

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20630

研究課題名（和文）染色体分配に必須な分裂期型キネトコア形成の分子基盤

研究課題名（英文）The molecular mechanisms of the kinetochore assembly during mitosis

研究代表者

竹之下 憂祐（Takenoshita, Yusuke）

大阪大学・大学院生命機能研究科・特任研究員（常勤）

研究者番号：40962965

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：細胞が分裂するときに遺伝情報を次世代に正確に伝えるためには、正確に染色体を分配する必要がある。本研究では、染色体分配に重要なタンパク質複合体であるキネトコアに着目し、その形成機構を明らかにすることで、正確な染色体分配の分子メカニズムの一端を明らかにした。具体的には、キネトコアの構成因子であるCENP-Tと、染色体分配時にのみCENP-Tに結合するMis12Cとの結合が、どのようにして制御されているのかを構造生物学的解析・細胞生物学的解析を組み合わせで調べた。これらの結合は、タンパク質のリン酸化により二重に制御されており、そのことによって、染色体分配の頑強性が保たれていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞分裂の際には染色体を等しく分配する必要があり、染色体分配のエラーにより染色体の数や構造に異常が生じると胎生致死や細胞のがん化などが引き起こされる。このことから、染色体分配の分子機構を理解することは、医学・生物学の重要な課題であるといえる。本研究では、染色体分配に重要なタンパク質複合体キネトコアがどのように形成されるのかを明らかにすることで、遺伝情報が次世代に正確に伝える分子メカニズムについて重要な知見を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：During cell division, it is crucial to accurately separate chromosomes to transmit the genetic information to the progeny. This study focuses on the kinetochore, a large protein complex essential for chromosome segregation, and elucidates its assembly mechanism to shed light on the molecular mechanisms underlying accurate chromosome segregation. Specifically, we investigated how the interaction between CENP-T, a component of the kinetochore, and Mis12C, which binds to CENP-T only during chromosome segregation, is regulated. Using a combination of structural biology and cell biology analyses, we found that these interactions are doubly regulated by protein phosphorylation, thereby maintaining the robustness of chromosome segregation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：染色体分配 キネトコア セントロメア

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

多細胞生物をつくる個々の細胞は生物種ごとに決まった数の染色体をもつ。このためには、胚発生時や成体でおこる細胞分裂の際に染色体を等しく分配する必要がある。染色体分配のエラーにより染色体の数や構造に異常が生じると、胎生致死や細胞のがん化などが引き起こされる。つまり、正確な染色体分配の分子機構を理解することは、医学・生物学の重要な課題のひとつである。

細胞分裂期に染色体を等しく分配するためには、染色体と紡錘体微小管とを正しくつなぐ必要がある。キネトコアは、この役割を担う超分子複合体であり、染色体のセントロメア領域上につくられ、分裂期に紡錘体微小管と結合する(図1)。キネトコアは、この役割を遂行するために、細胞周期の進行に伴って機能に適した形に構造を変える。実際に、紡錘体微小管と結合する分裂期のキネトコアは、間期のキネトコア(図2左)を形成するCENP-TとCENP-Cそれぞれが独立して、KMNと呼ばれる紡錘体微小管と結合するタンパク質複合体と結合することで形づくられる(図2右)。しかし、細胞内においてこの構造変化がどのように制御されているのかは完全には理解されていなかった。

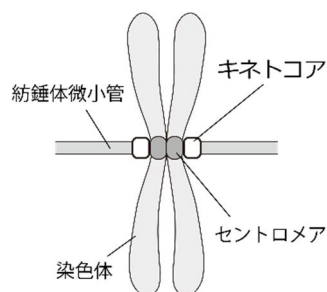


図1. 分裂期染色体とキネトコア

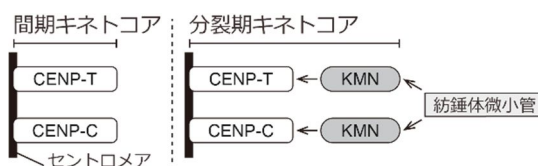


図2. 細胞周期の進行に伴うキネトコアの構造変化

分裂期キネトコアへのKMNのリクルートは、CENP-TとCENP-Cのそれぞれが形成する独立な経路でおこなわれる(CENP-T経路・CENP-C経路)。このように、細胞内においてはKMNがCENP-TとCENP-Cの両方に結合することから、単純な機能破壊実験によってCENP-TとKMNとの結合、CENP-CとKMNとの結合を正しく評価することが困難であった。そのため、これまでの研究においては、組み換えタンパク質を用いた *in vitro* での結合実験で、KMNとCENP-TあるいはCENP-Cとの結合機構について解析されており、細胞内におけるCENP-TとKMNとの結合、CENP-CとKMNとの結合それぞれの制御機構の解明には至っていなかった。

