

令和元年6月17日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07694

研究課題名(和文)キネシンに依存しない双極性紡錘体形成機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of bipolar spindle assembly in the absence of Kinesin-5/Cut7

研究代表者

湯川 格史 (Yukawa, Masashi)

広島大学・先端物質科学研究科・特任助教

研究者番号：50403605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、染色体の分配装置として働く紡錘体微小管の形成には微小管モーター蛋白質である5型キネシンの働きが必須であると考えられてきた。しかしながら、申請者らは別のキネシンファミリーに属する14型キネシンを5型キネシンと同時欠損させた分裂酵母が紡錘体を形成維持できることを発見した。そこで、本研究では、5型キネシンモーター蛋白質に依存しない新たな紡錘体形成機構に働く因子の探索を試みた。その結果、微小管ポリメラーゼを含む数種の因子が5型キネシンの代わりに紡錘体形成に働くことを初めて明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により同定に成功した新規紡錘体形成因子はいずれも酵母からヒトまで進化上高度に保存されていることから、高等生物においても類似した紡錘体形成機構が存在すると考えられる。また、これらの新規紡錘体形成因子を阻害することにより、がん細胞の増殖を抑えることができると考えられ、副作用の少ないがん治療薬の開発に繋がるのが期待される。

研究成果の概要(英文)：The assembly of a bipolar spindle is necessary to ensure the fidelity of chromosome segregation. In all eukaryotes, spindle formation is driven by the plus-end directed motor kinesin-5. Inactivation of this kinesin causes mitotic arrest with monopolar spindles. Interestingly, simultaneous inactivation of the minus-end directed kinesin-14 restores cell viability in fission yeast. Apparent normal spindle assembly in the absence of both kinesin-5 and kinesin-14 has highlighted the existence of other hitherto unknown factors by which to establish and maintain mitotic bipolar spindles. To uncover these molecules, we have conducted two complementary independent genetic screens. Consequently, we have succeeded in identifying kinesins, microtubule-associated proteins and their regulators.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：染色体分配 紡錘体 微小管 キネシンモーター 5型キネシン 14型キネシン 微小管ポリメラーゼ
有糸分裂

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

染色体均等分配に必要な紡錘体微小管の形成維持には、5型キネシンモーター蛋白質の働きが必須であると考えられてきた。5型キネシンはホモ四量体の構造をとり、細胞分裂時に逆平行に並んだ微小管を架橋するように局在する。微小管プラス端方向に移動する際に反作用で中心体を押し離す力(押力)を生み出し、この押力によって逆平行構造の微小管をスライドさせて紡錘体形成を促す。一方、14型キネシンモーター蛋白質は微小管マイナス端方向に移動し、反作用で中心体を引き戻す力(引力)を生み出す。5型キネシンと14型キネシンがそれぞれ生み出す押力と引力のバランスが紡錘体の正しい双極性構造の形成維持に必要であり、その拮抗的作用は酵母からヒトに至るまで種々の生物で報告されていた。

大変興味深いことに、申請者は分裂酵母の5型キネシン(Cut7)欠損株が異常な単極性紡錘体しか形成できず致死性を示すのに対し、14型キネシン(Pk11)を同時欠損させた *cut7pk11* 二重変異株が生育可能で双極性紡錘体を形成できることを見出した。つまり、この二重欠損株では他の未同定因子が紡錘体形成に機能していると考えられた。そこで、5型キネシンモーター蛋白質に依存しない新たな紡錘体形成機構、それを司る因子に興味を持ち、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、5型キネシンモーター蛋白質に依存しない新たな紡錘体形成機構について手がかりを得るため、真核モデル生物である分裂酵母を用いて、5型キネシン(Cut7)機能欠損時の紡錘体形成維持に必須な新規因子を探索・同定し、その因子の役割解明を目的とした。

3. 研究の方法

分裂酵母にはPk11以外にもう一つ別の14型キネシンKlp2が存在する。5型キネシン非存在下の紡錘体形成維持機構について理解を深めるため、Klp2の紡錘体形成における役割について調査した。また、5型キネシン機能欠損時の双極性紡錘体形成に必須な因子を同定するため、分裂酵母を用いて二つの遺伝学的スクリーニングを実施した。具体的には、以下の3つの研究計画を遂行した。

- (1) 14型キネシン Klp2 の紡錘体形成における機能解析
- (2) 5型および14型キネシン (*cut7pk11*) 二重欠損株と合成致死性を示す変異株の取得
- (3) 5型キネシン温度感受性変異株のサプレッサー変異の取得

