

になりましたことを記して感謝致します。また北海道大学の谷口和弥博士には、本研究発足時から通じて数多くの有用な助言を頂きましたことに感謝致します。

- 1) Axelsen, K.B. & Palmgren, M.G. (1998) *J. Mol. Evol.*, **46**, 84-101.
- 2) Skou, J.C. (1957) *Biochim. Biophys. Acta*, **1000**, 439-446.
- 3) Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., & Ogawa, H. (2000) *Nature*, **405**, 647-655.
- 4) Morth, J.P., Pedersen, B.P., Toustrup-Jensen, M.S., Sørensen, T.L.-M., Petersen, J., Andersen, J.P., Vilsen, B., & Nissen, P. (2007) *Nature*, **450**, 1043-1049.
- 5) Abe, K., Tani, K., Nishizawa, T., & Fujiyoshi, Y. (2009) *EMBO J.*, **28**, 1637-1643.
- 6) Dürr, K., Abe, K., Tavraz, N.N., & Friedrich, T. (2009) *J. Biol. Chem.*, **284**, 20147-20154.
- 7) Yatime, L., Laursen, M., Morth, J.P., Esmann, M., Nissen, P., & Fedosova, N.U. (2011) *J. Struct. Biol.*, **174**, 296-306.
- 8) Abe, K., Tani, K., & Fujiyoshi, Y. (2011) *Nat. Commun.*, **2**, 155.
- 9) Toyoshima, C., Norimatsu, Y., Iwasawa, S., Tsuda, T., & Ogawa, H. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 19831-19836.
- 10) Ogawa, H., Shinoda, T., Cornelius, F., & Toyoshima, C. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 13742-13747.
- 11) Kühlbrant, W., Zeelen, J., & Dietrich, J. (2002) *Science*, **297**, 1692-1696.
- 12) Vandecaetsbeek, I., Trekels, M., De Maeyer, M., Ceulemans, H., Lescrinier, E., Raeymaekers, L., Wuytack, F., & Vangheluwe, P. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **106**, 18533-18538.
- 13) Puts, C.F. & Holthuis, J.C.M. (2009) *Biochim. Biophys. Acta*, **1791**, 603-611.
- 14) Coleman, J.A. & Molday, R.S. (2011) *J. Biol. Chem.*, **286**, 17205-17216.

阿部 一啓

(京都大学大学院理学研究科生物物理学教室)

Unique properties of gastric H^+ , K^+ -ATPase and conserved conformational changes among P-type ATPases
Kazuhiro Abe (Department of Biophysics, Faculty of Science, Kyoto University, Japan, Oiwake, Kitashirakawa, Sakyo-ku, Kyoto 606-0852, Japan)

中心小体複製の分子機構

はじめに

中心体研究の歴史は古く、中心体の存在は細胞分裂期の

紡錘体形成中心として一世紀以上前に Theodor Boveri により発見されている。中心体は間期において微小管形成中心として機能し、分裂期においては複製されて二つになった中心体が二極化した紡錘体を形成する。よって、一細胞周期における中心体複製回数の制御は娘細胞への均等な染色体分配に重要である。実際、中心体の過剰複製が誘発する染色体不安定化の細胞がん化への関与が指摘されている¹⁾。中心体の詳細な内部構造に関してはしばらく不明であったが、電子顕微鏡の発達に伴い、約半世紀前には中心体内部にシリンダー型の微小な構造体である中心小体が存在していることが明らかになった。二つ一組の中心小体がお互いに垂直な位置でL字型に結合し、その周囲にPCM (pericentriolar material) を集積させることで中心体を形成している。また、中心小体は精子鞭毛や繊毛の形成を調節しており中心小体が正常に機能しないと鞭毛や繊毛が形成されず、様々な疾病が起きることが報告されている (ciliopathy, 男性不妊症など)¹⁾。中心小体は9回対称性を有した円筒状の特徴的な構造体で、細胞周期ごとに一度だけ複製するよう厳密に制御されている²⁾。染色体複製と異なり、この複雑な構造体がどのように巧妙に自己複製するのかという問いは長い間多くの研究者達を魅了し続けてきた。