### 2. 研究の目的

研究代表者の所属研究室では、ニワトリ DT40 細胞を用いた研究により、染色体分配のためにはCENP-T経路が必須でありCENP-CとKMNが結合しなくても染色体分配がおこることを示した(Hara et al., Nature Cell Biol., 2018)。そこで本研究では、染色体分配において主要な役割を担うCENP-TとKMNとの結合の制御機構を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

KMNは、KNL1複合体(Knl1C)・Mis12複合体(Mis12C)・Ndc80複合体(Ndc80C)で構成され、図3に示すようにCENP-Tに結合する。CENP-TのN末端側(NBD)にNdc80Cが、CENP-TのMBDと呼ぶ領域にMis12Cが結合し、さらにMis12CにはKnl1CとNdc80Cが集まる。CENP-TとMis12Cに結合した計2コピーのNdc80Cが紡錘体微小管と結合することで、染色体と紡錘体微小管との結合が確立される。CENP-TとNdc80Cとの直接の結合に関しては、研究代表者は *in vitro* の実験での先行研究を参考におこなった、細胞内での解析においてすでにその制御機構を明らかにした(Takenoshita et al., Nature Commun., 2022)ため、本研究では、CENP-TとMis12Cとの結合の制御機構を解析した。

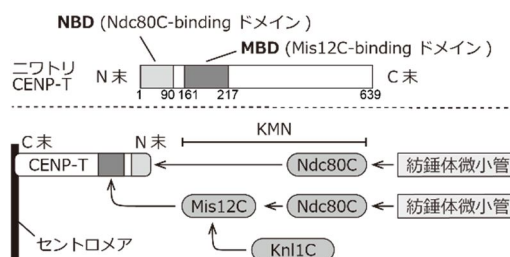


図3. 分裂期でのCENP-TによるKMNのリクルート

これまでに、CENP-TとMis12Cとの結合の制御機構が明らかになっていない原因はキネトコアの構造の複雑さにあった。すなわち、細胞内においては、KMNがCENP-TのみならずCENP-Cにも結合するため、単純な機能破壊実験によってCENP-TとKMNとの結合を正しく評価することが困難であった。そこで研究代表者は、CENP-Cの影響を排除することでCENP-TとKMNとの結合を細胞内で正確に評価することのできる細胞を樹立した(Takenoshita et al., Nature Commun., 2022)。この細胞では、CENP-CとKMNとの結合を欠損させており、KMNはCENP-Tのみに結合する(以下、CENP-T経路細胞)。本研究では、この実験系を活用し、以下の1)-3)の方法で細胞内におけるCENP-TとMis12Cとの結合の制御機構を解析した。

### 1) CENP-T と Mis12C との複合体の構造解析

CENP-T と Mis12C との結合の詳細を知るために、CENP-T と Mis12C との複合体の構造情報を調べた。実際には、まず、細胞周期の分裂期に同調させた細胞から CENP-T と Mis12C との複合体を精製し、クライオ電子顕微鏡での構造解析を試みた。並行して、AlphaFold2 による CENP-T と Mis12C 複合体との構造予測をおこない、CENP-T と Mis12C との結合に重要な結合界面の同定をおこなった。

### 2) 分裂期特異的なリン酸化による CENP-T と Mis12C との結合の制御機構

細胞分裂期には様々なリン酸化酵素が活性化しており、キネトコアの構成因子もリン酸化修飾を受けることが知られている。この細胞分裂期特異的なリン酸化が、CENP-T と Mis12C との結合を促進する可能性を検証した。本研究では、CENP-T の Mis12C 結合部位のリン酸化サイトを探索した。分裂期に同調した細胞から、免疫沈降により CENP-T を分取し、質量分析でリン酸化サイトを同定した。

