズム、すなわち中心小体複製のライセンス化に介在する分子機構の研究は驚くほど進んでいない。癌の初期過程に生じる中心小体の過剰複製は染色体の不安定化を誘発し、癌の悪性化に繋がる事が推測されており、実際に多くのヒト癌細胞で中心小体の過剰複製が観察されている。その原因の一つとして中心小体複製のライセンス化制御の破綻による可能性が指摘されている。最近、中心小体の初期過程が複製のライセンス化を理解する上で重要なステップであることを裏付ける知見が報告されている。カートホイール構造構成因子であるHsSAS-6の発現量は細胞周期を通じて、その結合因子であるAPC-Cdh1及びSCF-FBXW5複合体を介したユビキチン-プロテアソーム系によるタンパク質分解システムにより制御されており、この分解機構を抑制すると中心小体過剰複製が誘発される。また、我々は中心小体複製の初期過程に必須の因子STILの新規結合因子としてRBM14(RNA binding motif protein 14)を同定し、その発現抑制により中心小体様構造体の過剰複製が誘発されることを見出している(未発表データ)。これらの知見はカートホイール構造構成因子の発現量または機能を制御する結合因子が複製ライセンス化に重要である事を示唆している。本研究では、中心小体複製ライセンス化制御、特に当研究室で同定された新規複製制御因子であるRBM14の機能解析を中心に、その分子機構の解明を目的とした。

2. 方法と結果

1)中心小体複製制御因子のスクリーニング及びRBM14の同定

中心小体前駆体の形成過程に関与する因子を同定する目的で、中心小体複製開始に必須である因子HsSAS-6とSTILの結合タンパク質の同定を試みた。方法としては、ヒト培養細胞であるHeLa及び293T細胞から抽出した可溶性画分を出発材料とし、HsSAS-6またはSTIL抗体を用いて各々のタンパク質を含む複合体を免疫沈降法により精製後、マスマスペクトロメトリー解析を行った。その結果、HsSAS-6またはSTILと細胞内で特異的に複合体を形成する可能性があるタンパク質を~50程度検出した。これらの結合タンパク質候補群の機能解析を行う目的で、ヒト培養細胞において

各因子に対する RNAi を用いた機能ゲノミクス解析を行った。その結果、STIL 免疫沈降画分中に検出された RBM14 を RNAi により発現抑制した細胞において、中心小体マーカーである centrin の過剰形成が観察された (図 1)。

2) RBM14 発現抑制により誘導される中心小体様構造体の解析

RBM14 の発現抑制により、centrin foci の過剰形成が観察されたが、この構造体がどの程度内在の中心小体に類似するのかを検討する目的で、各種中心小体マーカーを用いたヒト培養細胞における免疫染色、及び電子顕微鏡観察による構造学的解析を行った。これらの構造体は中心小体の middle-distal end を認識するマーカーでは染色されたが、中心小体構築の初期過程において形成され、基底部にあたるカートホイール構造のマーカーではほとんど染色されなかった。これはまったく予想外の結果であり、これまでは中心小体構築にはカートホイール構造が必須であるとされていた定説を覆すものである。さらに、電子顕微鏡によりこの中心小体様構造体を観察したところ、

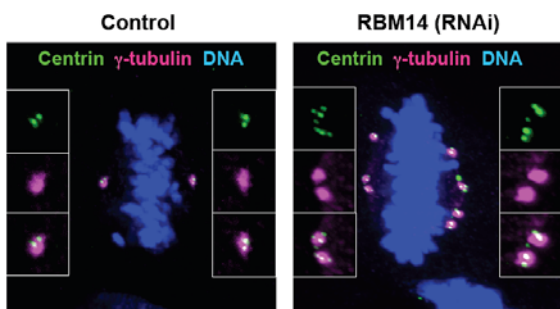


Fig. 1 RBM14発現抑制により中心小体様構造体が誘導される Centrin (中心小体マーカー)、 γ -tubulin (中心小体マーカー) ヒト培養細胞U2OS

のほとんどが中心小体 3 連微小管を含む無定形の構造体であることを見出した。構造的には中心小体前駆体とも考えられるが、中心小体を取り囲む中心小体周辺物質 (PCM) を集積させており (図 1)、またその周囲には微小管が重合している様子も観察されたことから、微小管形成中心としての機能はある程度保持している事が推測された。

