

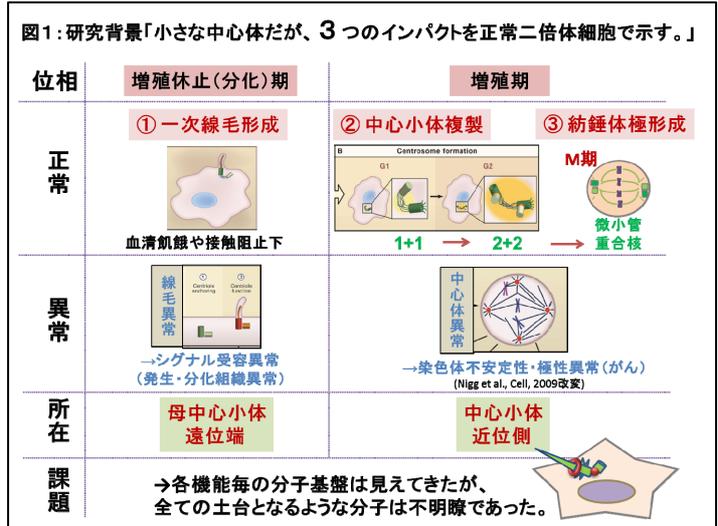
中心小体の構造変化に根差した分化増殖への人的介入

愛知県がんセンター研究所 腫瘍医化学部

猪子 誠人

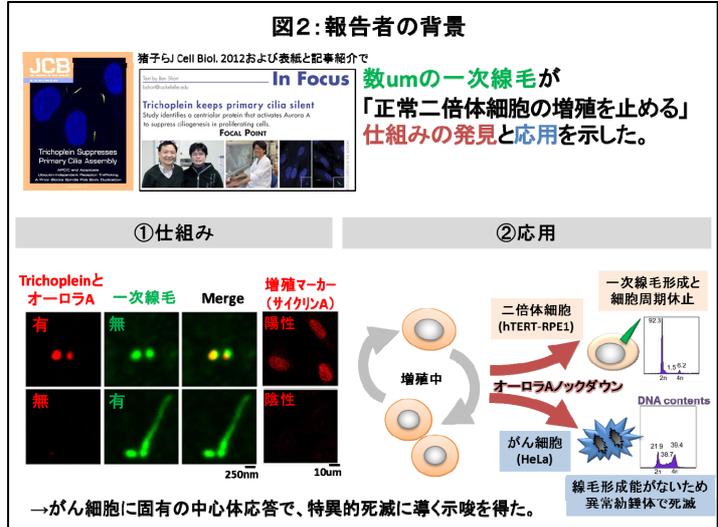
1. 目的

中心小体およびこれを含む中心体は、1umほどの小さな細胞内構造であるが、特徴的な動態変化として一次線毛形成、中心小体複製、紡錘体極形成という3つのインパクトを示す(図1)。これらに付随する分化・細胞増殖は細胞の重要現象であると同時に、がん化の標的でもある。特にがんでは一次線毛形成能の欠失や中心体数の異常がみられる。このように小さい作用点で大きい現象効果を生む中心体構造には、医学介入の標的としての期待も高まる。一方で、その小ささゆえに困難な解析は、最近の高～超解像顕微鏡やオミックス解析技術の総合進歩による克服を待つ必要があった。



私どものこの領域での先行成果は、小さな一次線毛の形成制御が細胞周期に与えるインパクトをTrichoplein-オーロラA分裂期キナーゼ分子経路と共に発見したことである(図2、参考文献1-3)。

本研究では、このように小さな中心体の変化が大きなインパクトを生む生命現象とその分子基盤を、細胞増殖休止やそれに伴う組織分化制御の面で開拓する。これにより、生体応用効果の高い標的分子を新たな視点で見出すことを目的とする。



2. 方法

このように小さくかつ大きなインパクトを潜在させる中心体の特性に鑑み、標的分子の抽出には①数的補強、③分子間・空間的な標的精度の確認、②組織幹細胞を加えた幅広い分化解析、が必要であると報告者は考え、以下のような準備と計画を行った。

①数的補強: 申請者は中心体で動態制御にあずかる新規標的分子群を局在と機能の両面から検索し、新たに補填した。具体的には産総研が保有する蛋白質局在情報データベース(HGPD)に基づき、中心体局在を示す遺伝子約680個およびtrichoplein類縁配列蛋白質約100個を抽出した。これらを配列特性やhTRET-RPE1(正常二倍体不死化)細胞を用いた遺伝子ノックダウンスクリーニングで絞り込み、trichopleinと同じく一次線毛形成を機能欠失表現型とするCcdc(Coiled-coil)蛋白質群十数個と、新

たに中心小体複製障害を見出した蛋白質(同定はInoko (共同第一著者) et al. 2008JCB)等を選出した。

このように、先行解析中のtrichopleinおよびその類縁蛋白質と共に数的補強を施した中心小体制御分子群を対象に、以下の実験を行う。

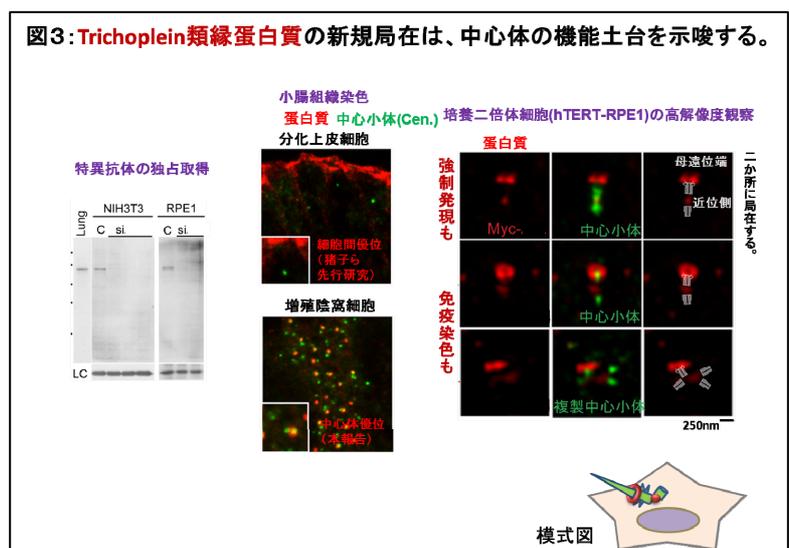
②分子間・空間的な標的精度の確認：中心体はナノスケールの小ささであることから、200nm回折限界以下の超解像度を持つ最新の顕微鏡(SIM, STED)あるいはデコンボリューション顕微鏡の高分解能(200nm)により、標的蛋白質の微細局在解析を行う。また遺伝子ノックダウンや強制発現より見出される細胞機能と微細局在の相関解析を行う。また、このナノスケールの分子局在を生化学的分子間相互作用の面で補強する。

③時限初期化組織幹細胞を加えた幅広い機能欠失表現型解析：時限初期化組織幹細胞は、上皮組織幹細胞を無限増殖可能にする最近の方法で、未分化・分化両状態が誘導できる(Suprynowicz et al. 2012 PNAS)。この上皮組織幹細胞で新たにIn vitro簡易分化システムを創出し、機能欠失が未分化・分化両状態へ及ぼす影響をマーカーの発現レベルや後述の高解像度の局在変化で詳しく解析検討する。さらにクローン化できる同幹細胞のメリットを活かし、精度向上のための時限ノックアウト細胞を確立する。このために必要なゲノム編集とターゲティングベクターを併用した最新相同組み換え技術は、既に実績のある広島大学原医研・宮本達雄講師の試料提供を受け導入中にある。

3. 結果

今回は特に方法①②に関して論文報告に値する成果を収めた。すなわち、報告者が同定したtrichoplein類縁蛋白質のひとつの中心小体内微細局在は、一次線毛形成、中心小体複製、紡錘体形成のすべての統合を示唆し、かつ機能実験によってその確証を得た(図3および以下)。私どもが独占取得したこの蛋白質の特異抗体は、生体組織において、気管多線毛の根元にある中心小体類似構造に加え、広く複製中の中心小体に局在を示した。そのため、正常二倍体培養細胞で以下の局在・機能相関実験を追加した。まず、詳細な局在観察では中心小体の遠位端と近位端の両方へのユニークな局在特性を認めた。ノックダウンでは血清飢餓下での一次線毛形成が阻害されたが、これは遠位端機能の障害による(TanosらGene&Dev2013の先行示唆)。一方で、血清存在下のノックダウンでは新たに中心小体複製の障害が明らかとなった。マーカーを用いた局在相関確認や・生化学的結合実験からは、これが近位端に局在する中心小体構造蛋白質の局在障害と強く相関することが示された。さらにHeLa細胞のノックダウンでは染色体が凝集する分裂前期にも関わらず紡錘体極形成の障害が新たに見られた。こちらは近位端に局在する分裂期kinaseの障害と強い相関を認めている。そして、すべての機能障害はレスキュー実験で回復可能なことを確認した。以上の結果は、このtrichoplein類似蛋白質が3つの特徴的な中心体動態の基盤となるこれまでにない重要分子であることと、その分子基盤の同時発見を意味しており、論文投稿に向けた細胞生物学・生化学的裏付けの最終確認中にある。