中心小体は幾つかの段階を経て構築される (図 1A)。初期過程においては中心小体の基底部分であり、その9回対称性を規定するカートホイール構造が形成され (図 1B)、その後伸長及び成熟過程を経てその構築が完了する²⁾。各過程は細胞周期に同調して進行するが、どのような分子間相互作用を介して中心小体が段階的に構築されていくかは不明な点が多い。

近年、線虫初期胚、ショウジョウバエ培養細胞などをモデルとし、RNAi を利用したゲノムワイドスクリーニングにより中心小体複製に必須の因子群の同定が行われた。特に先駆的な仕事として挙げられるのが RNAi 黎明期に行われた線虫初期胚をモデルとしたスクリーニングである^{3,4)}。Open Reading Frame と推定された遺伝子を RNAi 法により網羅的に発現抑制し、中心小体複製の異常から細胞分裂に支障をきたす表現系に注目し、その原因遺伝子の機能解析が行われた。これらの中で、中心体に局在するタンパク質に特徴的なモチーフであるコイルドコイルドメインを有するものが Spindle ASsembly abnormal protein family (SAS family) と命名された。この因子群は進化上良く保存されており、他のモデル生物を用いた同様のスクリーニングにおいても、これらの相同体が中心小体複製に必須であるこ

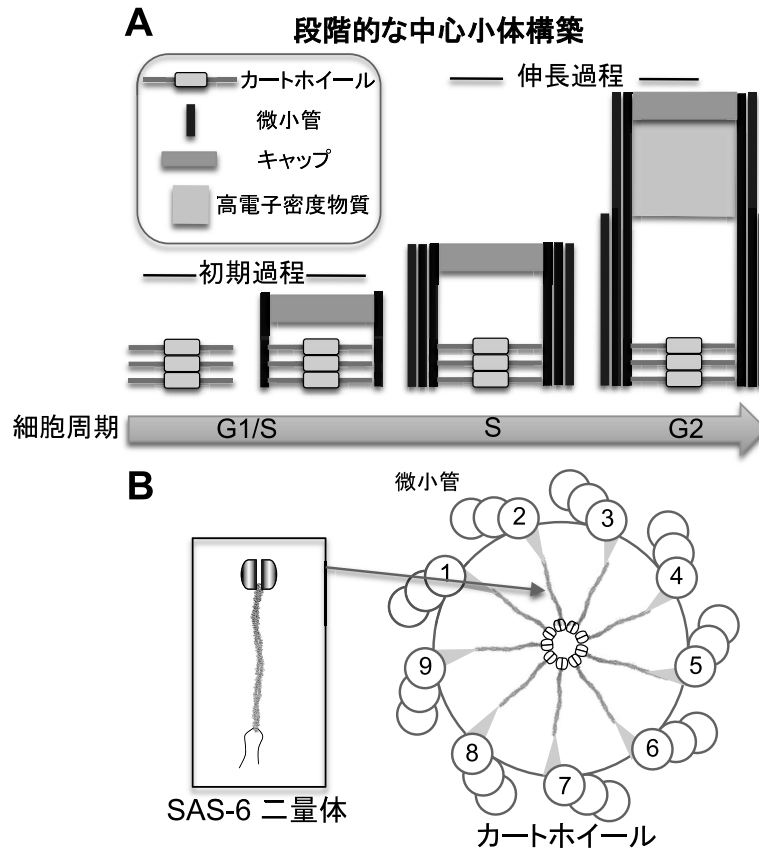


図1 段階的な中心小体構築過程とカートホイール構造
 (A) 細胞周期に同調した中心小体の構築. カートホイール構造から形成が開始される. (B) SAS-6 二量体がカートホイール構造の中心部分を形成し, 9 回対称性を規定する.

とが示されている. また, 種々のモデル系を用いて, SAS family 以外にも中心小体複製に関与する因子の同定が現在も精力的に進められている. さらに, 上記と相補的なアプローチとして, マススペクトロメトリーを利用したプロテオーム解析も進められており, 生化学的に単離した中心体や基底小体の構成因子が次々と同定されている.

筆者らはカートホイール構造に局在し, 中心小体複製に必須かつ進化上保存された因子である SAS-6 (Spindle ASsembly abnormal protein-6) に着目し^{5,6)}, その動態及び機能解析を行ってきた⁷⁻⁹⁾. 本稿では主に中心小体複製に関する最近の研究を紹介すると共に, 最近, 筆者らが SAS-6 及び関連因子の解析を通じて明らかにした中心小体構築開始の分子機構, 中心小体が有する 9 回対称構造を形作るメカニズムに関してまとめた.

中心小体複製に必要なコア因子群の同定

線虫初期胚におけるゲノムワイド RNAi スクリーニング, また, 線虫変異体を利用した順遺伝学的解析から中心小体複製に必須の因子として SPD-2 (SPindle Defective-2), ZYG-1 (ZYGote defective-1), SAS-5, SAS-6, SAS-4 が同定された^{10,11)}. SPD-2 はこの中でも最初に中心小体近傍にリクルートされ, 他因子が中心小体へ局在するためのプラットフォームを形成すると考えられている. プロテインキナーゼである ZYG-1 は SPD-2 の次に中心小体に局在し, SAS-5/SAS-6 複合体の中心小体への輸送を制御している. SAS-5/SAS-6 複合体が既存の中心小体の近傍に運ばれることで新たな中心小体の形成が開始される. そして, その後に SAS-4 が構築途中の中心小体前駆体に運ばれることで, その外側に微小管構造が修飾され, 中心小体の伸長, 成熟過程を経てその構築が完了する.

SAS-6 は中心小体または基底小体を持つ生物種間を通じて、タンパク質の構造上良く保存されており、普遍的に中心小体複製に必須である。また、がん抑制遺伝子である Polo-like kinase 4 (Plk4) は ZYG-1 の機能的ホモログであり、同様に中心小体複製に必須であることがショウジョウバエとヒト培養細胞にて明らかにされている。さらに、ヒト培養細胞において Plk4 もしくは SAS-6 を過剰に発現させると、中心小体の過剰複製が誘発されることが報告されている^{12,13)}。

筆者らは、中心小体複製過程における ZYG-1 のリン酸化基質を探索する過程で、*in vitro* で SAS-6 が ZYG-1 により効率良くリン酸化されることを見出した⁷⁾。さらに、マスペクトロメトリーにより SAS-6N 末端のセリン 123 がリン酸化部位であることを突き止めた。このリン酸化の生理的意義を明らかにする目的で、非リン酸化型とリン酸化模倣型の SAS-6 変異体を線虫初期胚で発現する線虫株を作成した。最初に、内在性の SAS-6 を RNAi により発現抑制したバックグラウンドで SAS-6 野生型と非リン酸化型を比較した。SAS-6 野生型を発現する線虫初期胚では内在の SAS-6 が失われても中心小体が複製したのに対し、SAS-6 非リン酸化型を発現する線虫初期胚では中心小体複製が顕著に阻害された⁷⁾。その理由として、SAS-6 非リン酸化型は中心小体構築開始時に中心小体に局在できないことが挙げられる。また、逆に SAS-6 リン酸化模倣型を発現する線虫初期胚では ZYG-1 (RNAi) による中心小体形成不全の表現形が顕著に抑制された⁷⁾。以上の結果は ZYG-1 による SAS-6 のリン酸化が中心小体複製、特に初期過程において重要であることを示している。

SAS-6 が中心小体に輸送される分子メカニズム

新たに生じる中心小体前駆体の形成は既存の中心小体近傍で開始されるが、必要な構成因子はどのようにそこに運ばれてくるのだろうか？ 例えば、線虫初期胚における FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) 解析により SAS-6 は複製開始時に中心小体近傍にリクルートされることが示されている⁵⁾。また、この能動的な SAS-6 の細胞内輸送は中心小体複製に必要であり、その結合因子である SAS-5 依存的に起こる⁵⁾。SAS-5 は細胞周期を通じて細胞質と中心小体の間を往復することから SAS-6 のカゴ分子として機能することが想定されている。そこで、SAS-5 に作用することで SAS-6 の中心小体への能動的輸送を制御する分子を探索することを目的とし、SAS-5 の結合分子を線虫 cDNA ライブラリー中から酵母ツーハイブ

リッド法により探索し、二次スクリーニングとして RNAi 法を用いて発現抑制した際に *sas-5* 機能欠失型変異と合成致死相互作用を示す因子を探索した。その結果、PP2A (Protein Phosphatase 2A) を新規中心小体複製制御因子として同定した⁸⁾。線虫初期胚にて PP2A ホスファターゼを RNAi により発現抑制、もしくは PP2A のホスファターゼ活性を薬剤処理により阻害すると中心小体複製が抑制された (図 2A-B)。また、その原因として SAS-5/SAS-6 複合体の中心小体への輸送が顕著に抑制されていることを見出した⁸⁾。さらに、共免疫沈降実験及び *in vitro* ホスファターゼアッセイにより PP2A ホスファターゼが SAS-5/SAS-6 複合体と結合し、SAS-5 を脱リン酸化することにより SAS-5/SAS-6 複合体の中心小体への輸送を促進していることを明らかにした (図 2C)⁸⁾。この機構を介して、中心小体前駆体形成に必要な量の SAS-6 が細胞質から中心小体近傍へと効率良く輸送されると考えられる。

SAS-6 による中心小体 9 回対称構造の構築

SAS-6 は中心小体の基底部分に局在し、9 回対称性を規定するカートホイール構造の形成に関与することは知られていたが¹⁴⁾、その分子機序に関しては不明であった。筆者らは電子顕微鏡による SAS-6 複合体の観察や X 線結晶構造解析から得られたデータを駆使した構造シミュレーションにより、SAS-6 高次複合体がカートホイール構造の中心部を形成し、その 9 回対称構造を規定していることを世界に先駆けて見出した (図 1B)^{9,15)}。SAS-6 は N 末端側に進化上保存された PISA (Present In SAS-6) ドメイン、中央部にコイルドコイルドメイン (CC) を有している。この二つの特徴的なドメインに着目し、SAS-6 の分子構造及び生物物理学的特性の解析を行った。最初に、SAS-6CC リコンビナントタンパク質の形状を電子顕微鏡を用いて観察し、多角度光散乱検出器 (MALS) による解析から多量体形成の可能性を検討した。その結果、SAS-6 がこのドメインを介して桿状のホモ二量体を形成することを示した (図 3A-B)⁹⁾。さらに、進化上保存された PISA ドメインを含む N 末端領域の超遠心分析および X 線結晶構造解析の結果から、SAS-6 二量体が N 末端領域を介してさらに高次の複合体を形成する可能性を見出した⁹⁾。興味深いことに、この自己会合を担う N 末端領域中のインターフェースは進化上良く保存されたアミノ酸残基により形成されている。SAS-6 二量体同士が自己会合できないようにアミノ酸変異を導入すると、線虫初期胚及びヒト培養細胞において中心小体の複製が顕著に抑制された⁹⁾。この結果は、

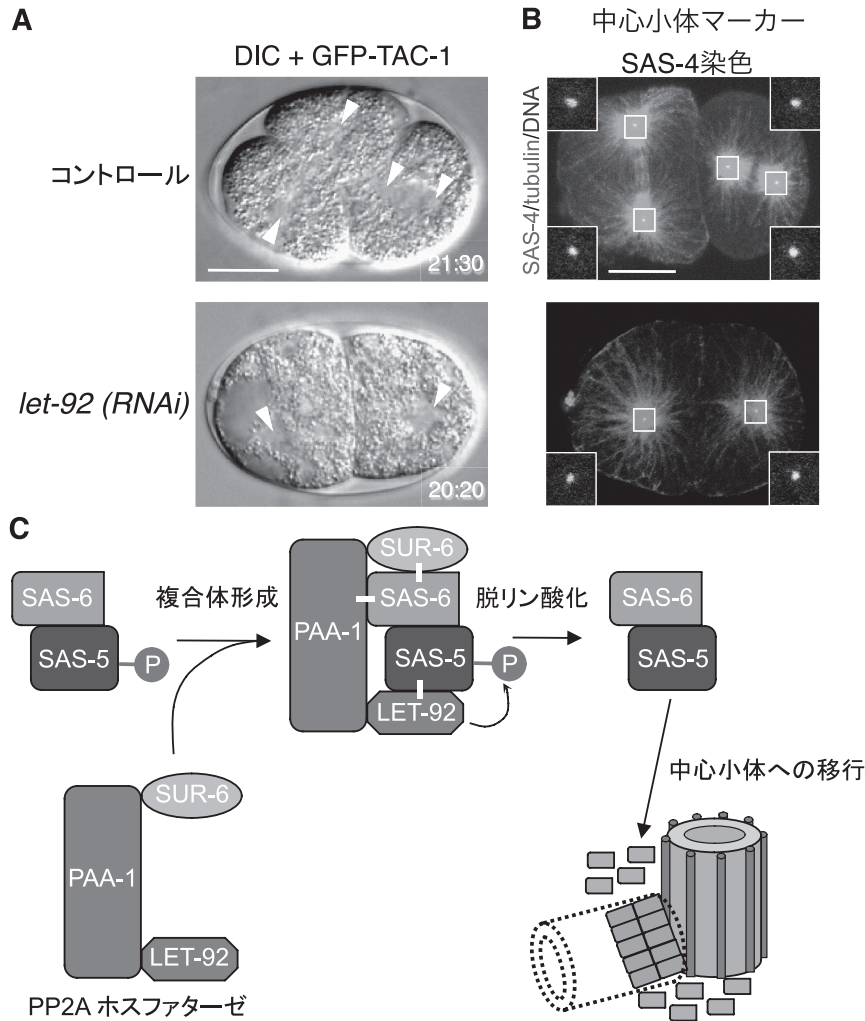


図2 PP2A ホスファターゼは SAS-5/SAS-6 複合体の中心小体への移行を制御する (A) PP2A ホスファターゼは中心体複製に必要である。線虫初期胚 (図は分裂期の二細胞胚) において PP2A ホスファターゼの触媒サブユニットである LET-92 (LEThal-92) を RNAi を介して発現抑制すると中心体複製が阻害される。通常、分裂期の細胞は複製された二つの中心体を有し分裂期紡錘体を形成するが、*let-92 (RNAi)* 胚では中心体の複製が阻害される結果、分裂期の細胞においても中心体が一つしか存在しない。GFP-TAC-1 (Transforming Acid Coiled coil-1)：中心体マーカー。表示時間(分:秒)は雌雄前核融合後の経過時間。(B) PP2A ホスファターゼは中心小体複製に必要である。(A)と同様に、*let-92 (RNAi)* 胚では中心体の核であり、その複製を規定する中心小体の複製が阻害される。SAS-4：中心小体マーカー。(C) PP2A ホスファターゼは LET-92, PAA-1 (Phosphatase 2A regulatory A subunit), SUR-6 (SUppressor of activated let-60 Ras) の3因子により構成されており、SAS-5/SAS-6 と複合体を形成する。酵素活性を持つ LET-92 が SAS-5 を脱リン酸化することで SAS-5/SAS-6 複合体は中心小体近傍へと輸送される。

SAS-6 二量体が N 末端領域を介して高次複合体を形成することが中心小体複製に必須であることを示している。次に、カートホイール構造の詳細な特徴が記述されているモデル生物、クラミドモナスの SAS-6 (CrSAS-6) の解析を

行った。CrSAS-6 高次複合体のモデルを確立することを目的に、CrSAS-6 の N 末端領域、及び短いコイルドコイルドメインを持つ CrSAS-6 二量体の X 線結晶構造解析を行った。これらの結果から CrSAS-6 高次複合体の構造シ

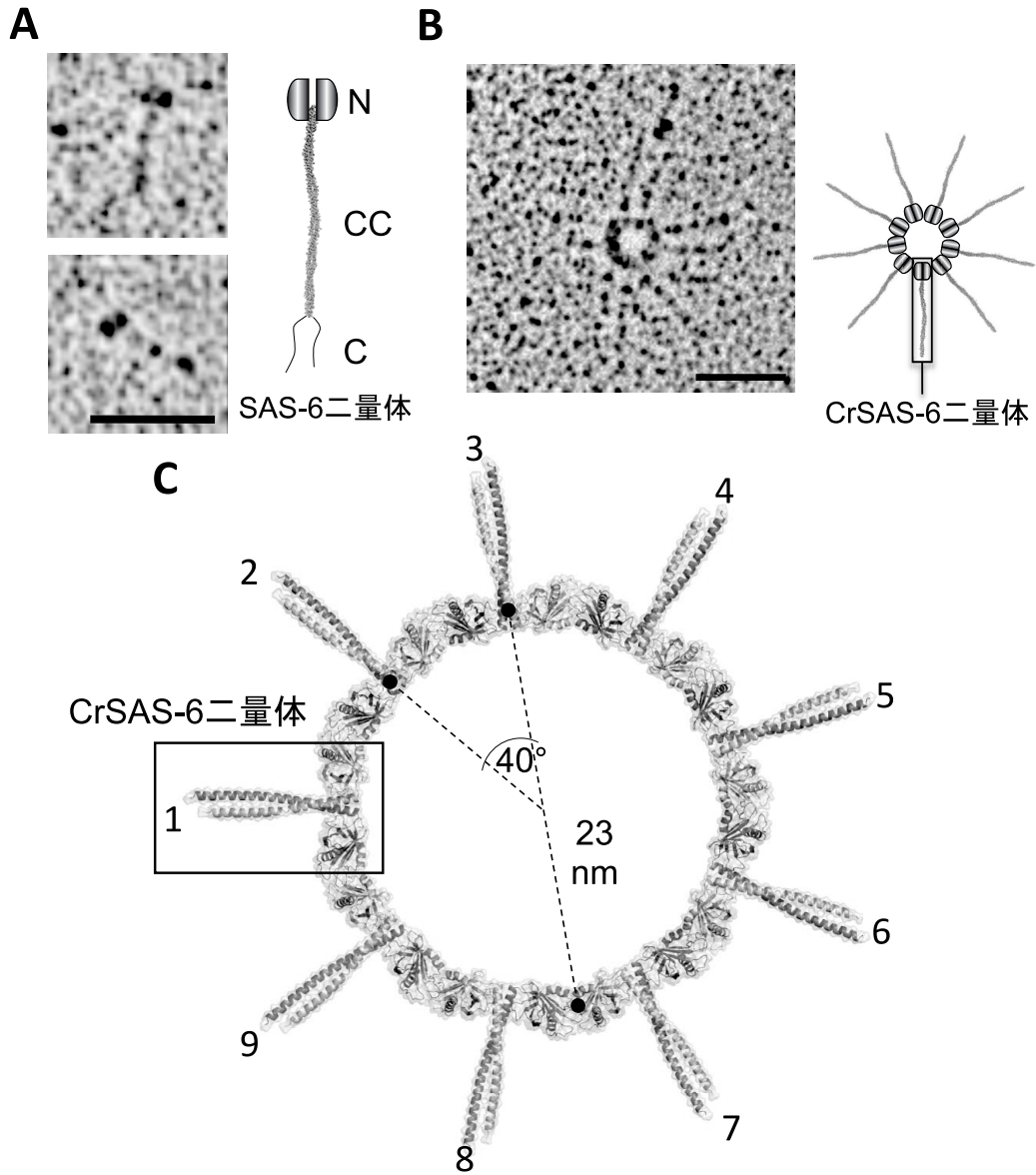


図3 SAS-6は中心小体の9回対称構造を規定する
 SAS-6二量体 (A), SAS-6高次複合体 (B) の電子顕微鏡画像. スケールバー: 50 nm. (C) CrSAS-6のX線結晶構造解析から得られたCrSAS-6高次複合体のモデル. CrSAS-6二量体が九つ自己会合してリング構造を形成している.

ミュレーションを行った結果、驚くべきことに九つのCrSAS-6二量体がN末端領域を介して連結することで同一平面上にリング構造を形成する可能性を見出した(図3C)⁹⁾. 実際、CrSAS-6リコンビナントタンパク質の高次複合体を電子顕微鏡により観察したところ、CrSAS-6二量体は自己会合し9回対称のリング構造を*in vitro*で形成することが観察された(図3B)⁹⁾. 中央のリング部分は

CrSAS-6のN末端領域が連結することで形成され、リングの外側に向かってCrSAS-6のCCドメインが突き出している. このリングの直径はカートホイール構造の中心に位置するハブと呼ばれるリング構造の直径にほぼ一致し、またハブから外側に伸長しているスポークと呼ばれる部分の長さはCrSAS-6CCドメインの長さとはほぼ一致することを見出した. 以上のように、X線結晶構造解析をベースと

したCrSAS-6複合体のモデリング, *in vitro* で再構成したCrSAS-6複合体の電子顕微鏡による観察, 両方の結果はCrSAS-6複合体がカートホイール構造の中央部を形成するモデルと合致する (図1B)⁹⁾.

おわりに

ここで示したモデルはSAS-6高次複合体形成が進化上保存された中心小体の9回対称構造を規定していることを強く示唆している. しかし, CrSAS-6リコンビナントタンパク質を用いた*in vitro*再構成系では, 9回対称リング構造の形成効率は*in vivo*のそれと比較して低いことが推定された. SAS-6は線虫初期胚において中心小体複製開始時にリン酸化されることが示されており, また他のカートホイール構成因子の関与なども考慮すると, *in vivo*ではリン酸化などにより修飾されたSAS-6複合体がさらに他の構成因子と結合することで効率的にカートホイール構造を形成すると考えられる. 今後, この具体的な分子基盤の解明が期待される. また, 形成されたカートホイール構造が何層かに積み重なるメカニズム, 微小管がその周囲に結合するメカニズム, 中心小体が伸長し, 一定の長さで止まるメカニズムなど中心小体の段階的な構築過程には解明が待たれる問題が山積しており, 中心小体構築の分子機構の研究はまだ端緒についたばかりであるといえる.

- 1) Nigg, E.A. & Raff, J.W. (2009) *Cell*, 139, 663–678.
- 2) Strnad, P. & Gönczy, P. (2008) *Trends Cell Biol.*, 18, 389–396.
- 3) Gönczy, P., Echeverri, G., Oegema, K., Coulson, A., Jones, S. J., Copley, R.R., Duperon, J., Oegema, J., Brehm, M., Cassin, E., Hannak, E., Kirkham, M., Pichler, S., Flohrs, K., Goessen, A., Leidel, S., Alleaume, A.M., Martin, C., Ozlu, N., Bork, P., & Hyman, A.A. (2000) *Nature*, 408, 331–336.
- 4) Sonnichsen, B., Koski, L.B., Walsh, A., Marschall, P., Neumann, B., Brehm, M., Alleaume, A.M., Artelt, J., Bettencourt, P., Cassin, E., Hewitson, M., Holz, C., Khan, M., Lazik, S., Martin, C., Nitzsche, B., Ruer, M., Stamford, J., Winzi, M., Heinkel, R., Roder, M., Finell, J., Hantsch, H., Jones, S.J., Jones, M., Piano, F., Gunsalus, K.C., Oegema, K., Gönczy, P., Coulson, A., Hyman, A.A., & Echeverri, C.J. (2005) *Nature*, 434, 462–469.
- 5) Leidel, S., Delattre, M., Cerutti, L., Baumer, K., & Gönczy, P. (2005) *Nat. Cell Biol.*, 7, 115–125.
- 6) Dammermann, A., Muller-Reichert, T., Pelletier, L., Habermann, B., Desai, A., & Oegema, K. (2004) *Dev. Cell*, 7, 815–829.
- 7) Kitagawa, D., Busso, C., Flückiger, I., & Gönczy, P. (2009) *Dev. Cell*, 17, 900–907.
- 8) Kitagawa, D., Flückiger, I., Polanowska, J., Keller, D., Reboul, J., & Gönczy, P. (2011) *Dev. Cell*, 20, 550–562.

- 9) Kitagawa, D., Vakonakis, I., Olieric, N., Hilbert, M., Keller, D., Olieric, V., Bortfeld, M., Erat, M.C., Flückiger, I., Gönczy, P., & Steinmetz, M.O. (2011) *Cell*, 144, 364–375.
- 10) Delattre, M., Canard, C., & Gönczy, P. (2006) *Curr. Biol.*, 16, 1844–1849.
- 11) Pelletier, L., O’Toole, E., Schwager, A., Hyman, A.A., & Muller-Reichert, T. (2006) *Nature*, 444, 619–623.
- 12) Strnad, P., Leidel, S., Vinogradova, T., Euteneuer, U., Khodjakov, A., & Gönczy, P. (2007) *Dev. Cell*, 13, 203–213.
- 13) Kleylein-Sohn, J., Westendorf, J., Le Clech, M., Habedanck, R., Stierhof, Y.D., & Nigg, E.A. (2007) *Dev. Cell*, 13, 190–202.
- 14) Nakazawa, Y., Hiraki, M., Kamiya, R., & Hirono, M. (2007) *Curr. Biol.*, 17, 2169–2174.
- 15) van Breugel, M., Hirono, M., Andreeva, A., Yanagisawa, H.A., Yamaguchi, S., Nakazawa, Y., Morgner, N., Petrovich, M., Ebong, I.O., Robinson, C.V., Johnson, C.M., Vepriyev, D., & Zuber, B. (2011) *Science*, 331, 1196–1199.

北川 大樹

(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)

Molecular mechanisms of centriole duplication
Daiju Kitagawa (Centrosome Biology Laboratory, Center for Frontier Research, National Institute of Genetics, 1111 Yata, Mishima, Shizuoka, 411–8540 Japan)

ニトロ化環状ヌクレオチドによるタンパク質S-グアニル化を介する酸化ストレス適応応答の分子機序

1. はじめに

生体内で産生される活性酸素 (ROS) や一酸化窒素 (NO) に由来する活性酸化窒素種 (RNS) は酸化ストレスをもたらす, 感染, 炎症, 発がんなどの病態の進展に関わっている^{1,2)}. これらの物質はこれまで, 生体分子に非特異的な化学損傷をもたらす毒性因子と考えられてきた. しかしながら近年, ROS・RNSがシグナルとして働き, 巧妙に制御された細胞内シグナル伝達経路を経て, 細胞の分化・増殖, 酸化ストレスに対する適応応答などの細胞機能変化が起こることが明らかになってきた^{3,4)}. このようなROS・RNSによるシグナル伝達では, これらの活性分子種が細胞内のセンサータンパク質 (レドックスセンサータンパク質あるいは酸化ストレスセンサータンパク質と呼ばれる) に受容された後, 下流のエフェクター分子へシグナルが伝