

## 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25年6月10日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22770200

研究課題名（和文） 動原体のストレッチングによって促進されるM期チェックポイントの解除機構

研究課題名（英文） Mechanisms of the spindle assembly checkpoint silencing by kinetochore stretching

研究代表者

内田 和彦（UCHIDA KAZUHIKO）

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：40380555

研究成果の概要（和文）：動原体ストレッチング（動原体と紡錘体微小管とが結合しているとき動原体が伸長や収縮を繰り返す現象）は2極化が確立した後、紡錘体チェックポイントの解除を促進することが知られている。このとき染色体が両極に引かれる力、すなわち張力が姉妹動原体に加えられているが、この張力もチェックポイントの解除に関与すると考えられている。私はストレッチングに依存した紡錘体チェックポイント解除機構は張力に依存する解除機構とは別物であることを証明した。

研究成果の概要（英文）： Kinetochore stretching, repetitive cycles of kinetochore extension and recoiling, inactivates the spindle assembly checkpoint after biorientation. At the same time, tension is applied across sister kinetochores by intact pulling force. It is thought that this tension also inactivates the checkpoint. In this study, I demonstrated that kinetochore stretching-dependent checkpoint silencing is independent from tension-dependent checkpoint silencing.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：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：細胞周期、紡錘体チェックポイント

### 1. 研究開始当初の背景

「紡錘体形成チェックポイント機構」は、正確な姉妹染色分体の分離、つまり分裂後期へ移行してよいかどうかを監視する機構であり、遺伝情報を正確に継承するために必須の役割を担っている。この機構の中心的なチェックポイント因子である Mad2 が、微小管と未結合の動原体に集積して活性化され、その活性化された Mad2 が、後期促進因子(APC/C)

の活性化を阻害することによって分裂後期への進行を阻害することが分かっている。つまり、本チェックポイントは微小管結合が完成するまで、後期待機信号を発信する機構である。

一方で、紡錘体が動原体に結合しているも、紡錘体によって染色体が両極に引かれる力、すなわち「張力」が姉妹動原体に加えてセントロメアが伸張しないと、紡錘体チ

チェックポイント機構が活性化し、分裂の進行が阻害されることが知られている。微小管阻害薬処理によってセントロメアの伸長を抑え(つまり張力の発生を抑え)ると、Mad2の集積はないにもかかわらず、チェックポイント蛋白質 Bub1、BubR1、RZZ 複合体が動原体に蓄積する。このことは、張力不足のみで本チェックポイントが働きうることを示唆する。ところが実際は、張力が不足すると動原体と微小管との結合が脆弱化する特性があることから、張力不足経路が独立して存在するかどうかを明確にできていない。加えて、人工的に動原体を染色体から除くことで張力が発生し得ない細胞を作成できるが、それにもかかわらずこれらの細胞では分裂後期が起こる。これらのことは、張力とチェックポイント機構との関連性を根本的に見直す必要があると考えられた。

私は哺乳類培養細胞において、動原体にかかった力を、従来のようにセントロメアの伸張で間接的に検出するのではなく、動原体自体の伸長をより「直接」検出することを試みた。その細胞を解析した結果、分裂中期において常時約15%の動原体が微小管によって伸長していることがわかった。次いで生細胞の観察によって「動原体はダイナミックな構造体であり、一過的に伸張と収縮を繰り返す」ことを見出し、この現象を“動原体ストレッチング”と名付けた。

次に“動原体ストレッチング”の生理学的意義を明らかにするために、微小管動態作動薬の処理によって微小管の動態を抑えることで、あるいはコンデンシンのノックダウンによって(セントロメアを脆弱化することによって)、動原体間セントロメアは伸長したままで動原体ストレッチングのみが抑制される状況を作った。するとこの状況下では、分裂の進行が遅れ、加えてAPC/Cの活性が抑えられた。このことから、“動原体ストレッチング”は紡錘体チェックポイントの解除を促進することが示唆された。この発見は、これまでの概念を覆し、紡錘体チェックポイントをoffにするためには、セントロメアの伸張のみでは不十分であり、“動原体ストレッチング”が必要であることを意味していた。

