

早稲田大学大学院 先進理工学研究科

博士論文概要

論文題目

ヒト中心体タンパク質 Cep169/CRBP1 の
同定と機能解析

Identification and Functional Analysis of a
Human Centrosomal Protein,
Cep169/CRBP1

申請者

森	勇介
Yusuke	MORI

化学・生命化学専攻 分子生物学研究

2015年12月

動物細胞における細胞内小器官である中心体は、中心小体とそれを取り囲む不定形の **pericentriolar material (PCM)** で構成されている。中心体から伸長する微小管は、間期には細胞骨格として細胞内物質輸送や形態維持、分裂期には紡錘体を構築し、染色体を娘細胞に分配する装置として機能している。そのため、紡錘体の形成異常は染色体不安定性を誘導し、がん化につながることが知られている。さらに近年、紡錘体軸決定が幹細胞分化時の、対称または非対称分裂を制御する上で重要な機構であることが報告されている。神経細胞や上皮系の細胞分化時には、軸の方向に依存して、娘細胞の分裂方向が変わり、幹細胞の自己複製、または、分化細胞へと細胞の運命が決定される。そのため、軸の異常は小頭症のような発生不全や多発性嚢胞腎などの疾患を引き起こすことが示唆されている。しかし、このような紡錘体軸の方向性を決定する因子についての動物細胞での報告は少なく、紡錘体を制御する分子の探索と、詳細な分子機構の解明が求められている。本研究では、紡錘体軸の位置決定における分子機構解明を目的として、中心体および微小管の制御に関連するタンパク質の同定と機能解析を行った。

これまで我々の先行研究では、ショウジョウバエにおける **centrosomin (CNN)** タンパク質が中心体成熟と微小管動態を制御していることを報告した。一方、**CNN** のヒトホモログである **CDK5RAP2** は、小頭症の原因因子として発見され、この欠損変異は、神経幹細胞の分化異常に伴った、大脳皮質の減少を誘導することが報告されている。そのため、ヒト細胞においても **CDK5RAP2** が微小管動態や紡錘体形成制御の機構に大きく貢献している可能性が示唆されるが、詳細な分子機構は明らかになっていない。そこで本研究では、**CDK5RAP2** に結合する分子を探索することで、紡錘体軸の決定制御における未知の機構を明らかにすることを考えた。**CDK5RAP2** には種を超えて高度に保存されたモチーフ (**CM1**) が存在し、この **CM1** に結合する分子の探索を行うことで、これまで機能について報告のない新規のタンパク質を同定し、遺伝子を単離した。このタンパク質を、**Cep169 (centrosomal protein 169kDa)/CRBP1 (CDK5RAP2-binding protein 1)** と命名し、中心体の機能と共に紡錘体軸の配向性という観点から、分子機構や機能の解析を行った。

本論文は 7 章で構成されている。各章の概要は、以下の通りである。

第 1 章は序論であり、本研究背景と目的について述べる。

第 2 章は **CDK5RAP2** に結合する、新規タンパク質 **Cep169/CRBP1** の同定と細胞生物学的、および、生化学的な性質についての基本的な解析結果を記述する。**CDK5RAP2** は、ヒト以外のホモログとの相同性比較によって、高度に保存されたモチーフ (**CM1**) をもつことが知られている。先行研究により、**CM1** は微小管重合に重要なモチーフであることが明らかになっており、そこで本研究では、**yeast two-hybrid** 法を用いて、**CDK5RAP2** の **CM1** に結合するタンパク質の探索を行った。探索の結果、これまで機能について報告のない、新規タンパク質を同定し、

分子量が 169kDa の中心体タンパク質であることから、Cep169/CRBP1(以下、Cep169 と表記)と命名した。ヒト細胞を用いた免疫沈降実験においても、同様に CDK5RAP2 と Cep169 の結合が確認され、また、Cep169 の N 末端が CDK5RAP2 との相互作用に重要なドメインであることが明らかになった。Cep169 のアミノ酸配列の相同性検索から、Cep169 の N 末端が種を超えて高度に保存されていることがわかり、この保存領域を抗原として抗体を作製した。作製した抗体を用いたウェスタンブロット法により、培養細胞における内因性の Cep169/CRBP1 の検出および、Cep169/CRBP1 に対する RNA 干渉による small interfering RNA(siRNA)のタンパク質発現抑制効果を確認した。次に、免疫染色および生細胞観察により、Cep169 の局在が中心体のみならず、微小管伸長端に局在することを確認し、Cep169 が microtubule plus-end-tracking proteins (+TIPs)のメンバーであることが明らかとなった。多くの +TIPs は、EB1 を足場にして微小管伸長端に局在することが報告されており、Cep169 にも EB1 との結合モチーフ (S/T)x(I/L)P(以下 SxIP モチーフ) が 3箇所存在している。リコンビナント EB1 タンパク質を用いた Cep169 とのプルダウン実験から、SxIP モチーフに変異を導入した Cep169 では、EB1 との結合が低下した。また、925-928 aa の SxIP 変異体では、微小管伸長端への集積が顕著に抑制された。以上の結果から、Cep169 は SxIP モチーフを介して EB1 と結合し、+TIPs としての局在を示すことが明らかになった。

