

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24370076

研究課題名(和文)染色体分離の瞬間を規定するセパレーズの活性制御機構

研究課題名(英文)Mechanisms underlying the spatiotemporal activation of separase

研究代表者

広田 亨(Hirota, Toru)

公益財団法人がん研究会・がん研究所・実験病理部・部長

研究者番号：50421368

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：染色体は、プロテアーゼであるセパレーズが、姉妹染色分体という染色体のペアを結合するコヒーシンを切断することにより分離する。本研究では、セパレーズの活性プローブを用いて細胞内におけるセパレーズ活性化の時空間特性を明らかにした。さらに、セパレーズはコヒーシンを切断すると同時に、自身の一部をも切断(自己切断)するとそれを契機に、分離した姉妹染色分体の引き離しを促進することを見出した。こうしたセパレーズの二つの役割から、急峻な染色体分離を実現している細胞機能が見えてきた。

研究成果の概要(英文)：The two key events underlying chromosome segregation are the removal of cohesion between sister chromatids and the subsequent poleward movement of disjoined sisters. How cells coordinate these two processes is not well understood. We aimed to address this question, by setting out a probe for separase activity in living cells. Our probe found that separase undergoes an abrupt activation shortly before anaphase onset, specifically in the vicinity of chromosomes. This activation profile depends on securin, to inhibit separase's protease activity and target it to chromosomes. We surprisingly found that, subsequent to its proteolytic activation, separase then binds to and inhibits a subset of cyclin B1-Cdk1, which antagonizes Cdk1-mediated phosphorylation on chromosomes and facilitates poleward movement of sisters in anaphase. Therefore, separase coordinates two key processes to achieve simultaneous and abrupt separation of sister chromatids.

研究分野：細胞生物学、染色体動態学

キーワード：細胞分裂 染色体分配 セパレーズ 活性プローブ M期 染色体不安定性

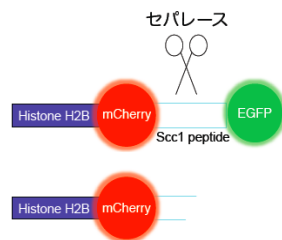
1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞は分裂に際し、凝縮した染色体を二分し、それを紡錘体のはたらきによって二つの細胞に分配する。この一連のプロセスのクライマックスは、中期赤道面に並んだ染色体が「いっせいに」両極に向かって動き出す、「分離の瞬間」である。ところが、染色体が同期的に分離する現象は広く知られているものの、その急激な反応について真正面から解析しようとした研究は乏しく、分離の瞬間を決めているメカニズムの実体、さらには、染色体分離が同期的に起こる生物学的意義は不明であった。

(2) 染色体分配の研究は、この15年で大きく進展し、その分子背景は、相当な理解に達していると概観される。特に、姉妹染色分体の結合を担うコヒーシン複合体、及びそのコヒーシンを切断するプロテアーゼであるセパレースの発見を契機として、「微小管と動原体の結合→紡錘体チェックポイント解除→後期促進因子 APC/C の活性化→セキュリンの分解→セパレースの活性化→コヒーシンの切断→姉妹染色分体の結合の解除」という染色体分配の分子機構が、生物種を通じて共通に存在することが、酵母遺伝学の先導により、明らかにされた (Review in Nasmyth, 2000)。つまり、この一連の反応が、染色体分配という不可逆的な過程の、順序を保証する分子背景として理解されている。

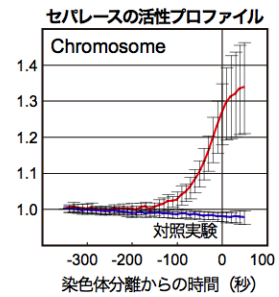
(3) 染色体分離のタイミングを規定しているメカニズムの全容解明に向け、われわれは先ず、セパレースの活性化を可視化す

ることに取り組んだ。セパレースコ切断配列 (Hauf et al., 2001) を含む Scc1 由来のペプチドの両端に、緑色 (GFP) と赤色 (mCherry) の蛍光体を融合し、これにヒストン H2B (または CENP-B) を付加することで、このプローブを染色体全般 (またはセントロメア) に配置した。セパレースの活性化に伴う Scc1 のペプチドの切断を、GFP の遊離を、つまり染色体が、黄 (赤+緑) から赤への変色を検



出する。

このセンサーを用いて解析した結果、セパレース活性化のプロファイルを得ることに成功した。これによると、セパレースの活性は、metaphase のあいだ中、活性が抑制されており、染色体の分離が起こる約 90 秒前になって、急速に活性化されることが判明した (図)。そして、染色体の腕部とセントロメアで、活性化のタイミングに有意な差異はなく、セパレースは染色体全域でいっせいに活性化することが示唆された。



<引用文献>

Nasmyth K, Peters JM, Uhlmann. (2000) Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids. Review. Science 288:1379-1385.