### 3) CENP-T と Mis12C との結合の制御機構の全体像の解明

1)・2) で得られた知見を統合して、CENP-T と Mis12C との結合の制御機構の全体像を調べた。まず、1) で同定した結合界面が実際に細胞内で CENP-T と Mis12C との結合に関与するかを、CENP-T 経路細胞に結合に重要と予測されるアミノ酸に変異をいれた CENP-T 変異体を発現させ調べた。また、2) で同定したリン酸化サイトについても同様の解析をおこなった。さらに、先行研究で同定されていた、Mis12C の構成因子 Dsn1 のリン酸化サイトにおいても変異を導入し、CENP-T と Mis12C との結合への関与を調べた。

## 4. 研究成果

### 1) CENP-T と Mis12C との複合体の構造解析

まず、DT40 細胞の内在性の CENP-T に 3xFLAG タグを、Mis12C の構成因子 Dsn1 に spot タグを付加し、分裂期に同調した細胞から、抗 FLAG 抗体と抗 spot 抗体を用いた免疫沈降を続けて行うことで、高純度の CENP-T-Mis12C 複合体を精製することに成功した。しかし、得られたタンパク質量が少ないことから、既存の方法ではクライオ電子顕微鏡を用いた構造解析は困難であった。そこで、現在、少量のタンパク質でもクライオ電子顕微鏡を用いた構造解析が可能で、MagIC-Cryo-EM 法を利用することで、この問題を解決することを試みている。

一方で、並行して行った AlphaFold2 による構造予測で、CENP-T の Mis12C 結合部位と Mis12C の複合体構造情報を得ることができた(図4上)。この予測構造から、CENP-T と Mis12C との結合には少なくともふたつの結合界面があることが予想された。ひとつは、CENP-T のふたつのアルギニン(R192/R193; 結合部位1)と Mis12C の負に帯電した領域との静電的な結合で、もうひとつは、CENP-T の疎水性のアミノ酸(I202/F205/V209; 結合部位2)と Mis12C の疎水性領域の疎水結合であった(図4下)。

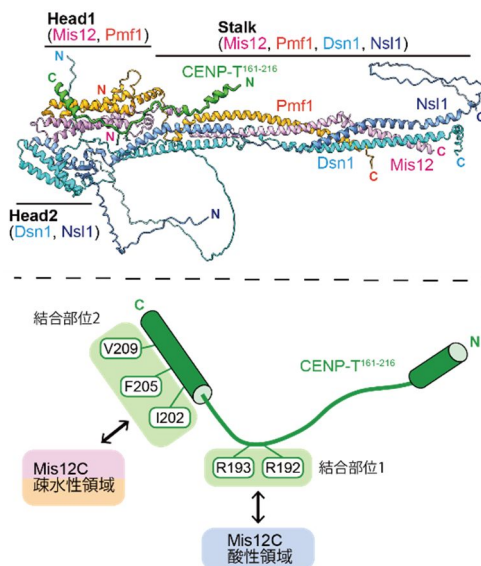


図4. AlphaFold2 により予測された CENP-T と Mis12C との複合体構造(上)とふたつの結合界面(下)

### 2) 分裂期特異的なリン酸化による CENP-T と Mis12C との結合の制御機構

1) で精製した CENP-T-Mis12C 複合体の質量分析をおこない、CENP-T の Mis12C 結合部位内にふたつのリン酸化部位(S175/T184)を同定した(図5上)。これらのリン酸化部位は、1) で同定した結合界面とは異なる領域に存在していたため、CENP-T と Mis12C との3つ目の結合界面であることが予想された。また、これらのふたつのアミノ酸(S175/T184)は、CENP-T-Mis12C 複合体の予測構造においては、Mis12C の負に帯電した領域の近くに位置していた(図5下)ことから、静電的な結合を形成することで、CENP-T と Mis12C との結合を正に制御していることが考えられた。

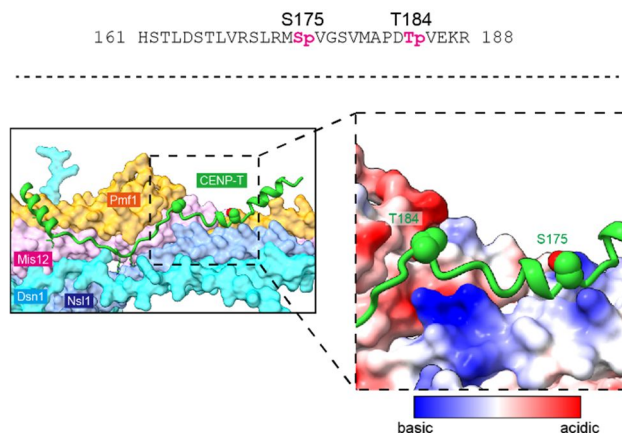


図5. CENP-T のふたつのリン酸化部位(上)とそれらの予測構造上での位置(下)

