

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06635

研究課題名(和文) 分裂期キナーゼAurora Aによる染色体均等分配システムの堅牢性の解析

研究課題名(英文) Analysis of robust equal chromosome segregation system by mitotic kinase Aurora A

研究代表者

家村 顕自 (Iemura, Kenji)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：50778058

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：多くのがん細胞では染色体の異数化がみられることから、正常細胞に比べて染色体を均等に分配するシステムの堅牢性が低いと予想される。そこで、本研究では、分裂期キナーゼAurora Aのはたらきを解析し、正常細胞がもつ堅牢な染色体均等分配システムを構成する分子基盤の解明を試みた。その結果、正常二倍体細胞ではAurora Aが染色体振幅運動依存的に動原体をリン酸化するとともに、染色体振幅運動の駆動にも寄与していることを明らかにした。本成果をもとに、染色体均等分配システムの堅牢性は、Aurora Aによる動原体のリン酸化と染色体振幅運動のフィードバックループにより維持されているというモデルを提唱する。

研究成果の概要(英文)：Most of the cancer cells show chromosomal instability (CIN), a condition in which chromosome missegregation occurs at a high rate. Erroneous attachment of kinetochores to microtubules from both spindle poles plays a major role in the generation of CIN. I focused on the phosphorylation of kinetochores that is involved in the correction of erroneous kinetochore-microtubule attachment. In this study, I discovered that cancer cells display reduced chromosome oscillation compared to normal cells, and kinetochore phosphorylation was correlated with chromosome oscillation during metaphase. In addition, I found that chromosome oscillation and kinetochore phosphorylation in metaphase is catalyzed by Aurora A. These data suggest that feedback loop between Aurora A-mediated kinetochore phosphorylation and chromosome oscillation is involved in the maintenance of chromosomal stability through the correction of kinetochore-microtubule attachment.

研究分野：細胞生物学

キーワード：分裂期 染色体動態 異数性 リン酸化 がん ゲノム安定性

### 1. 研究開始当初の背景

多くのがん細胞では染色体の異数化がみられる一方、正常細胞の染色体の数は常に一定に保たれている。染色体の異数化は細胞分裂の際に染色体が娘細胞に均等に分配されないことに起因し、遺伝子発現の変化を通じてがんの発生や進展に寄与すると考えられる。このことから、がん細胞では正常細胞に比べて染色体をより均等に分配するシステム(染色体均等分配システム)の堅牢性(ロバストネス)が低いと予想される。しかし、正常細胞とがん細胞間の染色体均等分配システムの堅牢性の違いを司る分子基盤は不明である。

染色体が均等分配されるためには、全ての染色体が紡錘体赤道面へ移動した後、姉妹染色体それぞれの動原体が紡錘体極から伸びる微小管と正しく結合し、双方向性結合を形成する必要がある。この過程で生じる動原体-微小管の誤った結合は、動原体キナーゼ Aurora B によって正しい結合に修正される。Aurora B は姉妹動原体間に局在し、動原体分子をリン酸化することで動原体-微小管結合を解離させる。一方紡錘体極に局在するキナーゼ Aurora A については、これまで紡錘体形成に関与するとされていたが、最近紡錘体極近傍で生じる誤った動原体-微小管結合を修正するはたらきをもつことが示された。興味深いことに、これまでの予備的検討において、Aurora A が分裂期中期において紡錘体赤道面に整列した染色体の動原体をもリン酸化することを見出している。

### 2. 研究の目的

大部分のがん細胞では染色体数の異常が認められるが、これは染色体を均等に分配するシステムのロバストネスが正常細胞に比べて低いことに起因すると考えられる。このような正常細胞とがん細胞間の性質の違いは、がんの治療戦略上の重要なポイントとなる。予備的実験において、正常二倍体細胞の染色体均等分配システムに、これまで知られている分裂期キナーゼ Aurora B に加えて、Aurora A が関与することを示唆するデータを得ていたため、本研究では、この Aurora A のはたらきを解析し、正常細胞がもつ堅牢な染色体均等分配システムを構成する分子基盤を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

