

機関番号：72602

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770011

研究課題名 (和文) Monaphase を用いた anaphase 開始メカニズムの研究

研究課題名 (英文) Study of anaphase initiation mechanism using monaphase.

研究代表者

進藤 軌久 (SHINDO NORIHISA)

財団法人癌研究会・癌研究所実験病理部・研究員

研究者番号：00512253

研究成果の概要 (和文)：

セパレースのバイオセンサーの改良を行いより感度の高いセンサーの開発に成功した。これによりセパレースは分裂期中期の大半を厳格に抑制されており分裂後期直前に活性化することがあきらかになった。さらに、Monaphase の細胞集団としての均一性を利用して生化学的な解析を行なうことで、この分裂期中期におけるセパレースの厳格な抑制機構を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Sensor for separase activity was improved and it became sensitive enough to monitor separase activity during the metaphase to anaphase transition. I found that separase was tightly repressed much of metaphase and it was activated just prior to the onset of anaphase. As monaphase cells were synchronous, the cells were useful for biochemical analysis. Using these cells for biochemical assay, the mechanism of the tight regulation was revealed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：遺伝・ゲノム動態

キーワード：染色体、セパレース、染色体分離、コヒーシン、同期性、バイオセンサー

1. 研究開始当初の背景

染色体分離の分子背景は 1995 年頃からの 10 余年間に飛躍的に進展し、「紡錘体チェックポイント解除→セパレース活性化→コヒーシン分解→染色体分離」という基本原

理が確立するに至っている。ここで重要なのはセパレースによるコヒーシン分解であるとされており、出芽酵母を用いたエレガントな実験によりコヒーシン分解が染色体分離の開始に必要な十分であるというこ

とが示されている。コヒーシンは姉妹染色
分体の接着に中心的な役割を果たすタンパ
ク質複合体であり、このコヒーシン分解が
染色体分離の鍵を握るとするのは、きわめ
て単純明快な基本原理である。しかし、こ
の単純な基本原理は再検討する必要がある。

まず第一に、コヒーシン分解が染色体分離
の開始に必要なかつ十分であるという観察は、
上記の酵母における報告のみである。多細胞
生物ではショウジョウバエで類似の実験が
同じグループにより報告されているが同様
の結論を導くものではない。哺乳類では、非
分解型のコヒーシンを用いた実験によりコ
ヒーシン分解が染色体分離に必要なことは
明らかであるが、十分であるかは定かだ
ではない。また、染色体分離は生物一般に同
期的であるが、酵母における染色体分離の
同期性は、最初の1組の姉妹染色体分離から
2組目が分離するまでに90秒もかかるもの
であり、染色体が40本以上あるHeLa細胞
において全姉妹染色体が約30秒以内に分
離し終えることを考えると、酵母の染色体
分離は哺乳類に比べて同期性が低い。その
程度の同期性のためならセパレースのみに
依存していても十分なのかもしれないが、
より複雑で大きなゲノムを持ち、かつ非
常に同期的な染色体分離を行う多細胞生
物においてはセパレーションによるコヒー
シン分解に加えてなんらかの機構が協調
して働いていると考えられる。

2. 研究の目的

Anaphaseの開始、つまり染色体分離はセ
パレーションによるコヒーシン分解によっ
て引き起こされるとされている。しかしこ
れは主に酵母の知見をもとに考えられて
いるモデルであり、より大きなゲノムを
持つ哺乳類などの多細胞生物では検討の
余地がある。私は染色体を引く力が同
期的かつコヒーシン分解非依存的に増
大しうることを見いだした。そこで、
哺乳類細胞の染色体分離開始における
セパレーションの役割を検証し、さら
に姉妹染色体を両極から引く力が同
期的に増大することで速やかに同
期的な染色体分離が実現している
可能性を検証する。

3. 研究の方法

(1) 染色体分離の開始とセパレーション
活性化のタイミングについて

セパレーションの活性化を検出するセン
サーの開発・改良を行い、セパレーション
の活性化と染色体分離のタイミングを
比較する。

(2) “Monaphase”のメカニズムの解明
Aurora B阻害剤添加によって誘導され
るmonaphaseは阻害剤添加時から一定
時間のギャップを経て開始する。すなわ
ち直接aurora B阻害によって引き起
こされるのではなく下流のイベントが
引き金となるようである。どのような
機構で開始するのか明らかにし、通常
のanaphaseの機構との関連を調べる。

(3) 道具としてのmonaphase
Monaphase細胞は細胞集団として非
常に均一である。従って、これらの細胞
は生化学的な解析に利用できると思
えられる。均一な細胞集団を得ること
が困難なanaphaseの細胞のかわりに
monaphaseの細胞をソースとして生
化学的解析を行ない、セパレーション、
セキュリン、Cyclin B1といった染色
体分離開始前後に重要な因子について
調べる。

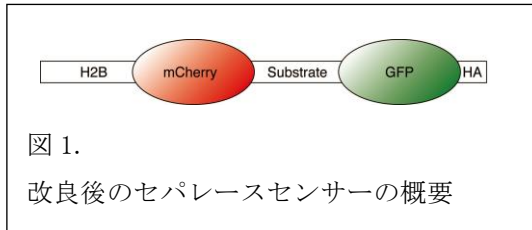
(4) 染色体を引く力の同期的な増大に関
わる因子Xの探索

Monaphaseの同期的な動きに関わる
未知の因子Xを探索する。阻害剤ライ
ブラリーやshRNAライブラリーを用
いた網羅的アプローチと候補遺伝子ア
プローチの両方向からアプローチする。
この因子Xが通常期の染色体分離の際
にも同様に染色体の動きを制御して
いるか明らかにする。

