

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700866

研究課題名（和文） セパラーゼ・セキュリンによるゲノム安定性維持機構と発がんとの関連

研究課題名（英文） The regulation of separase-securin in the maintenance of chromosomal stability, and its abnormality in cancer development

研究代表者

熊田 和貴（KUMADA KAZUKI）

公益財団法人がん研究会・がん研究所実験病理部・研究員

研究者番号：10370149

研究成果の概要（和文）：

染色体分配において中心的な役割を果たしているセパラーゼとセキュリンの機能解析を通して、細胞が分裂期において染色体を安定に分配維持するためにセパラーゼの自己切断が重要な役割を果たしていることを見出した。また、セキュリンの過剰発現によって引き起こされる細胞の形質転換にはこうした染色体を安定に分配維持するセキュリン機能の乱れが寄与することを示した。これらの結果から、セパラーゼとセキュリンの有する染色体を安定に分配維持する機能と発がんとの関係を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

I found that auto-cleavage of separase, a protease that is inhibited by securin, is crucial for the proper regulation of separase activity, and the timely chromosome segregation. I also showed that a disturbance of the chromosome stability plays a role in the cell transformation induced by over-expression of securin. These data demonstrate the relationship between the function of separase-securin for the stable chromosome segregation and the tumor development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：発がん

キーワード：ゲノム不安定性、染色体分配、プロテアーゼ、形質転換

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初において既に染色体分配制御においてセパラーゼとセキュリンが中心的な役割を担っていることが知られていた。セパラーゼ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、M 期後期に

における姉妹染色分体の分離を引き起こす。セキュリンはセパラーゼの制御因子であり、セパラーゼに結合してその chaperone として機能すると同時に、セパラーゼの活性を、姉妹染色分体の分離が行われる M 期後期開始までの間、抑制する (inhibitor 機能)。M 期中期において、全ての染色体が細胞の赤道面に整

列し、染色体分配の準備が整うと、プロテアソームによってセキュリンが分解され、セパララーゼが活性化し、染色体の分離が開始する。こうした機構によって全ての染色体が一斉かつ均等に娘細胞に分配されることが保証されていると考えられていた。しかし、こうした機構は主に酵母と *Xenopus* 卵を用いた解析から予想されたものであり、哺乳類細胞でのセパララーゼの同期的な活性化機構やセキュリンの役割などにはまだ不明な点が多く残っていた。

また、脊椎動物のセキュリンは PTTG (pituitary tumor transforming gene) という名前のがん遺伝子としても知られており、thyroid carcinoma において侵襲性のマーカーとなるほか、多くの pituitary adenoma において過剰発現していることが報告されていた。しかし、セキュリンの過剰発現が発がんを引き起こす機構の詳細は不明なままであった。

2. 研究の目的

本研究では、これまで申請者が携わってきたセパララーゼとセキュリンの機能解析の経験と知識を生かし、ゲノムの不安定性と発がんとの関連の詳細を解明することを目標にしていた。セパララーゼとセキュリンの機能解析を通して、染色体を安定に分配し、ゲノムの安定性を維持する機構を明らかにすることで、これらと発がんとの関係の詳細を明らかにする。特に、がん遺伝子としても知られるセキュリンの過剰発現による発がん機構について、染色体分配異常やゲノムの不安定性がどのように関与しているのかを明らかにすることを目指していた。

3. 研究の方法

(1) セキュリンの過剰発現による NIH3T3 細胞の transform の過程の詳細な解析を行う。セキュリンを過剰発現した細胞が全て transform するわけではなく、実際にがん化する細胞はその一部であることから、単にセキュリンを過剰発現しただけの細胞と、実際に transform した細胞を比較することで、がん化の過程に何が起きているかを明らかにする。こうした解析に、これまで染色体分配・細胞周期制御機構の解析に用いてきた手法がうまく適応できるのかを検討し、必要があればその改良に取り組む。

(2) 各種変異セキュリンの網羅的な作製と、その過剰発現時の表現型やタンパク質の挙動を解析する。これにより、哺乳類セキュリンの各種機能に必要な領域を同定する。さらに、これらの変異セキュリンを NIH3T3 細胞に発現させ、その transform 能について検討

