

平成 22 年 6 月 21 日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008 年度～ 2009 年度  
 課題番号：20770162  
 研究課題名 (和文) 染色体分配制御因子セパララーゼとセキュリンによる哺乳類の細胞周期制御機構の解析  
 研究課題名 (英文) Analysis of securin and separase functions in mammalian cell cycle regulation.  
 研究代表者  
 熊田 和貴 (KUMADA KAZUKI)  
 (財) 癌研究会・癌研究所 細胞生物部・研究員  
 研究者番号：10370149

## 研究成果の概要 (和文)：

本研究では、哺乳類細胞における separase と securin 両タンパク質の詳細な機能解析を行った。その結果、これまで知られていた染色体分配制御以外に、細胞が DNA 損傷を受けた際にも separase と securin 両タンパク質が協調して機能していることを明らかにした。また、がん遺伝子としても知られている securin タンパク質の過剰発現による発がん機構において、染色体分配異常が主な原因となっていることを示唆する結果を得た。

## 研究成果の概要 (英文)：

I analyzed the detailed functions of separase and securin proteins in mammalian cell regulation, and found that both proteins cooperatively played another unknown role in DNA damage response, besides the previously well-known one in chromosome separation. I also found that the oncogenic activity of securin protein mainly resulted from the disturbance of its function in chromosome separation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：(1) 染色体分配 (2) DNA 損傷応答 (3) 細胞周期 (4) ノックアウトマウス  
(5) 発がん (6) 糖尿病

## 1. 研究開始当初の背景

染色体分配機構の研究は、分子レベルでの解析が急速に進んでいたが、これは単細胞生物である酵母を用いた遺伝学的・細胞生物学的解析と、Xenopus 卵を用いた生化学的な解

析によるところが大きかった。separase と securin の 2 つの因子は、こうした一連の研究によって、染色体分配の中心的な役割を果たしている因子として同定されたものである。

separase はプロテアーゼ活性を有しており、姉妹染色分体間の対合に必須な cohesin 複合体を切断することによって、姉妹染色分体の分離を引き起こす。また securin は separase の制御因子であり、separase に結合して、その chaperone として機能すると同時に、separase の活性を、姉妹染色分体の分離が行われる M 期後期の開始までの間、抑制している。こうしたことから、M 期後期の開始時に securin が分解されると separase が活性化して姉妹染色分体間の対合を担う cohesin 複合体を切断し、染色体分離が協調して一斉に開始されるという染色体分配機構のモデルが提唱されていた。

こうした separase と securin を中心とした染色体分配機構は種間を越えて保存されていると考えられており、実際、申請者らも研究開始の前年に separase のノックアウトマウスを用いた解析により、マウスにおいても separase が、姉妹染色分体間の、特に姉妹セントロメア間の分離に必須な機能を果たしていることを報告していた。

しかし、その一方で、これまでの研究の中心であった酵母や *Xenopus* 卵と、哺乳類の体細胞とでは、染色体分配の過程やその制御機構にいくつかの相違点が見られ、separase-securin 複合体についても、その基本的な機能は共通であったとしても、哺乳類の体細胞における染色体分配機構の詳細な理解のためには、実際に哺乳類細胞を用いた解析が欠かせないと考えられた。

また、脊椎動物の securin は PTTG (pituitary tumor transforming gene) という名前の癌遺伝子としても知られているほか、securin のノックアウトマウスは糖尿病を発症することが報告されていたが、securin の発癌や糖尿病への関与が、separase の機能ならびに染色体分配の制御を介しているのかは、明らかではなかった。

さらに、染色体分配において中心的な役割を果たす因子として同定された separase-securin 複合体が、姉妹染色分体の分離に機能するだけでなく、他の細胞周期制御にも関与していることを示唆する報告が出始めており、発癌や糖尿病といった疾患を理解する上でも、酵母や *Xenopus* 卵を用いるのではなく、実際に哺乳類の体細胞における separase-securin 複合体の機能、ならびにその制御機構を明らかにすることは重要であると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は、申請者がこれまでに携わってきた分裂酵母とマウスにおける separase と securin、両たんぱく質に関する研究結果と経験を生かし、申請者の作製した separase と securin の、それぞれのコンディショナルなノックアウトマウスを利用して、遺伝学的、組織学的、分子細胞生物学的な解析を行うことにより、哺乳類細胞中での、separase と securin 両たんぱく質を中心とした染色体分配の制御機構をより詳細に理解することを目指す。