## 2. 研究の目的

これまでの研究から、動原体はストレッチングする極めて動的な構造体であること、動原体のストレッチングが紡錘体チェックポイントの解除を促進することが明らかとなった。続く本研究では、動原体ストレッチングによるチェックポイント解除機構を検討する。そのために動原体ストレッチングは、

動原体やセントロメアが受けた張力によって生じるのかを明確にする。もしも異なるのならばその発生機構や調節機構を調べて張力とは別の機構でストレッチングが発生していることを明確にする。

次にストレッチングの発生を抑えたときに、なぜチェックポイントが解除されないのかを調べる。

## 3. 研究の方法

(1) まずストレッチングは動原体やセントロメアが受けた張力によって発生するのかを解析した。そのために細胞を単極の紡錘体にして染色体が両側から引かれられないようにして動原体ストレッチングについて解析した。しかし、この単極の細胞ではセントロメアは張力を受けないが、動原体は張力を受けている可能性が残っている。なぜなら極から伸びて染色体腕部に達した微小管により押す力が生じるので、染色体腕部を押す力と動原体を引く力によって動原体に「張力」が加えられうるからである。そこで染色体腕部を押す力に関わるKidという分子をノックダウンする、または染色体腕部を欠いた人工染色体を使用して動原体ストレッチングについて解析した(人工染色体を細胞内に導入する作業はかずさDNA研究所の榊本寛博士に依頼した)。

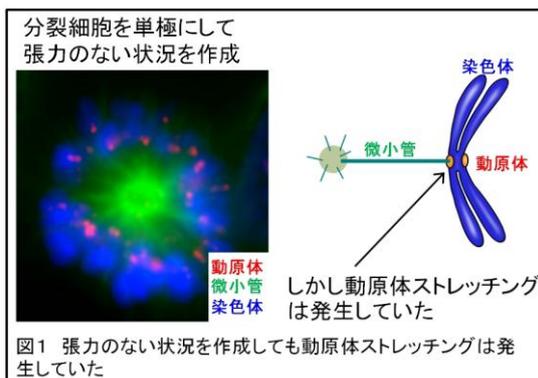
(2) 次に動原体ストレッチングを発生させるしくみを調べた。まず電子顕微鏡で微小管と動原体の形態を観察した(観察は米国、Wadsworth centerのChristopher O'Connell博士とAlexey Khodjakov博士に依頼した)。この観察から微小管と動原体が結合し、そして微小管の伸び縮みによって生じた力が動原体に伝わり、動原体が変形することが動原体ストレッチングの発生に重要ではないかと考えられた。もしも仮説の通り、微小管の動態が関与するのならば、動原体と微小管との結合が安定すると、動原体は微小管の動態をより強く受けるようになり、それによりストレッチングの発生が促進されることが予想される。そこで、細胞を低濃度のAurora Bキナーゼの阻害剤で処理することで結合を安定化させ、ストレッチングについて解析した。(Aurora Bは結合をある一定の割合ではずしているため、その働きを阻害すると結合が安定化する。)この解析結果を補強する目的で、Aurora Bによってリン酸化されると動原体と微小管との結合を弱める分子であるNdc80のリン酸化、この分子の非リン酸化変異蛋白を細胞内で発現させ(発現ベクターは

米国、コロラド州立大学の Jennifer G. DeLuca 博士からいただいた)、それによって動原体と微小管の結合を人工的に強くした細胞を使用して動原体ストレッチングについて解析した。

上述の実験は人工的に Aurora B の活性または Aurora B の基質のリン酸化状態を変えたものであるが、これが自然条件でも起こりえるのではないかと考え、mCherry-AuroraB と EGFP-CENP-A(動原体マーカーとして使用)を発現する細胞を作成して、姉妹動原体の間に分布する Aurora B のダイナミクスを観察した。その結果 Aurora B は動原体感を揺れ動いていたので免疫染色やライブセルイメージングを行って Aurora B の位置と動原体ストレッチング発生との関連について調べた。また Ndc80 のリン酸化と Aurora B の位置との関連についても免疫染色 (Ndc80 のリン酸化抗体は DeLuca 博士からいただいた) で調べた。加えて Aurora B がセントロメアに分布することが動原体ストレッチングの発生に重要であるのかを調べるために、Aurora B のセントロメア局在に必要な haspin という蛋白、これに対する阻害剤で細胞を処理して動原体ストレッチングについて解析した。

