

氏 名 渡辺 紘己

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2043 号

学位授与の日付 平成 30 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 Functional analysis of Cep57 in centrosome biogenesis

論文審査委員 主 査 教授 宮城島 進也
教授 荒木 弘之
教授 澤 斉
助教 浅川 和秀
特任教授 登田 隆
広島大学 先端物質科学研究科

(様式3)

博士論文の要旨

氏名 Watanabe, Koki

論文題目 Functional analysis of Cep57 in centrosome biogenesis

Centrosomes are non-membrane-bound organelles that serve as the major microtubule-organizing centers (MTOCs) in most animal cells and participate in diverse biological processes. A centrosome consists of a pair of centrioles and surrounding pericentriolar material (PCM). Centrosome abnormalities have been linked to human diseases such as cancer and ciliopathies. Centrosome duplication occurs once per cell cycle, which is essential to ensure the correct number of centrioles. Toward the G1-to-S transition, centriole formation begins with the assembly of the cartwheel structure that mainly dictates the universal radial nine-fold symmetry of centrioles, followed by attachment of peripheral centriolar microtubules. During mitosis, the centrosomes act as MTOCs to ensure the robust formation of mitotic bipolar spindle and proper chromosome segregation. At this stage, surrounding PCM drastically expands and acquires MTOC activity. Each newly-formed daughter centrioles are orthogonally connected to each mother centriole until late mitosis. The loss of connection between the mother and daughter centrioles occurs after cytokinesis with the disassembly of expanded PCM. The disconnection process is called “centriole disengagement” and thought to be a licensing step for centriole duplication in the next cell cycle. Therefore, the timing of centriole disengagement must be tightly regulated. However, the mechanism underlying centriole disengagement remains elusive.

Although it is reported that Cep57 is responsible for mosaic variegated aneuploidy (MVA) syndrome, the role of Cep57 in centrosome biogenesis is poorly understood. In this study, I address the role of Cep57 in centriole engagement and PCM

organization and show that Cep57 is essential for PCM organization and centriole engagement during mitosis. I reveal that Cep57 depletion results in precocious centriole disengagement and PCM disorganization in mitosis. Interestingly, such precociously-disengaged daughter centrioles aberrantly recruit PCM components and acquire ectopic MTOC activity, which thereby appears to cause chromosome segregation errors and aneuploidy in human cells. Moreover, my study for the first time provides evidence that precociously-disengaged centrioles can be unequally distributed into two daughter cells, which also leads to chromosome segregation errors and aneuploidy. Given these results, I also test if what I found in Cep57-depleted human culture cells is also true in MVA patients' cells. As expected, MVA patients' cells also exhibit similar defects, such as precocious centriole disengagement and PCM disorganization, suggesting a potential cause of the MVA disease. To understand how Cep57 contributes to PCM organization and centriole engagement, I examine the precise localization pattern of Cep57 using super-resolution (STED) microscopy. STED analysis shows that Cep57 localizes at the proximal ends of mother centrioles. I next search for a PCM component directly associated with Cep57 and find that Cep57 directly binds to the well-conserved PACT domain of PCNT. The PACT domain has been utilized for targeting a protein of interest to centrioles in the fields since it was discovered. However, the exact binding partner of the PACT domain has not yet been determined. My study shows that Cep57 is the *in vivo* anchor for the PACT domain. Moreover, numerous mutations in *PCNT* gene have been reported to cause mosaic variegated primordial dwarfism type 2 (MOPD2). Among them, the p.Lys3154del mutation seems to be unique as it was pathogenic as a result of missing only a single amino acid within the PACT domain. I then test whether the mutation within the PACT domain affect the Cep57-PCNT interaction and find that the MOPD2-related *PCNT* mutation impairs the interaction and phenocopy the mitotic phenotypes provoked by depletion of endogenous Cep57, suggesting a potential cause of the MOPD2 disease. Finally, I show that Cep57 is evolutionarily conserved across

species. Using BLAST search, I succeed in identifying a 36-amino acid region of homology in other species. Accordingly, I term the conserved short region 'PINC (present in the N-terminus of Cep57) motif'. The PINC motif of Cep57 is involved in its centriolar localization and the PCNT binding.

In conclusion, these findings lead me to propose that the conserved Cep57-PCNT module provides a critical interphase between the centriole core and PCM and is critical for centriole engagement and PCM organization during mitosis.