また同時に、separase と securin が果たしている姉妹染色分体分離以外の細胞周期進行制御機能についても、その働きと制御機構を明らかにすることを目標としている。

さらに、こうした細胞レベルでの知見と、マウスの個体レベルでの解析結果を元に、細胞レベルでの細胞周期制御機構が、個体レベルでの発生・分化に与える影響や、発癌・糖尿病といった疾患との関連についても、理解を深めことを目指していた。

## 3. 研究の方法

(1) 研究開始時点までに既に作製していた separase と securin の、それぞれのコンディショナルなノックアウトマウスに由来する MEF (mouse embryonic fibroblast) 細胞を株化し、同調性の良い細胞株を樹立する。この細胞に対して、アデノウイルスを用いて、Cre recombinase を発現させることにより、それぞれの遺伝子を細胞レベルでコンディショナルに欠失させる系を適用することで、株化していない MEF 細胞を用いていたのでは難しかった同調培養下でのコンディショナルなノックアウトの実験系を確立し、separase、ならびに securin の細胞周期におけるこれまで以上により詳細な機能解析を行う。同調性がないためにこれまで事実上不可能であった、それぞれの細胞周期の時点におけるたんぱく質レベルでの生化学的な解析も試みる。

(2) コンディショナルなノックアウトの系において、ノックアウトと同時に外来性の変異たんぱく質を発現させる系も確立する。このときに得られる表現型と通常のコンディショナルなノックアウトの表現型との差を詳細に比較・解析することで、変異を入れたドメインが持っていた機能やそのドメインを介した制御機構の詳細を明らかにする。

(3)、個体レベルにおいて、時期特異的、組織特異的に cre recombinase を発現するマウスと掛け合わせることにより、それぞれのたんぱく質を時期特異的、組織特異的にノック

アウトして解析することで、組織の形成・維持と separase, securin 両タンパク質の機能との関連を調べる。さらに、他の発癌関連因子の変異マウスと掛け合わせることで、発癌との関連も解析する。

#### 4. 研究成果

(1) separase と securin の、それぞれのコンディショナルなノックアウトマウス及び、separase ヘテロ欠失のバックグラウンドで securin をコンディショナルにノックアウトできるマウスに由来する MEF (mouse embryonic fibroblast) 細胞を不死化し、細胞株としての樹立に成功した。さらにこれらの新たに樹立した細胞株を用いた同調培養系の確立を試みた。研究開始の時点で期待していた完全な同調性は得られなかったものの、大部分の細胞を同調させることができ、これらを用いた、同調培養条件下での separase、ならびに securin タンパク質のコンディショナルなノックアウトにも成功した。未だ改良の余地は残るものの、これにより、separase と securin 両タンパク質の細胞周期における機能に関して、これまで以上に詳細な解析が可能となった。

この今回新たに樹立した細胞株を使った同調培養条件下でのコンディショナルなノックアウト及び、従来までの初代培養 MEF 細胞を用いたコンディショナルなノックアウトを用いることで、separase ヘテロ欠失のバックグラウンドで securin を欠失した細胞が DNA 損傷に対して、高い感受性を示し、細胞周期の G2 期遅延が引き起こされることが明らかとなった。一方、securin を欠失しただけの MEF 細胞においてはこうした表現型は認められなかった。これらの結果から、separase と securin 両タンパク質が、哺乳類細胞において、これまで知られていた染色体分配制御以外にも、DNA 損傷応答において、協調して機能していることが強く示唆された。