#### 4. 研究成果

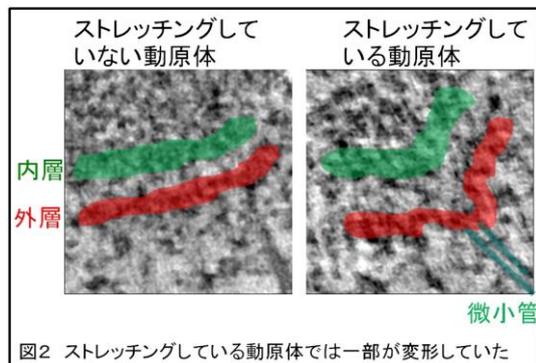
(1) 以前の研究で、2極化が確立した後、動原体ストレッチングは紡錘体チェックポイントの解除を促進することを示した。このとき、セントロメアや動原体は、両極方向に引かれる力によって張力を受けている。この張力は紡錘体チェックポイントの解除に関与する可能性が考えられてきたが、もしも動原体ストレッチングの発生に張力が関与するのならば張力はチェックポイントの解除に関わるといえる。そこでこの可能性を検討したが、セントロメアや動原体に加えられる張力を除いても動原体ストレッチングは発生していた(図1) (ただし微小管が結合している動原体でのみストレッチングは発生していた)。このことから、動原体が受ける張力はストレッチ



ングの発生に必要なではないということが示された。

#### (2)

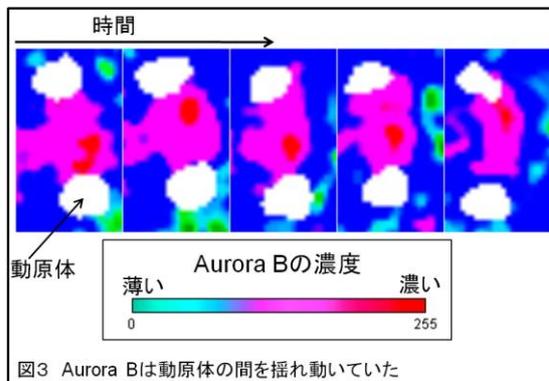
①張力が動原体ストレッチングの発生に関与しないのならばストレッチングはどのようにして発生しているのか。これを明らかにするために、まず電子顕微鏡でストレッチングしている動原体を観察したところ、動原体の一部が波打つように変形していることが分かった(図2)。このことから、以下の仮説を考えた。まず動原体と微小管が結合する。次に結合した微小管が重合や脱重合をおこなうことで微小管の伸長や収縮が生じるが、そのとき生じた力が動原体に伝わる。そしてその力によって動原体は変形し、動原体ストレッチングが発生するというものである。



この仮説を検証するために次のような実験を行った。セントロメアに分布する Aurora B は動原体にある Ndc80 (動原体と微小管との連結に関わる動原体蛋白) をリン酸化することによって動原体と微小管との結合を不安定化させることが知られている。そこで Aurora B の阻害剤の添加や、非リン酸化型の Ndc80 を発現させたりすることで、動原体と微小管との結合を安定化させた。もしも仮説が正しいのならば、この操作により微小管の伸長や収縮によって生じた力がより強く動原体に伝わるようになり、そして動原体ストレッチングはより発生しやすくなると考えられる。実際、この条件にするとストレッチングの発生頻度が増加した。

②上述の実験は人為的に動原体と微小管との結合を安定化させた場合の結果であるが、このような結合の安定化は自然な条件でも生じるのかもしれない。すなわち姉妹動原体間に分布している Aurora B はダイナミックに局在を変えること、そして Aurora B が動原体から離れたとき基質である Ndc80 のリン酸化が弱まって結合が安定化すること、が考えられた。またそれによって微小管から動原体に伝わる力が大きくなり、動原体ストレッチングが発生しやすくなると思われた。