Aurora A が触媒する分裂期中期動原体分子のリン酸化の機能的役割を正常二倍体細胞とがん細胞で比較解析することで、正常細胞が有する堅牢な染色体均等分配システムの分子基盤を解明する。まず、分裂期中期での動原体-微小管結合修正に対する Aurora A が触媒する分裂期中期動原体分子のリン酸化の寄与を検討する。

次に、様々ながん細胞株および正常細胞株において分裂期中期動原体分子のリン酸化

に対する Aurora A の寄与を検証し、染色体数異常や染色体分配異常の頻度との相関性を確認する。また、時期特異的 Aurora A 欠損細胞を作成し、分裂期中期特異的に Aurora A を欠損させた細胞に対して様々な Aurora A 変異体を発現させ、分裂期中期動原体のリン酸化に対する Aurora A の機能部位を解析する。

### 4. 研究成果

#### (1) 分裂期中期動原体は染色体振幅運動に依存してリン酸化される。

これまでに、染色体振幅運動が减弱しているがん細胞では、動原体のリン酸化が减弱していることを見いだしている。そこで、染色体振幅運動と動原体のリン酸化の関連性を明らかにするために、Kif18A の発現抑制(染色体振幅運動の亢進)及び微小管安定化剤(染色体振幅運動の抑制)を処理した細胞における動原体のリン酸化状態を観察した。

染色体振幅運動がみられる正常二倍体細胞に微小管安定化剤を処理したところ、染色体振幅運動は减弱した。このとき、動原体のリン酸化強度についても减弱していた(図1左)。また、染色体振幅運動がみられないがん細胞株において Kif18A を発現抑制すると、染色体振幅運動が亢進した。このとき、動原体のリン酸化強度も亢進しており、このリン酸化の亢進は Aurora A 阻害剤を処理することで减弱した(図1右)。

以上の結果から、分裂期中期における動原体は染色体振幅運動に連動して Aurora A によってリン酸化されることが示唆された。

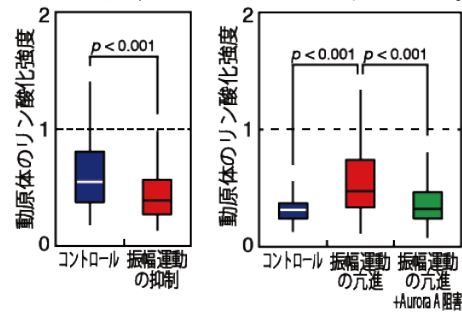


図1. 染色体振幅運動の抑制(左)及び亢進(右)による動原体リン酸化強度の変化

#### (2) 分裂期中期動原体のリン酸化は紡錘体に局在する中心体キナーゼ Aurora A が触媒する

分裂期中期動原体のリン酸化に対する Aurora A の寄与を、時期特異的 Aurora キナーゼ分解系を用いた実験により検証した。

Aurora キナーゼは分裂期を通して様々な機能を担っていることから、発現抑制を行うと分裂期初期に異常が生じ、分裂期中期での機能解析を行うことができない。そこで、植物ホルモン・オーキシンに応答して分解される Auxin-inducible degron (AID) タグを CRISPR/Cas9 法を用いて Aurora キナーゼのゲノム領域下流に挿入し、内在性の Aurora

キナーゼにAID タグを付加した。本法を用いることで、オーキシン添加後約 30 分で内在性 Aurora キナーゼを分解することが可能となる。

分裂期中期に同調した時期特異的 Aurora キナーゼ分解細胞にオーキシンを添加し、動原体のリン酸化強度を定量したところ、Aurora A を分裂期中期特異的に分解することで、その強度が有意に減弱した (図 2、空ベクター/オーキシン有無の比較)。この結果は、分裂期中期動原体のリン酸化が Aurora A によって触媒されるということを強く裏付ける。

次に、分裂期中期動原体のリン酸化に必要な Aurora A の機能部位を明らかにするために、時期特異的 Aurora A 分解細胞に部位変異 Aurora A を発現させ、分裂期中期特異的に Aurora A を分解した際の動原体のリン酸化強度を定量した。野生型 Aurora A を発現させると、Aurora A 分解による動原体のリン酸化の減弱は分解前の強度と同レベルまで回復した一方で、紡錘体局在のみが消失する Aurora A 変異体では、その回復がみられなかった (図 2)。

この結果から、染色体振幅運動に連動する分裂期中期動原体のリン酸化は、紡錘体に局在する Aurora A が触媒することが示唆された。

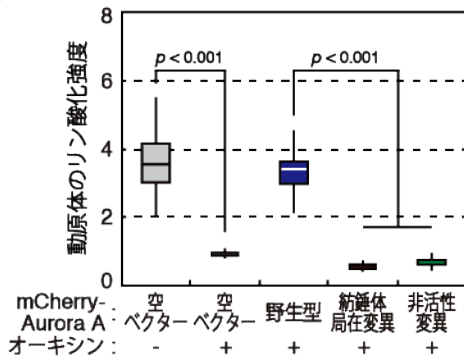


図 2. 各種 Aurora A 変異体を用いた動原体リン酸化強度の変化

### (3) 分裂期中期 Aurora A 活性は染色体振幅運動と動原体-微小管結合修正に寄与する

分裂期中期における染色体振幅運動は動原体のリン酸化によって制御されていることが報告されている。そこで、染色体振幅運動と Aurora A 活性の関連性について検証した。

分裂期中期に同調し、Aurora キナーゼ阻害剤を添加した細胞の染色体動態を観察したところ、Aurora B 阻害剤処理細胞では染色体振幅運動に大きな変化はみられなかったが、Aurora A 阻害剤を処理すると、染色体振幅運動が顕著に減弱することが分かった。また、時期特異的に Aurora A を分解した細胞においても染色体振幅運動の減弱がみられた。

この結果から、分裂期中期における Aurora A 活性は染色体振幅運動の駆動に寄与してい

ることが示唆された。

動原体のリン酸化は動原体と微小管の結合親和性を低下させ、誤った動原体-微小管結合の修正を担っている。そこで、分裂期中期動原体のリン酸化に寄与する Aurora A 活性が、動原体-微小管結合修正に寄与しているかどうかを検証した。

その結果、分裂期中期で Aurora A を阻害した細胞では、誤った動原体-微小管結合が有意に増加するとともに、染色体分配異常も有意に増加した (図 3)。

以上の結果から、分裂期中期における染色体振幅運動と誤った動原体-微小管結合は、Aurora A 活性によって駆動し、修正され、染色体は正しく分配されることが示唆された。

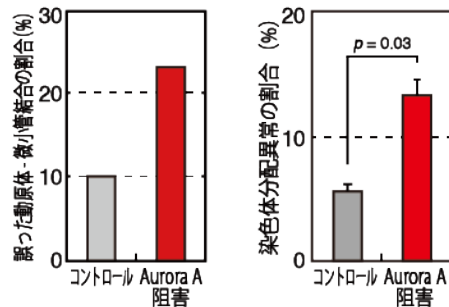


図 3. Aurora A 阻害細胞における誤った動原体-微小管結合の頻度 (左) と染色体分配異常の頻度 (右)

### (4) 分裂期中期動原体のリン酸化は正常二倍体細胞株でのみみられる

染色体不安定性と分裂期中期動原体のリン酸化の関連性を明らかにするために、正常二倍体細胞株 4 種、二倍体癌細胞株 1 種、異数性癌細胞株 5 種を用いて、分裂期中期動原体のリン酸化の強度を定量した。

その結果、正常二倍体細胞株と比べて全ての癌細胞株においてリン酸化の強度が減弱していた。また、癌細胞株の中でも特に、異数性を示す細胞株のリン酸化が顕著に減弱していた (図 4)。次に、正常二倍体細胞 2 種、異数性癌細胞株 4 種について染色体動態を観察したところ、癌細胞株では染色体振幅運動が正常二倍体細胞株と比べて抑制されていた。