することで、セキュリンによる発がん過程がセキュリンの持つどの機能に基づいたものなのかを明らかにする。

(3) セキュリンによる発がん過程には、セキュリンが制御していることが知られているセパララーゼの機能が関与している可能性が高い。このため、セキュリンとセパララーゼの機能解析を通して、セキュリンによる発がん過程を明らかにする。特に、セキュリンによる発がん過程が、セパララーゼのプロテアーゼとしての活性を制御することに依存しているのかどうかを明らかにするため、プロテアーゼ活性欠損型のセパララーゼ変異を作製し、その解析を行う。

4. 研究成果

(1) セキュリンの過剰発現によって NIH3T3 細胞が transform し、足場非依存的な増殖を行うようになる過程を詳しく解析した。Soft agar 上でセキュリンを過剰発現させた NIH3T3 細胞とコントロールとして過剰発現させていない細胞を増殖させると、どちらの細胞も数回の細胞分裂を行い、3 日後には数個から十数個の細胞からなるマイクロコロニーを形成した。この状態でどちらの細胞も一旦増殖を停止した。7 から 10 日程度で多くのコントロールの細胞は死に始めるのに対して、セキュリンを過剰発現した細胞からなるマイクロコロニーは死ぬタイミングが遅れ、一部が増殖を再開するのが観察された。従って、セキュリンを過剰発現した細胞では見かけ上増殖が停止した様にみえる期間に何らかの環境への“適応”が行われていることが示唆された。

次に、この“適応”の間に細胞に起こっている変化について調べるために、セキュリンの過剰発現後 Soft agar 上での足場非依存的増殖能を獲得した細胞と単にセキュリンを過剰発現しただけの細胞の核型を比較した。セキュリンを過剰発現した細胞ではそれだけで異数性がやや増加していたが、Soft agar 上での足場非依存的増殖能を獲得した後では、それぞれのコロニーごとに特定の異数体細胞が増加している傾向が見られた。これらのデータからセキュリンの過剰発現によって染色体の不安定性が増加することで、細胞の多様化が促進され、“適応”の間に特定の細胞が選択されていることが示唆された。

(2) セキュリンの機能ドメインを同定するために各種変異セキュリンを作製した。まず、染色体分配時におけるセキュリンの分解に必要なモチーフ (D-box)、分裂後期から G1 期における分解に必要なモチーフ (KEN-box)、DNA 損傷応答時の分解に機能するとされてい

るモチーフにそれぞれ変異を入れた。また、機能は未知だが種間を超えたアミノ酸配列の保存性が比較的高い領域に対しても変異を作製した。さらに、これらを組み合わせた多重変異セキュリンも作製した。

作製した各種変異タンパク質を HeLa 細胞に過剰発現させてその表現型の解析を行った。G1 期におけるセキュリンの分解に必要な KEN-box モチーフおよび DNA 損傷応答時の分解に必要な D-box モチーフに変異を導入したセパラゼを過剰発現しても、DNA 損傷に対する応答を含め、顕著な表現型を見出すことはできなかった。一方、染色体分配に際しての分解に必要な D-box モチーフに変異を導入したセキュリンを過剰発現すると、その機能から期待される通り、細胞の多倍体化や染色体の安定性の低下が観察され、細胞の増殖能が低下した。

また、高等生物間でアミノ酸配列が保存されている領域に変異を導入したもののうち、タンパク質の中央付近に存在する機能未知の領域に 3 アミノ酸の欠失変異 (Δ FES) を導入したところ、先に述べた染色体分配時の分解に必要な D-box モチーフに変異を導入した際ほどではないが、顕著な細胞の多倍体化や染色体の安定性の低下、細胞の増殖能の低下が観察された。これらの解析から、これまで機能未知であったセキュリン中央付近の保存領域は染色体の安定な分離・分配に機能し、ゲノムの安定性の維持に寄与していることが明らかになった。また、この領域が分裂期のセキュリンの安定性の制御を介してこれらの機能を果たしていることが示唆された。