近年、大腸がん細胞に由来する HCT116 細胞において securin を欠失させると UV 感受性を示すことが報告されたが、その機構は、染色体分配制御の際と同様に separase の機能を介しているのかを含めて不明なままである。本研究の結果は、こうした securin 欠失による DNA 損傷に対する感受性の増加は separase の活性制御を介している可能性が高いことを示している。これらの結果の一部は、第 67 回 日本癌学会学術総会及び、第 26 回 染色体ワークショップにおいて報告した。また、こうした separase と securin 両タンパク質による DNA 損傷応答の詳細な機構に関しては本研究終了後も、引き続き解析

を継続する予定である。本研究で確立した同調培養条件下での separase、ならびに securin タンパク質のコンディショナルなノックアウト系は、今後の解析にも有用であると考えられる。

(2) securin タンパク質の既知の機能ドメイン並びに機能未知の保存領域に変異を導入した cDNA を作製した。またこれらの変異遺伝子を用いて、培養細胞において、野生型 securin、並びに複数の変異 securin を外来性に発現させる系を確立した。

野生型の発現では顕著な変化は認められなかったが、いくつかの変異 securin タンパク質は外来性に過剰発現させると細胞の増殖を強く抑制した。このうち既知の機能ドメインに変異をもつものについて、その表現型は報告されていたドメインの機能から予想されるものと一致していたが、その表現型が現れる条件に関しては、これまでの報告とは一部に不一致が見られた。こうした不一致が現れる原因については、現在までのところ不明であるが、この機能ドメインに対する制御系への新たな知見が得られる可能性があり、さらなる解析が必要であると考えられる。

また、機能未知の保存領域に変異を導入した securin を外来性に発現させた細胞の表現型を詳細に解析することによって、染色体分配に関与する哺乳類 securin の新たな機能領域を同定することができた。この領域が細胞内で実際にどのような機構を介して染色体分配を制御しているのかについてはさらなる解析と検討が必要であるが、変異 securin タンパク質が separase に結合可能なことは確認できており、separase の活性制御を介しているものと考えている。

さらに、こうした変異 securin タンパク質のうち、過剰発現した際に染色体分配に異常が認められたものは、securin の過剰発現による NIH3T3 細胞の形質転換能に大きな影響を与えることを明らかにし、変異 securin の過剰発現時における染色体分配異常と NIH3T3 細胞の形質転換との間に強い相関があることを見出した。この結果は、これまでに報告されていた securin の過剰発現による NIH3T3 細胞の形質転換が、securin のもつ複数の機能のうち、主に染色体分配制御機構を乱すことに起因していることを強く示唆するものであり、PTTG (pituitary tumor transforming gene) という名前のがん遺伝子としても知られる securin の過剰発現によるがん化機構を考える上で、極めて重要な結果である。

これらの結果の一部は、第 68 回 日本癌学会学術総会及び、第 27 回 染色体ワークショップにおいて報告している。また、染色体の分配異常と発がんとの関連は、古くから繰り返し指摘されている一方で、その詳細に不明な点が多く、本研究における、securin の過剰発現によるがん化機構が、securin のもつ複数の機能のうち主に染色体分配制御機構の乱れを介しているという結果は、染色体の分配異常と発がんとの関連を解明する糸口になると期待している。幸い 2010 年度から 2011 年度まで「セパラゼ・セクリンによるゲノム安定性維持機構と発がんとの関連」という課題名で科学研究費・若手(B)を頂けることになっており、本研究の結果はこちらで継続・発展させる予定である。

(3) 研究開始時点までに既に作製していた separase と securin の、それぞれのコンディショナルなノックアウトマウスと、セラチン 14 のプロモーター下で Cre-recombinase を発現するマウスやインシュリンプロモーター下で Cre-recombinase を発現するマウスとのかけ合わせを行い、これらのマウスにおいて時期特異的、組織特異的に separase、ならびに securin がそれぞれノックアウトされた際の個体レベルでの表現型の解析を行った。