2. 研究の目的

われわれは先行実験で、セパレース・センサーを用い、セパレースが、いつ、どこで、活性化するのかを見出すことに成功した (後に Shindo et al. 2012 にて発表)。そのプロファイルからは、「なぜ、セキュリンの分解が進む metaphase のあいだ中、セパレースの活性は抑えられているのか」「どのような機構で、染色体の全てのドメインで、同時に、急峻な活性化を誘導するのか」「セパレースによるコヒーシン切断は、急峻な染色体分離の直接的な“引き金”なのか」といった、さらに重要な疑問が導き出された。そこで、これらの疑問への解答を求め、本研究では、次の3つの課題に取り組むことを目的とした。

- (1) metaphase でセパレース活性が抑える分子背景を明らかにする。
- (2) セパレースの急峻な活性化を誘導するメカニズムを解明する。
- (3) 染色体分離における「セパレースによるコヒーシンの切断」の意義を明確にする。

これらの研究課題を進めることにより、最終

的には、染色体分離の瞬間を規定している分子機構の全体像を明らかにする。実験系には、以下にあるとおり、セパレーズ・センサーによってセパレーズ活性化のプロファイリングをしながら、分裂期の高同期培養法を用いた生化学的解析を合わせた解析を行う実験計画を立案した。

### 3. 研究の方法

#### (1) metaphase でセパレーズ活性を抑える分子背景について

先行の実験で、細胞あたりの分子数を見積もったところ、セキュリンがセパレーズより過剰（～10倍以上）存在することが手元で判明していたので、セパレーズの抑制に寄与しないセキュリンが優先的に分解を受ける可能性を検討する。そのために、セパレーズと結合している・していないセキュリンのそれぞれの moiety の分解動態を明らかにする。分裂期の細胞抽出液を metaphase から anaphase まで、経時間的（～10分間隔）に調整し、それを分画して、ユビキチン化、分解について、生化学的に解析する。また、不可解なことに、セキュリンのノックアウト・マウス（あるいはそのマウス由来の線維芽細胞）は生存可能で、染色体動態の異常は観察されていない。このことは、セキュリン欠損時には、それに代替する制御の存在が強く示唆される。その候補としては、cyclin B によるセパレーズの抑制が考えられたので、その可能性を検討する。

#### (2) セパレーズの急峻な活性化を誘導するメカニズムについて

セパレーズはその活性化と共に、自己切断 (autocleavage) することが知られている。しかし、この切断は、酵素の活性化に必要なというデータがあり、自己切断の意義は分かっていない。本研究では、まず、これらの切断が、細胞周期のいつ起こるのか、セパレーズの活性化と関連している切断されるのか、を検討する。次いで、それぞれの非切断型変異体を作製して、染色体分配に関する表現形と、セパレーズの活性化プロファイルについて、ライブ・セル・イメージングとセパレーズ・センサーにより解析する。セパレーズの生理的範囲の発現を得るために、BAC; Bacterial Artificial Chromosomes によるゲノム

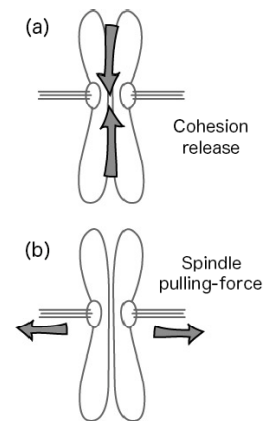
DNA の導入を行う。つまり、3カ所の切断部位について、切れないようにする点変異を、BAC 上のセパレーズ遺伝子に入れることで変異体を作製する。内因性のセパレーズは RNA 干渉法によってノックダウンして、変異体と置換した細胞を解析する。