方法③では、同蛋白質が気管線毛分化の早期段階から既に線毛基底部に集束する、極めて報告の限られた分子のひとつであることを見出した。同時に線毛形成が関与する新たなIn vitro簡易分化システム開発にいくつか成功した。また、hTERT-RPE1(正常二倍体不死化)細胞を用いたゲノム編集モデルでは、同遺伝子の相同組み換え体の取得が可能なことをシーケンス解析により確認した。

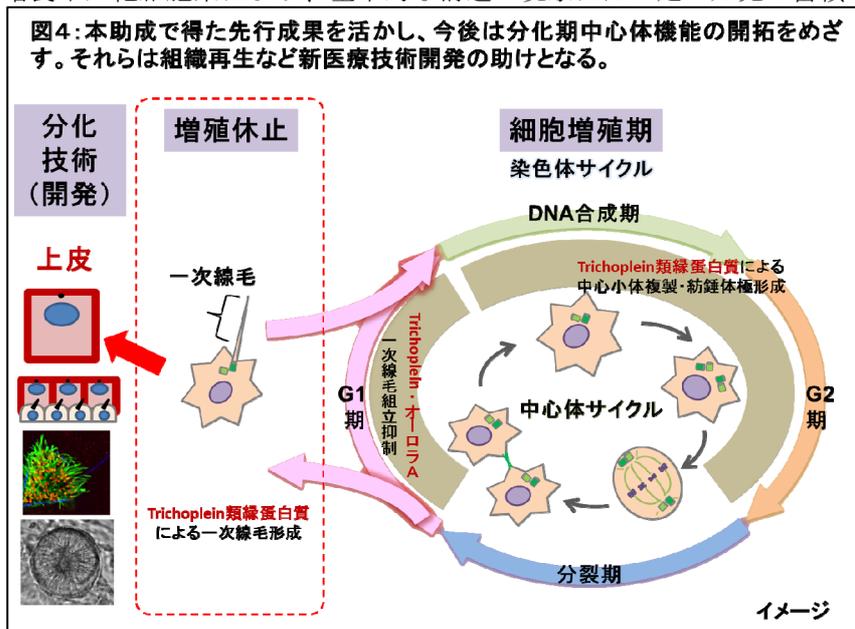


4. 考察

本助成において、方法①②では、新規中心体分子の中心体機能統合とその分子メカニズムの同定に成功した。これは中心小体内微細局在と機能相関の開拓という独自の着眼が、これまでに無い細胞生物学的成果を産んだと言える。また、方法③では報告者の同定した蛋白質が気道線毛分化に早期から局在相関する重要な因子であることを見出し、それと同時にいくつかの線毛関連In vitro簡易分化システム開発に成功した。これらは大きな先行利益として、まだまだ未開拓領域の多く残る細胞周期休止期の中心体機能に踏み込むチャンスを得たことを意味する（図4）。さらに報告者が共同研究で取得したゲノム編集技術はその解析の強い味方となる。

これまで中心小体やそれを含む中心体の研究はその普遍性と多様性で学際領域を成してきた。線毛は鞭毛虫をモデルに、またハエや培養不死化細胞系により、基本的な構造・現象には一定の知見の蓄積がある。

その発展形として、報告者は中心体の医学応用を目指す。本助成で得たIn vitroの先行成果を活かし、多様な組織特異的分化への中心体寄与を開拓する。その成果は再生医療、線毛病治療（気道疾患、卵管性不妊、がん）の新技术の萌芽として期待できる。また、標的分子の解析が分子構造レベルで進めば新たな創薬のシードとしても期待できる。



5. 参考文献

1. Inoko A, Matsuyama M, Goto H, Ohmuro-Matsuyama Y, Hayashi Y, Enomoto M, Ibi M, Urano T, Yonemura S, Kiyono T, Izawa I, *Inagaki M. Trichoplein and Aurora A block aberrant primary cilia assembly in proliferating cells. J Cell Biol. 2012; 197:391-405 (同号のCover Pictureと紹介記事「In Focus」、論文評価サイト「F1000」、およびWeb・TV・新聞の報道記事でも紹介された(プレスリリースは下記リンク))

<http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/cc/press/pdf/240611jcb.pdf>

2. Goto H, Inoko A, Inagaki M. Cell cycle progression by the repression of primary cilia formation in proliferating cells. Cell Mol Life Sci. 2013; 70: 3893-3905

3. 猪子誠人, 稲垣昌樹: 一次線毛動態による新たな細胞増殖制御機構〜トリコプレイン-オーロラAキナーゼ経路〜, 化学と生物(日本農芸化学学会誌) 2013; 51, 524-533 (査読有)