セラチン 14 のプロモーター下で Cre - recombinase を発現するマウスとかけあわせた場合、表皮において胎児期に遺伝子が欠失することが期待される。separase の欠失を試みた際、separase の両アリル共がコンディショナルであった場合、separase を欠失したと期待されるマウスがメンデル則に従って正常な数だけ誕生し、異常が認められなかった。しかし、解析の結果、これらのマウスでは separase がほとんど欠失していないことが明らかとなった。片アリルが野生型のコントロールのマウスでは逆にほとんどの separase コンディショナル・アリルが欠失していた。これらのことから、胎児期の表皮で separase を欠失した場合、separase を欠失した細胞は死滅・もしくは速やかに増殖を停止するものの、separase を欠失せずに生き残った一部の細胞が増殖することで結果的に正常な表皮が形成され、目立った表現型が現れないことが予想された。実際、separase 欠失の効率を上げるために予め片アリルを欠失させておき、もう片アリルのみをコンディショナルに欠失させた場合、生まれてくるマウスはメンデル則に従わず、separase を欠失したと期待されるマウスの減少が見られた。しかし、やはり生まれてきたマウスにはその後目立った異常は認められなかった。これらの結果から、残念ながらこうしたマウスにおいて、separase を欠失した細胞を特定し、

その表現型を詳細に解析することは困難であると判断するに至った。

表皮において separase を欠失させるこれ以外の方法として、tamoxifen 誘導性に核内に移行する Cre-recombinase をセラチン 14 のプロモーター下で発現させる手法がある。この手法を用いれば生育後の成体のマウスにおいて tamoxifen を与えることにより特定の短い期間に separase を欠失させることが可能となり、separase を欠失した細胞を特定し、その表現型を詳細に解析することが容易になることが期待される。現在、この新たな手法による表皮での separase と securin の機能解析を準備している。

また、インシュリンプロモーター下で Cre-recombinase を発現するマウスとかけ合わせることで膵β細胞特異的に securin を欠失させ、主に糖尿病に関する解析を行った。サンプル数が十分ではなく、予備的な結果ではあるが、随時血糖値の測定、経口ブドウ糖負荷試験、インシュリン負荷試験のいずれにおいてもこのマウスは糖尿病の傾向は示さなかった。一方、コントロールである全身の securin が欠失したマウスでは随時血糖値、及び経口ブドウ糖負荷試験に異常が認められた。従って、securin 欠失マウスが示す糖尿病の表現型は、膵β細胞以外に原因があることが示唆されるが、この結果は、securin 欠失マウスが示す糖尿病の表現型が膵β細胞の異常に起因するというこれまでの報告と矛盾するものであり、securin 機能と糖尿病の関係を明らかにする上で、今後、より詳細に解析・検討する必要があると考える。

## 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 1 件)

- ① 著者名 : Uchida KS, Takagaki K, Kumada K, Hirayama Y, Noda T, Hirota T.  
論文表題 : Kinetochores stretching inactivates the spindle assembly checkpoint.  
雑誌名 : Journal of Cell Biology.  
巻・ページ : Vol. 184 · p383-90.  
発行年 : 2009 年  
査読 : 有

[学会発表] (計 4 件)

- ① 発表者 : 熊田 和貴  
発表表題 : 変異 securin タンパク質発現による形質転換と細胞周期異常  
学会名 : 第 27 回 染色体ワークショップ  
発表年月日 : 2010 年 1 月 21 日

発表場所： 御殿場高原ホテル B. U.

②発表者：熊田 和貴

発表表題：細胞周期・DNA 損傷応答・細胞  
形質転換に対する変異 securin  
タンパク質発現の影響

学会名：第 68 回 日本癌学会学術総会

発表年月日：2009 年 10 月 1 日

発表場所： パシフィコ横浜

③発表者：熊田 和貴

発表表題：separase と securin のノック  
アウトマウスを用いた機能解  
析

学会名：第 26 回 染色体ワークショップ

発表年月日：2009 年 1 月 27 日

発表場所： ウェルサンピア姫路ゆめさき

④発表者：熊田 和貴

発表表題：哺乳類セキュリンとセパラーゼ  
は DNA 損傷後の正常な細胞周期  
進行に協調して機能する。

学会名：第 67 回 日本癌学会学術総会

発表年月日：2008 年 10 月 28 日

発表場所： 名古屋国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊田 和貴 (KUMADA KAZUKI)

(財) 癌研究会・癌研究所 細胞生物部・  
研究員

研究者番号：10370149

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：