4. 研究成果

- (1) 14型キネシン Klp2 の紡錘体形成における機能解析

分裂酵母のもう一つの14型キネシンKlp2が *cut7pk11* 二重欠損株の紡錘体形成にどのような役割を果たすかについて検討した。その結果、Klp2は紡錘体微小管上に局在し、Pk11と同様、Cut7と拮抗的な力を発生させることで紡錘体形成に関わることを見出した。この研究過程で、ヒト14型キネシンHSET/Kifc1を分裂酵母内で過剰発現させた場合に、分裂酵母の14型キネシン(Pk11, Klp2)を過剰発現させた場合と同様、異常な単極性紡錘体しか形成できず、致死性を示すことを発見した。したがって、HSET/Kifc1は酵母細胞内でPk11やKlp2と同様、Cut7と拮抗的な力を生み出せることが明らかとなった。さらに、この致死性を利用することにより、ヒト14型キネシン阻害活性を酵母細胞の生育に置き換えて、細胞毒性と区別して評価する手法を確立することができた。

- (2) 5型および14型キネシン (*cut7pk11*) 二重欠損株と合成致死性を示す変異株の取得

5型キネシンモーターに依存しない紡錘体形成機構に働く新規因子を同定するため、*cut7pk11* 二重欠損株と合成致死性を示す遺伝子欠損株のスクリーニングを実施した。取得が予想される候補因子は微小管結合能を有する可能性が高いことから、分裂酵母データベースの情報を利用して微小管結合能を有することが既知の因子をコードする遺伝子欠損株を選抜し、*cut7pk11* との合成致死性の有無を調べた。その結果、5型キネシンに依存しない紡錘体形成には、6型キネシン(Klp9)や微小管ポリメラーゼ複合体(Alp7/Alp14)を含む7つの遺伝子産物が必要であることが判明した。

このうち、6型キネシン(Klp9)および微小管ポリメラーゼ複合体構成因子(Alp7)について *cut7pk11* 二重欠損下でのみ特異的に温度感受性を示す変異を新たに取得し、これら三重変異株の致死条件における微小管動態をライブイメージングにより詳細に観察した。その観察結果から、5型キネシンモーターに依存しない紡錘体形成機構として、まず、微小管ポリメラーゼが双極性の短い紡錘体微小管を構築し、さらに6型キネシンがその微小管を伸長させることで紡錘体を形成させるというモデルを提唱するに至った。これらの分子は酵母からヒトまで進化上高度に保存されていることから、高等生物においても類似した機構が存在すると考えられた。

- (3) 5型キネシン温度感受性変異株のサプレッサー変異の取得

5型キネシンモーターの代わりに紡錘体形成に働く新規因子を同定するため、*cut7* 変異株が示す温度感受性を抑圧する変異株の取得を試みた。得られたサプレッサー変異について、次世

代シーケンス解析による原因遺伝子の特定を試みた。その結果、取得の予想された Pkl1 を含む MWP 複合体構成因子の変異に加え、微小管構成因子である および -チューブリン、微小管プラス端結合因子の変異が取得された。紡錘体微小管を詳細に観察した結果、*cut7* 変異株では紡錘体微小管量が増大し、それに伴って、14 型キネシン (Klp2) の局在量も増加すること、サプレッサー変異存在下ではこれら微小管量や Klp2 量の増加が解消されることが判明した。したがって、*cut7* 変異株では紡錘体形成に必須な力が低下しているのに加えて、過剰量の 14 型キネシンがより強力に Cut7 と拮抗的な力を発生させることで紡錘体が形成できず致死性を示すと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Masashi Yukawa*, Yusuke Yamada and Takashi Toda*, Suppressor Analysis Uncovers That MAPs and microtubule dynamics balance with the Cut7/kinesin-5 motor for mitotic spindle assembly in *Schizosaccharomyces pombe.*, **G3: Genes|Genomes|Genetics**, 査読有, 9 巻, 2019, 269-280,

*Co-corresponding author

DOI: 10.1534/g3.118.200896

Masashi Yukawa*, Tomoaki Yamauchi, Naoaki Kurisawa, Shakil Ahmed, Ken-ichi Kimura and Takashi Toda*, Fission yeast cells overproducing HSET/KIFC1 provides a useful tool for identification and evaluation of human kinesin-14 inhibitors., **Fungal Genetics and Biology**, 査読有, 116 巻, 2018, 33-41, *Co-corresponding author

DOI: 10.1016/j.fgb.2018.04.006

Masashi Yukawa*, Yusuke Yamada, Tomoaki Yamauchi, and Takashi Toda*, Two spatially distinct kinesin-14 proteins, Pkl1 and Klp2, generate collaborative inward forces against kinesin-5 Cut7 in *S. pombe.*, **Journal of Cell Science**, 査読有, 131 巻, 2018, 1-11, *Co-corresponding author