### 3) CENP-T と Mis12C との結合の制御機構の全体像の解明

まず、1) で同定されたふたつの結合界面が、実際に細胞内において CENP-T と Mis12C との結合に関わるかを調べるために、CENP-T 経路細胞にそれぞれの結合に重要なアミノ酸 (結合部位 1、2) に変異を入れた CENP-T 変異体を発現させ、分裂期細胞における Mis12C のキネトコア局在を調べた。すると、結合部位 1・2 のどちらに変異を入れた場合でも、分裂期細胞における Mis12C のキネトコア局在は減少したことから、結合部位 1・2 それぞれを介した結合の両方が、細胞内での CENP-T と Mis12C との結合に重要であることが明らかになった。

つぎに、これらの結合がどのように制御されるのかを調べた。本研究の研究期間中に、KMN 複合体のクライオ電子顕微鏡構造が海外のグループにより発表された。その構造より、CENP-T の結合部位 1 が結合する Mis12C の酸性領域には、同じ Mis12C の構成因子の Dsn1 の塩基性領域が結合することが示された。また、この Dsn1 の塩基性領域は、細胞分裂期になるとリン酸化酵素 Aurora B によりリン酸化されることが知られており、このリン酸化により Mis12C の酸性領域からはずれ、この Mis12C の酸性領域が露出することが示唆された。つまり、細胞内においては、細胞周期の間期では、Dsn1 の塩基性領域が Mis12C の酸性領域をマスクすることにより CENP-T の結合部位 1 と Mis12C との結合を阻害し、分裂期になると Aurora B のリン酸化により Dsn1 のマスクが除かれ、露出した領域に CENP-T の結合部位 1 が結合するというモデルが考えられた。このことを検証するために、Dsn1 の Aurora B によるリン酸化部位に変異を入れてリン酸化を阻害した変異体を発現させ、細胞分裂期における Mis12C の局在量を観察した。すると、コントロール細胞に比較して、Mis12C 局在量が減少した。このことから、Dsn1 の Aurora B によるリン酸化が、CENP-T の結合領域 1 と Mis12C との結合を促進することが示唆された。

さらに、2) で同定した、CENP-T のリン酸化の Mis12C との結合への関与を調べた。まず、同定したふたつのアミノ酸 (S175/T184) に変異を導入し、CENP-T 経路細胞に発現させた。そして、この細胞における分裂期の Mis12C 局在を調べると、コントロール細胞に比べて Mis12C 局在量が減少することが分かった。さらに、この CENP-T の変異体を発現させた細胞に、上で示した Dsn1 の Aurora B によるリン酸化サイトに変異をいれた変異体を合わせて発現させると、それぞれを単独で発現させた細胞より顕著に Mis12C 局在が減少した。

本研究から、CENP-T と Mis12C との結合には少なくともふたつの制御機構があり (図 6) これらが並行して機能することで、CENP-T と Mis12C との結合を安定化させ、正確な染色体分配に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

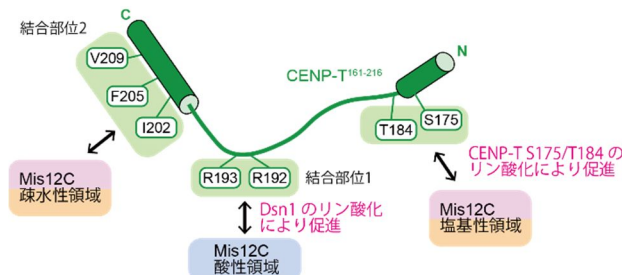


図 6. CENP-T と Mis12C との結合の結合界面とその制御機構

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹之下 憂祐, 有吉 真理子, 原 昌稔, 深川 竜郎
2. 発表標題 CENP-T-Mis12C結合の分子基盤
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yusuke Takenoshita, Mariko Ariyoshi, Masatoshi Hara, Reiko Nakagawa, and Tatsuo Fukagawa
2. 発表標題 The molecular mechanism of the CENP-T-Mis12C interaction
3. 学会等名 MBSJ2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹之下 憂祐, 有吉 真理子, 原 昌稔, 深川 竜郎
2. 発表標題 分裂期キネトコア形成の分子機構
3. 学会等名 第41 回染色体ワークショップ・第22 回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------