4. 研究成果

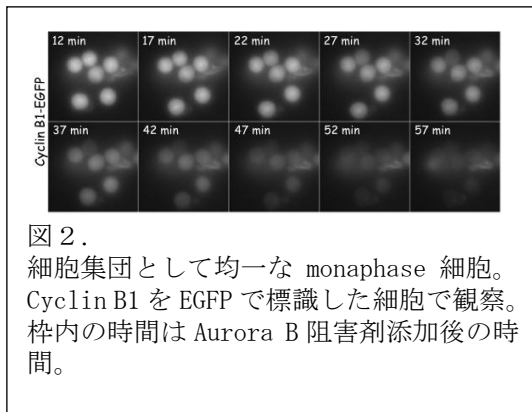
(1) セパレーション活性化タイミングの
解析
①セパレーションの活性化を検出する
バイオセンサーの改良を行い、セパレ
ーションによるコヒーシン分解のタイ
ミングをより詳細に解析できるように
した。これにより、セパレーションの
活性は染色体分離の約60秒前に急峻
に上昇することがわかり、セパレ
ーションの急峻な活性化が始まる前
は活性が厳格に抑制され

ていることも明らかにできた。



②セパレーズの活性を抑制することが知られているリン酸化部位に変異を導入した変異型セパレーズを BAC transgene を用いた mutagenesis 法により作製し、生理条件下で安定発現する細胞株を樹立した。この細胞株でさらにセパレーズの阻害因子として知られているセキュリンを RNAi 法によりノックダウンすると、セパレーズの活性がより早期から上昇し始めることも見いだした。

③ Monaphase は細胞集団として非常に同調性に優れており、生化学的解析にも有用と考えられた。



そこで monaphase 過程の細胞抽出液をゲル濾過クロマトグラフィーで分離し、セパレーズの阻害因子であるセキュリンの分解の様子を調べたところ、セパレーズと結合したセキュリンは比較的安定だが、セパレーズと結合していないセキュリンは分解されやすいことが明らかになった。これら①②③の知見はセパレーズの活性化制御機構ならびに後期開始メカニズムの理解を刷新するものである。(Shindo et al., 投稿準備中)

(2) Monaphase のメカニズムの解明
Aurora B の阻害剤のかわりに Cdk1 の阻害剤を用いても同様の同期的な染色体の移動が見られたので、monaphase の誘導には Cdk1 活

性の低下で十分であることが明らかになった。

(3) 染色体を引く力の増大に関わる因子 X の探索

網羅的アプローチと候補遺伝子アプローチの両方向からのアプローチを計画していたが、欧州の MitoCheck consortium により、染色体分離時に重要と考えられる遺伝子に関する表現型の網羅的解析が報告された (Neumann et al., 2010, Huntchins et al., 2010)。これらの知見を元に、計画の変更を行い現在候補遺伝子の絞り込みを行っている。この点に関しては、挑戦的萌芽研究課題として「ヒト細胞における染色体分離の同期性を保証するメカニズム」が本年度より採択されたので、染色体分離の同期性をもたらす因子の探索という観点で解析を進めていく。

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 2 件)

- (1) Arai D, Katsura H, Shindo N, Matsumoto M, Higashinakagawa T. Polycomb group protein Ezh1 represses Nodal and maintains the left-right axis. Dev Biol. 2010 May 15;341(2):459-63. (査読有り)

- (2) 進藤 軌久, 広田 亨
ヒストンの化学修飾: 新たな標的エピジェネティックスを目指して 臨床血液, Vol. 50, No. 4, pp. 282-288, (2009) (査読なし)

[学会発表] (計 5 件)

- (1) 進藤 軌久、広田 亨
セパレーズ活性の可視化でわかってきたこと
第 28 回染色体ワークショップ、2011 年 1 月 11 日、加賀-山代温泉 瑠璃光(石川県)
- (2) Norihisa Shindo, Toru Hirota

Visualization of Separase Activity
defines its activation timing at the
metaphase-to-anaphase transition
50th ASCB Annual Meeting, 13th Dec., 2010,
Pennsylvania Convention Center
(Philadelphia, USA)

(3) Norihisa Shindo

Mechanisms of separase regulation
Seminar at University of Pennsylvania,
10th Dec., 2010 University of
Pennsylvania (Philadelphia, USA)

(4) 進藤 軌久、広田 亨

ヒト細胞における染色体分離開始とセパレ
ース活性化のタイミング
第 27 回染色体ワークショップ、2010 年 1
月 21 日、御殿場 時之栖御殿場高原ホテル
(静岡県)

(5) 進藤 軌久、広田 亨

How chromosome segregation is triggered
in mammalian cells
第32回日本分子生物学会年会、2009年12月
10日、横浜

[その他]

ホームページ等

<http://www.jfcr.or.jp/tci/exppathol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

進藤 軌久 (SHINDO NORIHISA)
財団法人癌研究会・癌研究所実験病理部・
研究員
研究者番号：00512253

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：