DOI: 10.1242/jcs.210740

Masashi Yukawa*, Tomoki Kawakami, Masaki Okazaki, Kazunori Kume, Ngang Heok Tang, and Takashi Toda*, A microtubule polymerase cooperates with the kinesin-6 motor and a microtubule cross-linker to promote bipolar spindle assembly in the absence of kinesin-5 and kinesin-14 in fission yeast., **Molecular Biology of the Cell**, 査読有, 28 巻, 2017, 3647-3659, *Co-corresponding author

DOI: 10.1091/mbc.E17-08-0497

Yuzy Matsuo, Sebastian P. Maurer, Masashi Yukawa, Silva Zakian, Martin R. Singleton, Thomas Surrey, and Takashi Toda, An unconventional interaction between Dis1/TOG and Mal3/EB1 promotes the fidelity of chromosome segregation., **Journal of Cell Science**, 査読有, 129 巻, 2016, 4592-4606, DOI: 10.1242/jcs.197533

〔学会発表〕(計 31 件)

湯川 格史, 山田 侑亮, 大石 充輝, 登田 隆, 分裂酵母の新規 RNA 結合タンパク質 Nrp1 の機能解析, 先進ゲノム解析研究推進プラットフォーム拡大班会議, 2018 年 12 月

湯川 格史, 栗澤 尚瑛, Ahmed Shakil, 木村 賢一, 登田 隆, 分裂酵母を用いた抗がん剤シードとなる分子標的阻害物質の新規探索法, 第 41 回 日本分子生物学会年会, 第 41 回 日本分子生物学会年会, 2018 年 11 月

登田 隆, 山田 侑亮, 河上 友基, 寺谷 康宏, 大石 充輝, 湯川 格史, 染色体分配に必要な紡錘体微小管構造を規定するキネシン依存的及び非依存的経路の同定, 第 41 回 日本分子生物学会年会, 2018 年 11 月

森山 亮, 稲田 彩花, 湯川 格史, 登田 隆, 分裂酵母を利用した新規生理活性物質の探索と解析, 第 36 回 YEAST WORKSHOP, 2018 年 11 月

武藤 慧, 湯川 格史, 登田 隆, 分裂酵母 5 型キネシン *cut7* 変異を抑圧する多コピーサプレッサーの取得と解析, 第 36 回 YEAST WORKSHOP, 2018 年 11 月

大石 充輝, 湯川 格史, 登田 隆, M 期紡錘体形成に必要な分裂酵母 5 型キネシン *cut7* 変異を抑制する RNA 結合タンパク質遺伝子 *nrp1* の解析, 酵母遺伝学フォーラム第 51 回研究報告会, 2018 年 9 月

寺谷 康宏, 湯川 格史, 登田 隆, PCR 法を用いた分裂酵母 5 型キネシン *cut7* 変異体の包括的分離と解析, 酵母遺伝学フォーラム第 51 回研究報告会, 2018 年 9 月

河上 友基, 湯川 格史, 登田 隆, 双極性紡錘体形成における力発生装置としての微小管ポリメラーゼ複合体 Alp7-Alp14 の新規機能, 酵母遺伝学フォーラム第 51 回研究報告会, 2018 年 9 月

山田 侑亮, 湯川 格史, 登田 隆, 分裂酵母 Kinesin-5/Cut7 と拮抗的に機能する微小管関連因子群の同定と解析, 酵母遺伝学フォーラム第 51 回研究報告会, 2018 年 9 月

湯川 格史, 登田 隆, 分裂酵母 6 型キネシンモーター Klp9 の機能ドメインと細胞周期制御, 酵母遺伝学フォーラム第 51 回研究報告会, 2018 年 9 月

登田 隆, Ahmed Shakil, 栗澤 尚瑛, 木村 賢一, 湯川 格史, 分裂酵母を用いたヒト 14 型キネシン阻害剤の探索, 酵母遺伝学フォーラム第 51 回研究報告会, 2018 年 9 月

栗澤 尚瑛, 湯川 格史, 越野 広雪, 登田 隆, 木村 賢一, ヒトキネシン-14 (HSET) 過剰発現分裂酵母株を用いて単離された kolavenic acid analog の生物活性, 第 91 回日本生化学会大会, 2018 年 9 月

登田 隆, 岡崎 雅紀, 山内 智瑛, 山田 侑亮, 河上 友基, 寺谷 康宏, 大石 充輝, 湯川 格史, Exploring the molecular pathways leading to bipolar spindle formation., Joint Annual Meeting of 51st JSDB and 70th JSCB, 2018 年 6 月

栗澤 尚瑛, 越野 広雪, 湯川 格史, 登田 隆, 木村 賢一, Screening for anti-tumor compounds using HSET-overproduction fission yeast and isolated kolavenic acid analog from *Solidago altissima*., International Symposium on Innovative Agriculture and Fishery (ISIAF 2018), 2018 年 5 月