さらに、作製した各種変異セキュリンとセパラゼとの結合について免疫沈降法を用いて解析した。その結果、今回作製した全ての変異セキュリンがセパラゼと結合し、セパラゼ非結合変異は得られなかった。従って、セキュリンは比較的保存性の低い領域でセパラゼに結合しているか、または複数の領域で同時に結合している可能性がある。もしくは、今回作製した変異や欠失ではセキュリンのセパラゼ結合能を顕著に失わせるには不十分で、より大きな欠失を導入する必要があるのかもしれない。

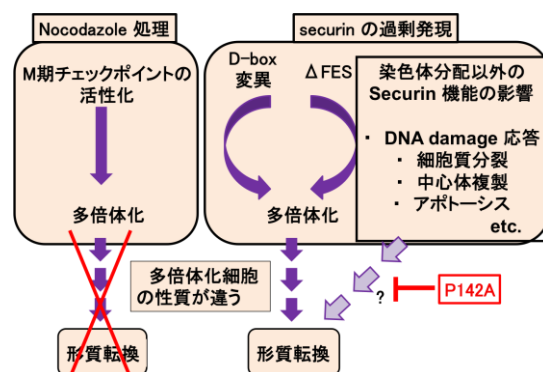
一方で、変異セキュリンがセパラゼに結合していることから、今回、過剰発現によって染色体の分離・分配やゲノムの安定性に異常が生じた複数の変異の表現型は、姉妹染色分体間の対合を切断するプロテアーゼであるセパラゼの機能を介していることが強く示唆された。

次に、作製した各種変異タンパク質を NIH3T3 細胞に過剰発現させて、NIH3T3 細胞

に対する変異タンパク質の transform 能について検討した。Soft agar 上に各種変異セキュリンを過剰発現させた細胞をまき、足場非依存的な増殖能を獲得した細胞の出現を調べた。染色体分配時のセキュリンの分解に必要な D-box モチーフに変異を導入したものとセキュリンのタンパク質中央付近の保存領域に欠失変異 (Δ FES) を導入したものにおいて高い transform 能が観察された。この高い transform 能を示した変異群と先に述べた過剰発現によって染色体の分離・分配に異常を示す変異群とが完全に一致することから、セキュリンタンパク質を過剰発現した際にみられる細胞の形質転換は、染色体の分離・分配異常による細胞の多倍体化、ゲノムの不安定性の増加を介している可能性が高いと考えられた。

一方で、薬剤処理によって、セキュリンの過剰発現によらず、NIH3T3 細胞の染色体の分離・分配異常を誘導した場合、この細胞の Soft agar 上での足場非依存的な増殖能を調べたところ、transform 能の顕著な上昇は観察されなかった。この結果は、セキュリンの過剰発現によって生じた多倍体細胞と薬剤処理によって生じた多倍体細胞の性質が、細胞の transform 能の有無において異なっていることを示しており、セキュリンの過剰発現は染色体の分離・分配異常以外の現時点では良く分かっていない機構によっても発がんに寄与していることが明らかになった。

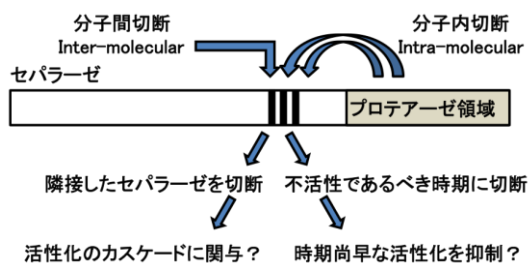
この未知の機構を同定するために、タンパク質中央付近の保存領域に欠失変異を導入した変異セパラゼにさらに変異を導入することで、この変異セパラゼの transform 能を低下させる変異の同定に成功した。この新たな変異 (P142A) によって元の欠失変異の過剰発現でみられた染色体の分離・分配異常は相補されなかった。従って、この変異は、セキュリンの染色体の分離・分配機能には影響せず、セキュリン過剰発現における細胞の形質転換に影響を与えている未知の機能に異常が生じていると考えられる (下図参照)。