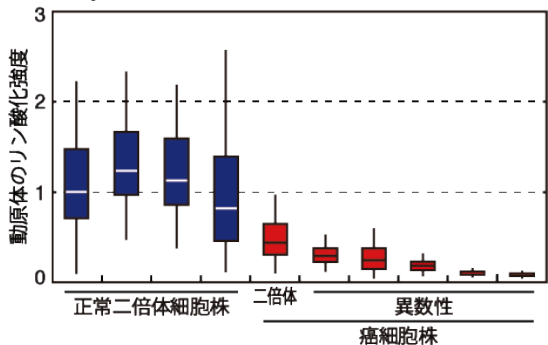


図 4. 細胞株間の動原体リン酸化強度の比較

以上の結果を踏まえた本研究成果として、正常二倍体細胞では Aurora A が染色体振幅

運動依存的に動原体をリン酸化し、このリン酸化により染色体振幅運動が更に駆動するという、Aurora A による動原体のリン酸化と染色体振幅運動のフィードバックループにより、誤った動原体-微小管結合が随時修正され、染色体均等分配システムのロバストネスが維持されているというモデルを提唱する (図 5)。

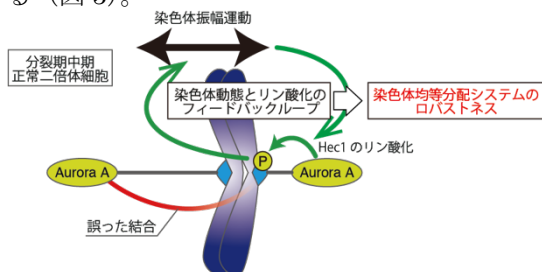


図 5. 本研究成果の概要

## 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 3 件)

- (1) Itho G, Ikeda M, Iemura K, Amin MA, Kuriyama S, Tanaka M, Mizuno N, Osakada H, Haraguchi T, Tanaka K. Lateral attachment of kinetochores to microtubules is enriched in prometaphase rosette and facilitates chromosome alignment and bi-orientation establishment. *Sci Rep*. 2018 Mar 1;8(1):3888. doi: 10.1038/s41598-018-22164-5. 査読有り
- (2) Li J, Shima H, Nishizawa H, Ikeda M, Brydun A, Matsumoto M, Kato H, Saiki Y, Liu L, Watanabe-Matsui M, Iemura K, Tanaka K, Shiraki T, Igarashi K. Phosphorylation of BACH1 switches its function from transcription factor to mitotic chromosome regulator and promotes its interaction with HMMR. *Biochem J*. 2018 Mar 15;475(5):981-1002. doi: 10.1042/BCJ20170520. 査読有り
- (3) Iemura K, Tanaka K. Mechanism for efficient chromosome alignment in mitosis. *Journal of Japanese Biochemical Society* 2017 Feb;89(1):102-5. doi: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890102. 査読無し

[学会発表] (計 7 件)

- (1) Kenji Iemura, Kozo Tanaka. A novel mechanism for maintenance

of chromosomal stability. 第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年

- (2) Kenji Iemura, Kozo Tanaka. Chromosome oscillation ensures faithful chromosome segregation through Hec1 phosphorylation by Aurora A. EMBO workshop Dynamic kinetochore, 2017 年
- (3) 家村 顕自, 田中耕三、Aurora A は正常細胞における染色体均等分配システムの堅牢性を保証する、第 69 回日本細胞生物学会大会、2017 年
- (4) 家村 顕自, 田中耕三、中心体キナーゼ Aurora A は染色体均等分配の堅牢性の維持に寄与する、第 34 回染色体ワークショップ・第 15 回核ダイナミクス研究会、2017 年
- (5) 家村 顕自, 田中耕三、中心体キナーゼ Aurora A は分裂期染色体動態に応答して動原体分子をリン酸化する、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年
- (6) 家村 顕自, 田中耕三、中心体キナーゼ Aurora A は分裂期中期におけるキネトコア-微小管結合の修正に寄与する、第 68 回日本細胞生物学会大会&第 11 回日本ケミカルバイオロジー学会合同大会、2016 年
- (7) 家村 顕自, 田中耕三、中心体キナーゼ Aurora A が触媒する分裂期中期における動原体分子のリン酸化の役割、日本生化学会東北支部第 82 回例会、2016 年

[その他]

所属研究室ホームページ

<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/molonc/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

家村 顕自 (IEMURA, Kenji)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：50778058