湯川 格史, 山田 侑亮, 山内 智瑛, 登田 隆, 紡錘体微小管形成における 14 型キネシンファミリータンパク質の役割, 日本農芸化学会 2018 年度大会, 2018 年 3 月

登田 隆, 岡崎 雅紀, 山内 智瑛, 山田 侑亮, 河上 友基, 湯川 格史, 5 型キネシンを必要としない新規 M 期紡錘体構造形成経路, 第 40 回日本分子生物学会年会 (2017 年度生命科学系学会合同年次大会, ConBio2017), 2017 年 12 月

寺谷 康宏, 湯川 格史, 登田 隆, PCR 法を用いた分裂酵母 5 型キネシン cut7 新規変異体の分離と解析, 第 35 回 YEAST WORKSHOP, 2017 年 11 月

大石 充輝, 湯川 格史, 登田 隆, 分裂酵母 14 型キネシン過剰発現による致死性を抑圧する変異体の探索, 第 35 回 YEAST WORKSHOP, 2017 年 11 月

山田 侑亮, 登田 隆, 湯川 格史, 分裂酵母 Kinesin-5/Cut7 の温度感受性変異を抑圧する変異株の解析, 酵母遺伝学フォーラム第 50 回研究報告会, 2017 年 9 月

河上 友基, 登田 隆, 湯川 格史, 分裂酵母の微小管ポリメラーゼ複合体 Alp7/TACC-Alp14/TOG による新たな双極性紡錘体形成機構, 酵母遺伝学フォーラム第 50 回研究報告会, 2017 年 9 月

① 湯川 格史, 河上 友基, 岡崎 雅紀, 登田 隆, 5 型キネシンに依存しない新規紡錘体形成経路の探索, 酵母遺伝学フォーラム第 50 回研究報告会, 2017 年 9 月

② 登田 隆, 岡崎 雅紀, 山内 智瑛, 山田 侑亮, 河上 友基, 湯川 格史, Kinesin-5 に依存しない新規紡錘体形成経路の探索, 第 69 回日本細胞生物学会大会, 2017 年 6 月

③ 湯川 格史, 岡崎 雅紀, 山田 侑亮, 山内 智瑛, 河上 友基, 登田 隆, Assembly of the mitotic bipolar spindle in the absence of kinesin-5 Cut7, The 9th International Fission Yeast Meeting (Pombe2017), 2017 年 5 月

④ 湯川 格史, 岡崎 雅紀, 登田 隆, 新規紡錘体形成経路の探索, 日本農芸化学 2017 年度大会, 2017 年 3 月

⑤ 湯川 格史, 岡崎 雅紀, 登田 隆, 新規紡錘体形成経路の探索, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 12 月

⑥ 山田 侑亮, 湯川 格史, 登田 隆, 分裂酵母における新たな微小管アンカー制御因子の探索, 第 34 回 YEAST WORKSHOP, 2016 年 11 月

⑦ 河上 友基, 湯川 格史, 登田 隆, 分裂酵母の双極性紡錘体形成における微小管結合タンパク質の役割, 第 34 回 YEAST WORKSHOP, 2016 年 11 月

⑧ 湯川 格史, 登田 隆, Exploring the molecular mechanism of mitotic spindle assembly and chromosome segregation, International Commission on Yeasts; ICY, 2016 年 9 月

⑨ 山内 智瑛, 湯川 格史, 登田 隆, 微小管アンカーリング MWP 複合体の機能保存性解析, 酵母遺伝学フォーラム第 49 回研究報告会, 2016 年 9 月

⑩ 岡崎 雅紀, 湯川 格史, 登田 隆, 既知のキネシンに依存しない染色体分配機構の解明, 酵母遺伝学フォーラム第 49 回研究報告会, 2016 年 9 月

⑪ 湯川 格史, 岡崎 雅紀, 登田 隆, 新規紡錘体形成経路の探索, 酵母遺伝学フォーラム第 49 回研究報告会, 2016 年 9 月

〔図書〕 (計 1 件)

登田 隆, 湯川 格史, 実験医学, タンパク質脱リン酸化酵素の“えこ鼻痕”: 2A 型フォスファターゼ PP2A-B55 はセリンよりスレオニンが大好き, 36 巻 2018, 402-404

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: キネシン阻害剤、該阻害剤を含む抗癌剤およびキネシン阻害剤のスクリーニング方法

発明者: 湯川 格史, 登田 隆, 木村 賢一, 栗澤 尚瑛, 越野 広雪

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2018-87733

出願年: 2018 年

国内外の別: 国内

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
研究室ホームページ
<http://mccb.hiroshima-u.ac.jp>

広島大学健康長寿研究拠点（HiHA）
<http://hiha.hiroshima-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：登田 隆
ローマ字氏名：(TODA, takashi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。