

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06147

研究課題名(和文) ユビキチンリガーゼ複合体APC/Cによるインナー制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of inner centromere regulation by the APC/C ubiquitin ligase

研究代表者

伊澤 大介 (Izawa, Daisuke)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：70754927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：多くのがん細胞は染色体の数の変化が高頻度で引き起こされる染色体不安定性と呼ばれる性質を有している。これまでの知見から、細胞分裂に重要なユビキチンリガーゼ複合体APC/C(分裂後期促進因子)の活性化因子Cdh1は染色体不安定性にも関わっている報告があり、染色体分配が正常な細胞においても、Cdh1の機能抑制によって染色体不安定性を示した。

これまでの解析から、Cdh1の機能が低下すると、インナーセントロメアの中心因子シュゴシンとコヒーシンの機能が低下することを発見した。Cdh1が分裂期に染色体に局在する事も発見しており、Cdh1がどのようにシュゴシンを制御しているか今後の解析が必要とされる。

研究成果の概要(英文)：Many cancer cells have a property called chromosome instability in which changes in the number of chromosomes are caused frequently. It has been reported that the activating factor Cdh1 of the ubiquitin ligase complex APC/C (Anaphase Promoting Complex), which is important for cell division, is also involved in chromosome instability, and even in cells with normal chromosome segregation showed chromosome instability when Cdh1 function is suppressed. Based on the analysis so far, we discovered that if the function of Cdh1 was suppressed, the functions of inner centromere center factor shugosin and cohesin were reduced. We have also discovered that Cdh1 localizes to the chromosome during cell division. Thus, future analyses are needed to see how Cdh1 regulates shugosin.

研究分野：染色体分配

キーワード：染色体 ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

多くのがん細胞は染色体の構造変化や数の変化が高頻度で引き起こされている染色体不安定性と呼ばれる性質を有しており、染色体の数的変化は、共に細胞分裂期の染色体分配異常によって引き起こされる。分裂後期の進行に必須なコヒキチンリガーゼ複合体 APC/C (分裂後期促進因子) の活性化因子 Cdh1 は分裂期の正常な進行に重要な役割を果たす事が知られていたが、これまでの解析から染色体分配にも働きがあることが示唆されており、染色体の分配にインナーセントロメアへの制御に着目し解析を行った。

Cdh1 を除去したマウス細胞では染色体不安定性を示すことから、染色体の安定性制御を通してがん抑制遺伝子として働いている事が示唆されている。本研究は、ヒト細胞において Cdh1 の不活性化時における染色体不安定性の機構を、Cdh1 によるインナーセントロメア制御機構の解析から明らかにする事を目的とし、がん化抑制における APC/C-Cdh1 の知見を深める事を目的とする。

2. 研究の目的

APC/C 活性化因子 Cdh1 が正常な染色体の分配に重要な役割を果たすインナーセントロメアへの制御に関わっているか検証し、染色体不安定性の機構の理解を深める事を目的とする。

3. 研究の方法

1) 染色体不安定性を示さない細胞株 HeLa-watanabe を用いて、Cdh1 活性を抑制した時に、以下の項目について主に間接抗体染色法を用いて蛍光顕微鏡で解析を行った。

・分裂期における染色体不安定に指標となるラギング染色体の解析

・分裂期におけるインナーセントロメア間距離の解析

・インナーセントロメアのマスター制御因子 Sgo1 の機能低下・亢進

・染色体接着因子コヒーシンの機能低下・亢進

・染色体の制御に関わるオーロラ B キナーゼの機能低下・亢進

・上記の解析を経て、それらに関わる制御因子の機能低下・亢進

2) Cdh1 の染色体局在と染色体特異的な相互作用因子の探索

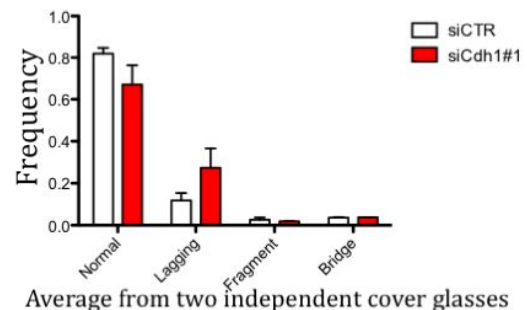
ヒト Cdh1 の免疫沈降法は確立されていないため、染色体不安定性を示さない HeLa-watanabe 株に 3flag タグで標識した Cdh1 (3Flag-Cdh1) をテトラサイクリン添加で発現誘導できる細胞株を作製し、3Flag に対する免疫沈降を行う。さらに分裂期の細胞抽出液について、細胞質画分と染色体画分を調整し Cdh1 の局在パターンの解析を行う。

APC/C の活性化能を失った変異体 (C-box 変異体) を発現する細胞株も作製し、APC/C の活性化能がインナーセントロメア制御に必要であるか検証を行う。

4. 研究成果

1) - 1 染色体不安定性を示さない HeLa-watanabe 株において、RAN 干渉法を用いて Cdh1 の機能を抑制したところ、染色体不安定性を示した (下図 1)。