3) RBM14 は中心小体複製に必須の因子 STIL/CPAP 複合体形成を阻害する

次に、RBM14 発現抑制により中心小体様構造体が過剰に形成される分子メカニズムを検討した。RBM14 は STIL 抗体による免疫沈降画分中に存在する因子としてマスマスペクトロメトリーにより同定されたが、ヒト培養細胞 293T において内在の RBM14 と STIL が共沈することを確認した。さらに、酵母ツーハイブリッド法及び精製リコンビナントタンパク質を用いた GST-pull-down assay により、RBM14 の C 末端領域と STIL の N 末端領域が直接結合することを見出した。STIL の N 末端領域は中心小体複製に必須の因子である CPAP と結合することで複合体を形成することから、RBM14 が STIL の N 末端領域での結合を介して STIL/CPAP 複合体形成を阻害している可能性に関して検討を行った。GFP-CPAP を doxycycline により誘導可能なヒト U2OS 細胞において RBM14 の C 末端領域、または全長を過剰発現させると STIL/GFP-CPAP 複合体形成は顕著に阻害された。次に、RBM14 発現抑制により形成された STIL/CPAP 複合体が中心小体様構造体の形成に必要なかどうかを検討する目的で、RBM14-control、RBM14-STIL、RBM14-CPAP の組み合わせによる double RNAi 実験を行った。その結果、RBM14 発現抑制により誘導される中心小体様構造体は STIL もしくは CPAP RNAi を同時に行うことで顕著に抑制された。この結果は、中心小体様構造体の形成には STIL/CPAP 複合体の形成が必要であることを示している。

4) de novo 合成経路による中心小体様構造体形成

これまでは、STIL の過剰発現により多数の娘中心小体が母中心小体近傍にロゼッタ状に同時に形成されると報告されていたが、RBM14 を発現抑制した際に出現する中心小体様構造体はこのような様相を呈していなかった。そこで、中心小体様構造体がどのように形成されるのか、そのダイナミクスの詳細を観察することを目的として GFP-centrin を発現している HeLa 細胞を RBM14 RNAi 処理後

に、長時間蛍光ライブイメージングを行った。その結果、驚くべきことに GFP-centrin で標識される中心小体様構造体は細胞質中において **de novo** 合成により形成されることを見出した。実際、RBM14 の発現を RNAi により抑制した細胞においては、細かい GFP-centrin foci が細胞質中にて融合することで凝集し、既存の中心小体に局在する GFP-centrin foci と同程度の大きさに成長することが観察された。これまで、新規の中心小体は既存の中心小体の近傍で構築されると考えられていたが、今回のケースにおいては既存の中心小体から離れた細胞質中にて **de novo** で中心小体様構造体が合成されるという新たな現象を見出した。また、mCherry-Histone を用いた核の形態観察から細胞周期上の大まかな時期をモニターすることにより、中心小体様構造体は G1 後期から S 期にかけてその形成が促進されることを明らかにした。

3. 考察 まとめ

本研究により、新しい中心小体構築のメカニズムが提示された。すなわち、これまでは新たに形成される娘中心小体は必ず母中心小体の近傍で生じると考えられていたが、本研究では既存の中心小体存在下でも **de novo** 合成経路を介して新たな中心小体様構造体が細胞質中に形成されることを示した。これまでの知見では、既存の中心小体を物理的に除去した場合のみ、中心小体 **de novo** 合成が開始されるとされており、通常は既存の中心小体は何らかの形で **de novo** 合成を抑制していると考えられていた。本研究の結果は、既存の中心小体が存在していても **de novo** 合成が起こる事を示しており、また、これらの過剰な中心小体様構造体がゲノムの不安定化を誘発する可能性を提示している。実際、RBM14 は腎臓がんの原因遺伝子の一つとして報告されていることから、本研究で解析したような中心小体様構造体が染色体不安定化を誘導し、細胞がん化の引き金になる可能性が考えられる。本研究の結果により、中心小体 **de novo** 合成経路の抑制機構を含む、中心小体複製ライセンス化制御に関する分子基盤の基礎的な情報が得られた。近年、中心小体の過剰複製と細胞がん化の関与が増々指摘されるようになってきており、中心小体複製の素過程における知見は細胞がん化メカニズムの解明にも寄与することが期待される。

4. 発表論文

Gen Shiratsuchi, Katsuyoshi Takaoka, Tomoko Ashikawa, Hiroshi Hamada and Daiju Kitagawa

“RBM14 prevents de novo assembly of centriolar proteins and maintains genome integrity”

(submitted)

5. 参考文献

1. Gönczy, P. (2012). Towards a molecular architecture of centriole assembly. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 425-435.
2. Nigg, E.A., and Raff, J.W. (2009). Centrioles, centrosomes, and cilia in health and disease. *Cell* 139, 663-678.
3. Kitagawa, D., Vakonakis, I., Olieric, N., Hilbert, M., Keller, D., Olieric, V., Bortfeld, M., Erat, M.C., Flückiger, I., Gönczy, P., *et al.* (2011). Structural basis of the 9-fold symmetry of centrioles. *Cell* 144, 364-375.