この仮説を検証した結果、Aurora Bは動原体間を頻繁に揺れ動いていることを発見した(図3)。そしてAurora Bから遠く離れた動原体では、近い場合と比べてNdc80のリン酸化レベルが低下し、そして動原体ストレッチングの発生頻度が増加していることが示された。また薬剤処理によってAurora B



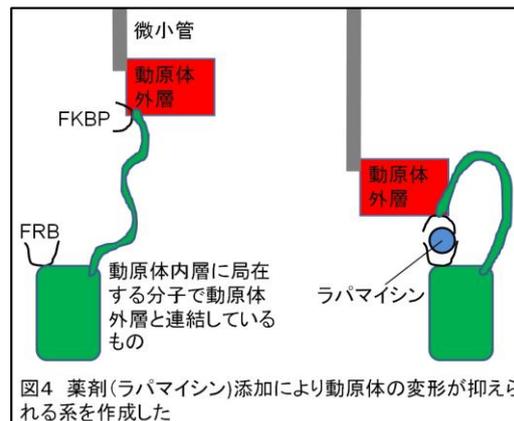
をセントロメアに分布できなくさせると動原体ストレッチングの頻度は減少していたことから、動原体ストレッチングの発生にはセントロメアにAurora Bが分布し、なおかつそれが揺れ動いて動原体から離れることによって、動原体と微小管との結合がより安定化することが重要であることを示している。

これまでAurora Bは姉妹動原体の間を動かずにいると考えられてきたが、本研究により、Aurora Bはダイナミックに揺れ動いていることを明らかにした。分裂中期、染色体は両極間を振り子のように移動したり、セントロメアを伸ばしたり縮めたりしているが、もしかするとこれら動きもAurora Bの揺れ動き運動が関与しているのかもしれない。

これまでセントロメアや動原体が受ける張力と関連したチェックポイント機構というのが議論されてきた。一方、動原体のストレッチングは紡錘体チェックポイント機構と関連があることが示されている。研究結果(1)と(2)から、動原体ストレッチングは張力を反映しておらず、また張力とは別の機構で発生していたことが明らかとなった。このことは「動原体ストレッチングに依存した紡錘体チェックポイント解除機構」は「張力に依存したチェックポイント解除機構」とは異なる新奇な機構であると考えられる。

(3) また動原体ストレッチングに依存した紡錘体チェックポイント解除機構を明らかにするために、薬剤を添加すると動原体ストレッチングがある程度抑えられる系を作成した(図4)。この系は動原体の変形に関与すると予想される分子を加工することでできている。そしてこの系を作成できたことにより、

微小管に影響を与えず(動原体と微小管との



結合がなくなるのでチェックポイントが活性化しているという可能性を除外できる)に動原体ストレッチングを制御できるようになった。

この系を用いて動原体ストレッチングを抑えたところ、分裂後期への移行が遅れた。この結果は以前、微小管動態作動薬を加えて動原体ストレッチングを抑えたときの結果と一致する。さらにこの系を使用することで、動原体ストレッチングがチェックポイント分子の合成阻害にはたらくのか、それとも分解にはたらくのか、またはチェックポイント分子とは関係なく、直接後期開始を促すのかを明らかにすることが可能になった。

## 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)

Go Itoh, Shin-ichiro Kanno, Kazuhiko SK Uchida, Shuhei Chiba, Shiro Sugino, Kana Watanabe, Kensaku Mizuno, Akira Yasui, Toru Hirota and Kozo Tanaka, CAMP (C13orf8, ZNF828) is a novel regulator of kinetochore-microtubule attachment, The EMBO Journal、査読有、30巻、2011、130-144

[学会発表] (計1件)

内田和彦、広田亨、Does the spindle assembly checkpoint monitor the presence of tension?、分子生物学会第34回年会、2011年12月16日、パシフィコ横浜(神奈川県)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

内田 和彦 (UCHIDA KAZUHIKO)

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：40380555

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし