

氏 名 Gupta, Akshari

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1956 号

学位授与の日付 平成29年9月28日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Analysis of the kinase NEK7 in the regulation of G1
progression and procentriole formation

論文審査委員 主 査 教授 木村 暁
教授 荒木 弘之
教授 澤 斉
准教授 島本 勇太
教授 深川 竜郎 大阪大学

Summary (Abstract) of doctoral thesis contents

After mitotic exit, mammalian cells must make several important decisions based upon extracellular and intracellular conditions during the G1 phase, which determine whether or not they will commit to enter a new cell cycle. Progression through G1 and transition into the S phase are under the control of several complex signalling networks, which involve the phosphorylation of many different proteins to initiate DNA replication. Not only DNA replication, but another process known as centriole duplication is initiated at the G1/S transition, which involves the formation of a daughter centriole at the base of a pre-existing mother centriole. Centrioles must be duplicated exactly once per cell cycle, as they play an important role in the organization of the mitotic spindle, and aberrations in centriole number can result in chromosome segregation defects.

The NIMA-related kinase NEK7 was found to be one of the many factors that are required for centriole duplication, as well as timely cell cycle entry. However, the exact functions of NEK7 had not been characterized in detail, and its specific roles in these events were poorly understood. Some of the earliest studies on NEK7 found it to be crucial for mitotic spindle organization and cytokinesis, and atypical expression of NEK7 was also found to be associated with various cancers. Likewise, downregulation of NEK7 could lead to a delay in S-phase entry and early mortality during murine embryogenesis. Although these studies indicated that NEK7 may play a crucial role in the progression of the cell cycle, and particularly in G1, how exactly NEK7 may contribute to cell cycle regulation remained unclear. Thus, as part of my doctoral research, I decided to conduct an in-depth investigation on the roles played by NEK7 in cell cycle progression and centriole duplication.

In this study, I largely focused on characterizing the consequences of NEK7 depletion on various human cancer cell lines, in order to gain insights towards its function. I observed that the depletion of NEK7 inhibited progression through the G1 phase in U2OS cells by the downregulation of various important cyclins and CDKs.

Additionally, I found that the depletion of NEK7 induced the formation of primary cilia in human RPE1 cells, a phenotype that is frequently observed upon serum starvation, suggesting that NEK7 may play a role in mitogenic signalling pathways that are active during G1. The depletion of NEK7 also inhibited the earliest stages of procentriole formation, and led to the downregulation of various centriolar proteins such as STIL. Furthermore, I observed that in the absence of NEK7, there was an abnormal accumulation of Cdh1 at the vicinity of the centrioles, which is a cofactor of the anaphase promoting complex (APC/C). In NEK7-depleted cells, the ubiquitin ligase APC/C^{Cdh1} was found to actively target the centriolar protein STIL for degradation, thus inhibiting procentriole assembly. Collectively, my results

(別紙様式 2)

(Separate Form 2)

demonstrate that NEK7 is involved in the timely regulation of G1 progression, S phase entry, and procentriole formation.

Apart from the roles of NEK7 in the cell cycle, my study also provides a functional role for the APC/C cofactor Cdh1 at the centrioles. I found that Cdh1 associated with the centrioles throughout the cell cycle in a highly specific pattern. As cells enter mitosis, the amount of Cdh1 at the centrioles increased with the expansion of the pericentriolar material (PCM), which is necessary for the formation of the mitotic spindle, and this Cdh1 then abruptly disappeared from the centrioles upon the metaphase-anaphase transition. However, in certain conditions such as depletion of the centriolar satellite protein PCM1, which is involved in trafficking proteins away from the centrioles, Cdh1 exhibited a high accumulation at the centrioles, similar to NEK7-depleted cells. This suggests that Cdh1 localization near the centrioles is maintained alongside the cell cycle, and it may possibly play a role in the regulation of centriole duplication.

In conclusion, my research strongly suggests that NEK7 is an important kinase in the regulation of G1 phase progression and the G1/S transition, and also provides valuable insights towards the regulation of Cdh1 around the centrioles.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

細胞分裂は細胞の最も基本的な働きの一つであり、その素過程を時期特異的に進める細胞周期は様々な因子を用いて制御されている。NEK (NIMA-related kinase)ファミリーに属するリン酸化酵素はヒトで 11 種類存在し、細胞周期の様々な段階を制御することが分かりつつある。Gupta さんは、先行研究で中心小体の複製への関与が示唆されていた NEK7 に着目した解析を行った。NEK7 が中心小体の複製にどのように関与するかを明らかにすることは、未だ謎の多い中心体生物学の研究分野の発展に貢献することが期待された。本論文において Gupta さんは、NEK7 が細胞周期の進行制御や中心体因子の量の制御に関わることを示す一連の重要な成果を報告した。

Gupta さんは、ヒトの培養細胞である U2OS 細胞において NEK7 遺伝子を RNA 干渉法によって阻害することにより、NEK7 の機能を解析した。NEK7 遺伝子の機能阻害を行うと、細胞周期の G1 期で停止した細胞が蓄積することを見出し、NEK7 が G1 期の進行に必要であることが示唆された。さらに解析をすすめ、細胞周期の進行を担うサイクリンやサイクリン依存性リン酸化酵素(CDK)の細胞内での量が低下していることを見つけた。Gupta さんが関心を持っている中心小体の複製もやはり G1 期に起こることから、中心小体の複製を担うタンパク質群(STIL, SAS-6, Plk4 など)の細胞内での量を解析した。その結果、中心小体の複製を担うタンパク質群の量が NEK7 を阻害することにより大きく減少することを見出した。

Gupta さんはさらに、「なぜ、G1 期の進行や中心小体の複製に必要なタンパク質の量が NEK7 を阻害すると低下するのか？」という疑問に取り組んだ。特に STIL タンパク質に着目して解析を進めたところ、中心小体の複製に必要なタンパク質群は、NEK7 の発現を阻害した状況下では、APC/C^{Cdh1} タンパク質複合体によってユビキチン化修飾を受け、分解されてしまっていることを見出した。また、NEK7 の発現を阻害した細胞では、Cdh1 が中心体に過剰に集積していることも示した。APC/C^{Cdh1} は通常、細胞周期の分裂後期から G1 期の初期にかけて活性化し、種々のタンパク質の分解を促進することによって細胞周期を制御しているが、G1 期中盤以降では不活性化されてタンパク質分解を行わない。NEK7 を阻害すると、APC/C^{Cdh1} が G1 期中盤以降でも活性化され続け、中心体に局在することにより、細胞周期の進行や中心小体の複製に必要なタンパク質群が分解され続け、G1 期において細胞周期が停止したり、中心小体の複製が阻害されることが示唆された。

Gupta さんはこの他にも、NEK7 をある細胞種で阻害すると繊毛の形成が誘導されることなど、NEK7 と細胞周期の進行制御や中心体の形成・維持に関連する興味深い知見を明らかにしてきた。一連の研究は、これまでほとんど解析がなされていなかった NEK7 の細胞周期制御における役割を明らかにした優れた研究成果である。以上のことから、本論文は博士号授与の要件を満たすと審査員全員一致で判断した。