Results of the doctoral thesis screening

博士論文審査結果

Name in Full
氏名 渡辺 紘己

論文題目 Functional analysis of Cep57 in centrosome biogenesis

中心体は、一对の中心小体（母と娘）とそれを取り囲む Pericentriolar material (PCM) からなり、細胞分裂時に微小管形成中心 (MTOC) として機能し、染色体分配に関わる。中心体は細胞周期の進行に伴って倍加し、娘細胞に分配されるが、中心体の複製機構の詳細は不明である。

先行研究により、キネトコア及び中心体に局在する CEP57 タンパク質を除去すると細胞分裂時の染色体分配に異常が生じることが示されていた。また、*CEP57* 遺伝子の変異が多彩異数性モザイク (MVA) 症候群の原因の一つとして知られていた。しかしながら、CEP57 の機能は不明であった。

出願者は、CEP57 の中心体における機能を解明するために、以下の一連の研究を行った。HeLa 細胞において、CEP57 は母中心小体の基部及びキネトコアに局在し、娘中心小体への局在は G1 期に開始されることが示された。*CEP57* 遺伝子をノックダウンすると、正常細胞において PCM が拡大する M 期にのみ PCM の形態異常が引き起こされ、さらに正常細胞では細胞質分裂後に起こる母娘中心小体の分離が M 期に起きてしまうことが明らかとなった。さらに、母中心小体に加え、CEP57 除去により M 期に分離して生じる娘中心小体も MTOC としての機能を獲得し、その結果、染色体の異常分離、細胞分裂後の数的異常等を引き起こすことが示された。

次に中心小体基部に局在する CEP57 が、PCM の主要構成タンパク質である Pericentrin (PCNT) の C 末端側に存在する PACT domain と結合することを明らかにした。さらに PCNT のノックダウンも *CEP57* ノックダウンと同様に、母娘中心小体の M 期における分離を引き起こすことを見いだした。

上記の結果、CEP57 が中心小体と PCM の結合に関わり、PCM の構築と M 期における母娘中心小体の繋ぎ止めに必要であると結論している。

さらに、*CEP57* に変異がある MVA 症候群患者のリンパ芽球様細胞においても、M 期における PCM の構造異常と母娘中心小体の分離がおきていることを明らかにした。小頭蓋性原発性小人症 (MOPD2) の原因として知られる PCNT 変異アレルのうちの 2 種において、変異 PCNT が中心小体に局在できるが CEP57 と結合できないことを示した。つまり、これらの遺伝性疾患における細胞レベルでの異常は、CEP57 と PCNT の結合異常に起因することが示唆された。

分裂酵母には中心体が存在しないが、Spindle pole body (SPB) が MTOC としてはたらく。先行研究により、分裂酵母においては Ppc89 タンパク質が SPB 構成因子であることが示唆されていた。出願者は、Ppc89 の N 末端側が、分裂酵母における PCNT ホモロ

グである Pcp1 の C 末端側と結合することを示すことによって、CEP57 と Ppc89 が機能的ホモログである可能性を提案し、今後中心体の進化を研究するための手がかりを得た。

これらの研究成果は、真核細胞に広く存在し細胞分裂において重要である中心体の分子構築及び複製機構の理解において、非常に重要な知見である。以上の理由により、審査委員会は、本論文が学位の授与に値すると判断した。

(備考)

1. 用紙の大きさは、日本工業規格 (JIS) A 4 縦型とする。
2. 1 行あたり 40 文字 (英文の場合は 80 文字)、1 ページ当たり 40 行で作成する。
3. 上マージン、下マージン、右マージンは 2 cm、左マージンは 2.5 cm とする。
4. タイトルと本文の間は、1 行空ける。
5. ページ番号は入れない。
6. 出願者 (申請者) が論文審査に合格し、博士号が授与された場合は、本紙を総合研究大学院大学リポジトリにおいて、インターネット公開する。

Note:

1. The sheets must be Japanese Industrial Standard (JIS) A4 vertical.
2. Each line shall have approximately 40 characters in Japanese or 80 characters in English, and each page shall have 40 lines.
3. The top, bottom, and right margins must be 2 cm and the left one must be 2.5 cm.
4. Single spacing is required between the title and the text.
5. There must be no page numbers.
6. If the applicant is conferred a doctoral degree, this paper will be published on the SOKENDAI Repository.