図 1 Cdh1 の機能抑制における染色体不安定性の解析



- 2 1 の条件化、シュゴシンの局在量を解析した所、インナーセントロメアに距離が伸びたと同時にシュゴシンとコヒーシンの局在量が低下していた (次項図 2)。

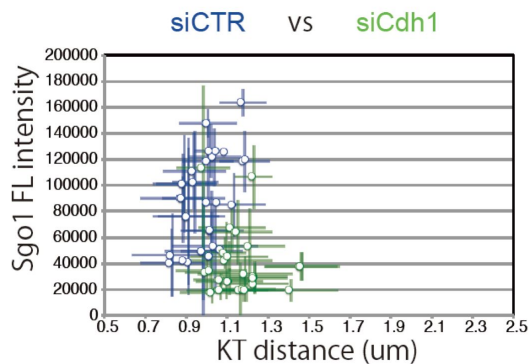


図2 Cdh1 機能抑制におけるインナーセントロメアの距離 (横軸 um) とシュゴシン (Sgo1) の局在量の関係性

-3 1の条件下でオーロラBのインナーセントロメア局在量は変化していなかった。

-4 コヒーシンの負の制御因子WAPLとCdh1を共に機能低下を行うと、インナーセントロメアの距離が回復し、シュゴシンのインナーセントロメア局在量が回復した。

これらの結果は、Cdh1はコヒーシン-シュゴシン経路で染色体分配を制御している事を示唆しているが、さらなる検証が必要とされる。

2)染色体不安定性を示さないHeLa-watanab株に3flagタグで標識したCdh1(3Flag-Cdh1)をテトラサイクリン添加で発現誘導できる細胞株を作製した。3flag-Cdh1を発現する分裂期の細胞を調整し、細胞質画分(cytoplasm)と染色体画分(chromatin)を調整し解析した所、分裂期に3flag-Cdh1が細胞質だけでなくごく少量染色体に局在する事を発見した。

さらに分裂期の染色体分画を採取し、3Flag-Cdh1に対する免疫沈降法を行った所、大部分は細胞質に局在するが、非常に少量であるが一部染色体に局在した(右上図3)。

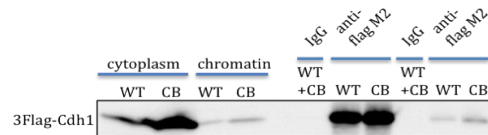


図3 Cdh1 野生型 (WT) と C-box 変異体 (CB) は染色体画分 (chromatin) に局在する

Cdh1 特異的に染色体上で結合する相互作用因子を同定するため、大量の分裂期の細胞から3flag-Cdh1の免疫染色をおこない、一部のタンパク質が染色体上でCdh1と特異的に相互作用している事を発見した(下図4)。しかしながら、タンパク質の同定まで至っていない。

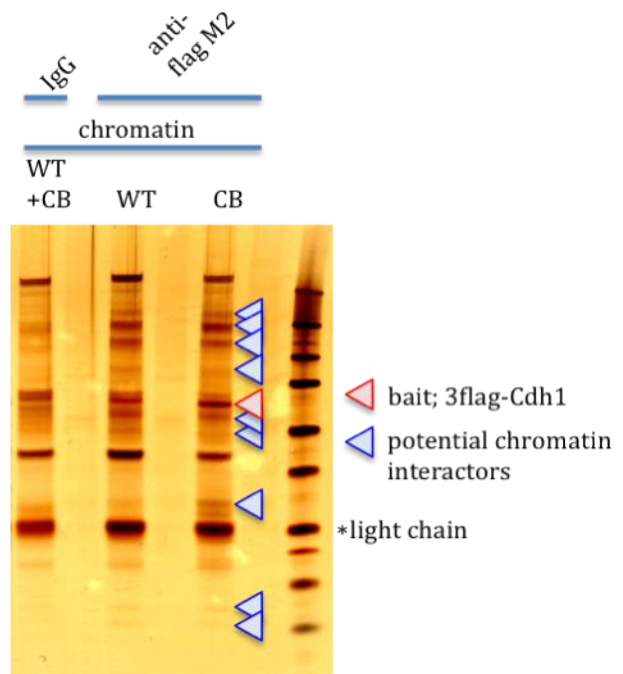


図4 図3と同様に染色体画分から3flag-Cdh1の免疫染色を行い、銀染色法を用いたタンパク質を検出した。

また、C-box変異体の解析を行った所、Cdh1 C-box変異体では染色体不安定に対するCdh1の機能を部分的にしか相補しなかった。しかし、Cdh1 C-box変異体は野生型Cdh1と同様に少量であるが染色体に局在していた(図3)。

これらの結果から、Cdh1 は APC/C と結合に非依存的に染色体に結合し、正常な染色体分配に関わっている推測され、さらなる解析が必要とされる。

これまでの解析から Cdh 1 は染色体に結合し、シュゴシンやコヒーシンの制御を行っている事が推測されるが、その分子メカニズムの解明には至っていない。3flag-Cdh1 の免疫沈降実験から見出した Cdh1 の染色体相互因子を同定し、それらの因子の機能解析によって、Cdh1 がどのようにシュゴシンのインナーセントロメア局在を制御し、がん抑制遺伝子として染色体不安定性に関わっているか明らかになると推測される。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

1 . 発表者 ; 伊澤大介

演題 ; E3 ユビキチン酵素複合体 APC/C はフィードバック制御を通して円滑な分裂期後期を促進する

学会 ; 第 3 3 回染色体ワークショップ・第 1 4 回核ダイナミクス研究会

会場 ; 宮崎県松島町 松島一の坊

日時 ; 2016 年 1 月 12 日 - 1 月 14 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊澤 大介 (IZAWA DAISUKE)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号： 70754927

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()

研究者番号：