第 3 章では、Cep169 の微小管動態における機能について記述する。Cep169 を細胞内で過剰発現させると、太いフィラメント形成が観察された。免疫染色によって、このフィラメントは、微小管が束化したものであることを確かめた。さらに、この束化した微小管の性質を解析したところ、束化した微小管を構成する tubulin が高度にアセチル化されていることが明らかになった。また、微小管動態をタイムラプス撮影により観察したところ、束化した微小管はほとんど動かず、微小管先端での伸長や脱重合の頻度が低下していた。この微小管の束化の現象は、前章で作製した SxIP 変異体によっても誘導されることから、EB1 を介さない Cep169 の微小管結合の機構が示唆された。Cep169 の免疫沈降によるドメイン解析から、Cep169 は、①微小管構成因子である tubulin との直接的な結合ドメインと、②Cep169 同士で二量体もしくは多量体を形成するドメインをもつことがわかり、これらのドメインによって、微小管同士を架橋することで安定化させる機能をもつと考えられた。実際、内因性の Cep169 を発現抑制した細胞では、微小管の脱重合が亢進していることから、Cep169 は微小管骨格の維持に重要であることが示唆された。

第 4 章では、分裂期に活性化するキナーゼと Cep169 の関係の解析結果について記述する。Cep169 は分裂期において、中心体から細胞質に解離することが観

察された。分裂期では、多くのキナーゼの活性が上昇することが知られており、Cep169 と分裂期キナーゼとの関連を確認した。Cep169 は、細胞質に解離するタイミングで、SDS-PAGE におけるバンドシフトが起きており、このバンドシフトがキナーゼを介したリン酸化修飾によるものかを明らかにするため、ホスファターゼ実験および各種キナーゼ阻害剤を用いた実験を行った。これにより、Cep169 は CDK1 から特異的にリン酸化を受け、中心体から解離する機構があることが示唆された。また、質量分析を用いた解析により、Cep169 タンパク質の中央付近の領域で 7 箇所のリン酸化セリンを同定した。これらのリン酸化部位は、全て CDK1 によるコンセンサス配列と一致することから、CDK1 によるリン酸化が Cep169 の局在を制御していることが示唆された。

第 5 章では、細胞周期分裂期における、Cep169 による紡錘体制御機構について解析結果を記述する。Cep169 を発現抑制した分裂期の細胞では、分裂異常を引き起こすことが明らかとなった。分裂期紡錘体の観察から、紡錘体を構成する微小管の短縮が起きており、さらに紡錘体の軸に関して、①紡錘体が細胞の中心から偏った位置に形成、②本来、細胞外基質表面に対し平行な紡錘体が、大きく角度が傾く異常が明らかとなった。これらの表現型は、Cep169 発現抑制による、微小管の安定性低下に起因するものと考え、さらに詳細な機能解析のために、Cep169 を発現抑制した細胞に Cep169 の野生型と SxIP 変異体の遺伝子をそれぞれ導入することにより、表現型の回復実験を行った。微小管の短縮は野生型と変異体の両方で回復が認められ、紡錘体が偏る異常も回復していた。しかし、紡錘体の角度異常は、野生型では回復されるが、変異体では回復されないという結果を得た。SxIP 変異体導入による結果は、Cep169 発現抑制細胞の taxol 処理による強制的な微小管の安定化と同様の表現型であった。以上の結果から、Cep169 は、紡錘体を構成する微小管の安定化の機能を持ち、さらにそれ以外にも、SxIP モチーフを介した紡錘体角度の調節機能があると考えられた。紡錘体の角度調節には、細胞膜に局在する dynein/dynactin 複合体が星状体微小管を捕捉し、細胞膜に固定する機構が重要であると報告されている。そこで、dynactin の構成因子との相互作用を調べたところ、arp1 タンパク質と Cep169 との間に複合体形成が認められた。Cep169 は、dynein/dynactin と微小管先端の EB1 を仲介することで、星状体微小管を細胞膜へ固定させ、紡錘体の角度を制御していることが示唆された。以上の結果から、Cep169 は、①微小管を安定化する機能と②紡錘体角度を決定する二つの機能を有し、さらに、角度の決定には SxIP モチーフによる EB1 との相互作用が重要であることが示唆された。