セパラゼは染色体分配制御を始め、近年、細胞質分裂制御、中心体複製制御、DNA 損傷修復など多くの細胞周期制御に関わることが報告されており、その多くは発がんに密接に関わり得る。この今回新たに同定したセキュリンの過剰発現による細胞の形質転換に対して抑制的に働く変異 (P142A) の機能をより詳しく調べることにより、セキュリンによる発がん機構の理解が深まると同時に、発がんの予防や治療に貢献すると思われる。

(3) セパラゼとセキュリンによる染色体分配制御機構と発がんとの関連を解明するために、セパラゼとセキュリンの機能解析を行った。まず、セパラゼの有するプロテアーゼ活性の影響を調べるために、プロテアーゼ活性欠損型のセパラゼ変異を作製した。プロテアーゼ活性欠損型変異セパラゼの生理学的な発現量を得るために BAC mutagenesis の系を用いて変異を作製し、変異セパラゼ発現細胞株を樹立した。さらに、この変異セパラゼ発現細胞において内在性のセパラゼのみを RNAi によってノックダウンすることで、内在性の野生型セパラゼを外来性の変異セパラゼに完全に置換する系を確立した。

これまでセパラゼが活性化に際して自己切断することは知られていたが、この自己切断はセパラゼの活性には影響を与えないと考えられてきた。この今回確立した実験系を用いて解析を行うことで、従来は同一視されていたセパラゼの自己切断には、セパラゼの分子間での切断と同一分子内での切断の2種類が存在することを明らかにした。さらに、この発見に触発され、改めてセパラゼの既知の3カ所の自己切断の性質を調べ直したところ、これらの自己切断部位は従来考えられてきたような同一の性質を有するものではなく、細胞周期における切断の時期も異なっており、それぞれが異なった制御を受けていることが明らかになった。従ってこれらの自己切断部位はそれぞれ異なった機能を有している可能性が高い (下図参照)。



これらの自己切断の意義を調べるためにそれぞれの自己切断部位の変異を作製した。ここでも生理学的な発現量を得るために BAC

mutagenesis の系を用いて変異セパラゼ発現細胞株を樹立した。さらに内在性のセパラゼと置換してその機能を解析したところ、これらの自己切断がセパラゼの活性化や染色体分配のタイミングを制御することを示唆するデータを得た。また、セパラゼの制御因子であるセキュリンの結合がこれらの切断のパターンを変化させることも明らかになった。

これらの解析から従来セパラゼの活性制御に大きな寄与はないと見なされてきた自己切断の染色体分配制御における重要性が明らかになった。この発見はセキュリンによるセパラゼの活性制御や発がん機構の理解に大きく貢献すると考える。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

①発表者: 熊田 和貴

発表表題: 変異 securin タンパク質を発現することによる染色体不安定性と細胞の形質転換

学会名: 第 69 回 日本癌学会学術総会

発表年月日: 2010 年 9 月 24 日

発表場所: 大阪国際会議場

②発表者: 熊田 和貴

発表表題: 変異 securin タンパク質発現による染色体分配異常と細胞形質転換

学会名: 第 28 回 染色体ワークショップ

発表年月日: 2011 年 1 月 29 日

発表場所: 山代温泉 瑠璃光 (石川)

③発表者: 熊田 和貴

発表表題: Separase の自己切断による染色体分配制御

学会名: 第 29 回 染色体ワークショップ

発表年月日: 2012 年 1 月 27 日

発表場所: 秋保温泉 ホテルニュー水戸屋 (宮城)

[図書] (計 1 件)

①著者名: Kazuki Kumada, Toru Hirota.

出版社名: Elsevier

書名: Separase, Handbook of Proteolytic Enzymes, Third edition.

発行年: 2013 年予定

ページ数: 印刷準備中のため不明

[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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

熊田 和貴 (KUMADA KAZUKI)
公益財団法人がん研究会・がん研究所 実
験病理部・研究員
研究者番号：10370149

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし