

氏 名 土屋 裕樹

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1937 号

学位授与の日付 平成29年3月24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 The role of Cep295 in centrosome biogenesis of human cells

論文審査委員 主 査 教授 荒木 弘之  
教授 宮城島 進也  
准教授 島本 勇太  
助教 井手 聖  
教授 千葉 奈津子 東北大学

論文の要旨

Summary (Abstract) of doctoral thesis contents

The purpose of my study is to understand some of the principal mechanisms of cell division, especially focusing on centrosome biology in human cells. In order to produce two identical daughter cells, a mother cell divides during mitosis inside our body, which is essential for cell growth, repair and reproduction. Therefore, cell division is widely known as a crucial process in living cells, which is vital for life.

To control and regulate proper cell division, the centrosome duplicates once per cell cycle and functions as main microtubule organizing center (MTOC) in most animal cells. Centrioles covered with pericentriolar material (PCM) serve as the core structure of the centrosome. Like humans and other animals, only a mature mother centriole can generate a new daughter centriole, which is crucial for centrosome duplication and strict control of centrosome number in a cell. However, the mechanisms underlying the daughter-to-mother centriole conversion and how a daughter centriole acquires the ability to duplicate in the next cell cycle are incompletely understood. Indeed, disorder of centrosome biogenesis and mitotic process are involved in human diseases such as cancer, genetic disease and ciliopathies.

Therefore, principle of centriole biogenesis not only represents an important open question in biology, but also offers important therapeutic and diagnostic opportunities in medical science.

In this thesis, I mainly focused on the role of centrosomal protein 295kDa (Cep295) in centrosome biogenesis of human cells. By using an iterative BLAST search for the short stretch and the RNAi based depletion, I showed that Cep295, an evolutionarily conserved protein, is required for generation of a mature mother centriole that organizes a functional centrosome. Using the latest super-resolution-microscopy technique such as three-dimensional structured illumination microscopy (3D-SIM) or stimulated emission depletion (STED), I also found that Cep295 is initially recruited to the proximal centriole wall in the early stages of centriole assembly. Cep295 then acts as a scaffold for proper assembly of a daughter centriole.

It is well known that centrosomal protein 192kDa (Cep192) assembles the PCM components, which is essential for the organization of a functional centrosome with MTOC activity during mitosis. Therefore, the initial recruitment of Cep192 is considered to be a “seed” for PCM assembly at the centriole. Moreover, Cep192 is also believed to be the most upstream factor of the evolutionarily conserved pathway for centriole formation. Importantly, using combination of biochemical and cytological analyses, I found that Cep295 binds physically to and recruits Cep192

(別紙様式 2)  
(Separate Form 2)

onto the daughter centriole wall, which presumably provides the function of the new mother centriole for PCM assembly, MTOC activity and the ability for centriole formation. In addition, I also showed that Cep295 promotes Cep192 stabilization in a concentration-dependent manner in human cells. These findings lead me to propose that Cep295 acts upstream of the conserved centriole pathway and facilitates the daughter-to-mother centriole conversion.

Additionally, I provided the cytological evidence for a link between the patient with intellectual disability (ID) and mitotic defects. ID patients normally show significant defects in both intelligence and adaptive behavior. Although mutations of several genes associated with proper progression of mitosis have been reported to underlie ID, the cytological evidence for actual patients with ID is rarely reported. Here, I discuss a new patient with a novel mutation of chromosome alignment maintaining phosphoprotein 1 (CHAMP1), encoding a protein regulating kinetochore-microtubule attachment and chromosome segregation. Using whole exome sequencing (WES) analysis, my collaborators identified a de novo frameshift mutation in CHAMP1. We isolate lymphoblast cells from the CHAMP1 patient and detect errors in chromosome segregation. Furthermore, I found that these cells exhibit an increase in centrosome number and resulting multipolar spindle formation. The phenotypes observed in the patient's lymphoblastoid cells presumably stemmed from cytokinesis failure. I also confirmed the identical phenotypes in human culture cells depleted of CHAMP1. Overall, these data strongly support that CHAMP1 mutations cause ID, and suggest that CHAMP1 is critical for progression of cytokinesis and maintenance of centrosome number.

(別紙様式 3)  
(Separate Form 3)

博士論文審査結果の要旨

Summary of the results of the doctoral thesis screening

動物細胞の中心体は、一对の中心小体（母と娘）とそれを囲む **Pericentriolar material (PCM)** から成り、**Microtubule-organizing center (MTOC)** としての機能を担う。中心体は細胞周期の進行に伴い、倍加し娘細胞に分配されるが、その機構の詳細は分かっていない。土屋さんは、中心小体の形成に関与するヒト **Cep295** タンパク質の解析を行った。

**Cep295** タンパク質のアミノ酸配列は、ショウジョウバエで中心体形成に関与する因子である **Ana1** と部分的に類似性を持ち、動物細胞全般によく保存されていることが分かった。そして、**Cep295** の細胞内での局在を調べたところ、中心体の複製に伴って、最初は母中心小体に、その後、娘中心小体基部に存在することが明らかになった。次に、**siRNA** により **Cep295** の発現を抑制すると、完全な娘中心小体の形成、**PCM** の集合、**MTOC** の機能に欠損を生じることを示し、**Cep295** がこれらの過程で重要な役割をしていると結論している。特に、**Cep295** は新たな中心小体形成の基盤となる **PLK4**, **HsSAS-6**, **STIL**, **Centrosomal P4.1-associated protein (CPAP)** の中心体への結合に必要であるが、逆に **Cep295** の中心体への結合にはこれらは必要ないことが明らかになった。これまで、**PLK4/HsSAS-6/STIL**→**CPAP**→中心小体形成という経路が考えられていたが、前述の結果は **Cep295** がこの経路の最上流に位置することを示唆している。

上述の中心体形成の経路の最上流には位置する別の因子として、母・娘中心小体に局在する **Cep192** が知られている。土屋さんは、**Cep295** と **Cep192** が超解像度顕微鏡観察で共局在し、また共免疫沈降されることから両者が複合体を作っていることを示した。また、**Cep295** の **siRNA** による発現抑制により、間期から始まる **Cep192** の娘中心小体への結合が起こらず、**Cep295** は中心体複製の初期から関与していることが示唆された。さらに、**Cep295** と **Cep192** が結合する領域をそれぞれのタンパク質で決定し、その領域に変異を導入すると **Cep295** は中心小体に局在するが **Cep192** は娘中心小体に局在しないことを示した。このことから、**Cep295** と **Cep192** の結合が **Cep192** の中心小体への局在に必要であると結論している。

土屋さんは、知的障害患者に見つかった **Chromosome alignment maintaining phosphoprotein 1 (CHAMP1)** 遺伝子の変異についても解析を行った。**CHAMP1** は動原体と紡錘体の結合に関与するとされているが、見つかった変異において、細胞質分裂の異常によって中心体数が異常になることを示している。

土屋さんの研究成果は中心体の形成機構及びその制御に新たな知見を加えるものである。特に、**Cep295** が中心体形成の初期段階で重要な役割をしていることを示し、今後のこの分野の進展に大きな寄与をされると考えられる。これらのことから、本論文は学位授与の要件を十分満たすものと審査員一同判断した。