第 6 章では、総括であり、本研究により明らかとなった結果について考察する。

第 7 章は、本研究に用いた実験手法、マテリアル、参考文献を記載する。

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名 森 勇介 印

(2016年2月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	<p>○ “Phosphorylation of the centrosomal protein, Cep169, by Cdk1 promotes its dissociation from centrosomes in mitosis” <u>Mori, Y.</u>; Inoue, Y.; Taniyama, Y.; Tanaka, S.; Terada Y. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2015, doi:10.1016/j.bbrc.2015.11.004.</p> <p>○ “Microtubule-bundling activity of the centrosomal protein, Cep169, and its binding to microtubules” <u>Mori, Y.</u>; Taniyama, Y.; Tanaka, S.; Fukuchi, H.; Terada Y. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2015, 467, 754-759.</p> <p>○ “Cep169, a novel microtubule plus-end-tracking centrosomal protein, binds to CDK5RAP2 and regulates microtubule stability” <u>Mori, Y.</u>; Inoue, Y.; Tanaka, S.; Doda, S.; Yamanaka, S.; Fukuchi, H.; Terada Y. PLoS One, 2015, 10, e0140968.</p> <p>“Asymmetric and highly stereoselective synthesis of the DEF-ring moiety of (-)-FR182877 and its derivative inducing mitotic arrest” Kobayakawa, Y.; <u>Mori, Y.</u>; Okajima, H.; Terada, Y; Nakada, M. Org. Lett., 2012, 14, 2086-2089.</p>

早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演	<p>(1) “新規中心体タンパク質 CRBP1/Cep169 による一次繊毛形成の制御機構の解析” 寺田 泰比古、<u>森 勇介</u>、谷山 ゆき、井上 陽子、中村 秀樹、井上 貴文、 成田 啓之、竹田 扇 東京、細胞生物学会: シンポジウム、2015 年 7 月</p> <p>(2) “CRBP1, a novel centrosomal protein, suppresses primary cilia formation with Cep97 and CP110” Yuki Taniyama; <u>Yusuke Mori</u>; Naoki Kishida; Shota Yamanaka; Hideki Nakamura; Takafumi Inoue; Keishi Narita; Sen Takeda; Yasuhiko Terada The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Kanagawa, November 2014.</p> <p>(3) “一次繊毛形成を抑制する新規中心体タンパク質・CRBP1 の同定と機能解析” <u>森 勇介</u>、谷山 ゆき、岸田 尚樹、山中 翔太、中村 秀樹、井上 貴文、 成田 啓之、竹田 扇、寺田 泰比古 静岡、繊毛研究会、2014 年 5 月</p> <p>(4) “CRBP1, a novel microtubule plus-end-tracking protein, regulates cell polarization including directional migration and neurite extension” <u>Yusuke Mori</u>; Satoka Doda; Naoki Kishida; Shota Yamanaka; Yuki Taniyama; Satomi Aoki; Hideki Nakamura; Takafumi Inoue; Naoya Takeda; Yasuhiko Terada International Symposium on Integration of Chemistry and Bioscience, Tokyo, January 2014.</p> <p>(5) “Isolation and analysis of CRBP1, a novel microtubule plus-end-tracking protein” <u>Yusuke Mori</u>; Satoka Doda; Naoki Kishida; Shota Yamanaka; Yuki Taniyama; Yasuhiko Terada The 36th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Hyogo, December 2013.</p> <p>(6) “Identification and characterization of a novel microtubule plus-end-tracking protein interacting with CDK5RAP2” <u>Yusuke Mori</u>; Sayori Tanaka; Satoka Doda; Hiroki Fukuchi; Yasuhiko Terada The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Fukuoka, December 2012.</p> <p>(7) “(-)-FR182877 のファーマコフォアの不完全合成” 小早川 優、岡島 秀樹、<u>森 勇介</u>、寺田 泰比古、中田 雅久 日本化学会第 92 春季年会、神奈川、2012 年 3 月</p> <p>(8) “Enantioselective Synthesis and Biological Evaluation of the Pharmacophore of Antitumor Antibiotic (-)-FR182877” Yu Kobayakawa; <u>Yusuke Mori</u>; Hideki Okajima; Yasuhiko Terada; Masahisa Nakada The 6th GCOE International Symposium on “Practical Chemical Wisdom”, Tokyo, December 2011.</p>