セパレーズの基質コヒーシンは、染色体に存在する画分のみ切断され、染色体に存在しないと切断を受けない。この観察より、染色体以外ではセパレーズの活性が起こらないことが予測され、セパレーズ・センサーを細胞内のさまざまな部位に配置して検討する。すなわち、セパレーズが染色体に局在することが、その急峻な活性化のための必要条件の一つであることが推察される。もしも、そうであれば、セパレーズの染色体結合のダイナミクスを調べ、染色体への局在制御するメカニズムの手掛かりとする。

#### (3) 染色体分離における「セパレーズの活性化」の意義を明確にする。

これは既に自明であるとの考えが一般的かもしれないが、決してそうではない

(Oliveria 2010)。何故なら、染色体の分離には、セパレーズによる「コヒーシンの解除」と K-fiber (動原体に結合する微小管) による「牽引力の急上昇」、という2つの要素があり、染色体を物理的に引き離すのは、むしろ後者の役割が大きいと思われる



からである (図の a と b)。「セパレーズの活性化は、染色体分離の約90秒前に起こる」というデータをもとに考察すれば、セパレーズによるコヒーシンの切断は、染色体分離の必要条件の一つではあるものの、それのみではない可能性が考えられた。

「牽引力の急上昇」は、K-fiber の急激な短縮によってもたらされるのが、これには Cdk1 活性の急降下が、その背景としては重要である。酵母では、Cdk1 と拮抗するフォスファターゼの Cdc14 が、セパレーズによって活性化され、その結果 INCENP を脱リン酸化すると

いう反応が、この微小管の動態変化にかかわっていることが知られている (Pereira and Schiebel, 2003)。ヒトの細胞では、Cdc14 の機能的に相関なフォスファターゼはなく、またセパレーズが、PP2A フォスファターゼと結合しているという報告もある。そこで、本研究では、セパレーズが直接 Cdk 1 活性の急降下に関与している可能性を追究し、急峻な染色体分離の分子背景を解明する。

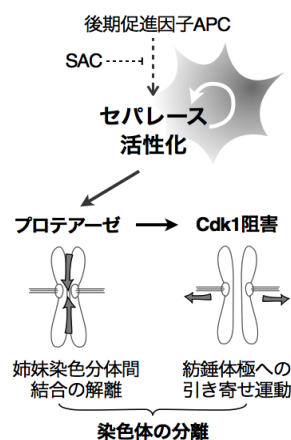
<引用文献>

Oliveira RA, Hamilton RS, Pauli A, Davis I, Nasmyth K. (2010) Cohesin cleavage and Cdk inhibition trigger formation of daughter nuclei. *Nat Cell Biol* 12: 185-192.

Pereira G, Schiebel E. (2003) Separase regulates INCENP-Aurora B anaphase spindle function through Cdc14. *Science* 302: 2120-2124.

4. 研究成果

(1) セパレーズの急峻な活性特性は、抑制因子セキュリンがセパレーズと比して過剰に存在することが重要で、セパレーズと結合していない分子による緩衝効果を見出した。セパレーズの活性プローブを細胞内のさまざまな位置においたところ、活性は染色体近傍に限定されることが分かった。中期から後期への移行期を生化学的に解析したところ、染色体上で活性化したセパレーズは、今度はサイクリン B と結合して Cdk1 の活性を抑制することが判った。つまり、セパレーズはプロテアーゼとして働いた後に、Cdk 活性の抑制因子に転じて、染色体分離を促進していることが判明した。これらの観察より、セパレーズの活性化は、姉妹染色分体間の結合の解除と、姉妹染色分体の紡錘体極への引き寄せ運動という染色体分離の2つの過程が連動させる「スイッチ」として機能していることが明らかとなった (図)。



(2) セパレーズに、3カ所の自己切断部位を

見出し、そのうち2カ所は、分子内切断 (intra-molecular cleavage) であるのに対し、1カ所は、分子間切断 (inter-molecular cleavage) であるという予備的結果を得た。具体的には、プロテアーゼ不活性化型のセパレーズ変異体を細胞で発現して後期での変化をみたところ、驚いたことに、セパレーズの3箇所自己切断部位 (それぞれをアミノ末端より A、B、C 位と呼んだ) のうち、B および C 位の切断は見られなくなったものの、A 位の切断は依然として観察された。ところが、内因性のセパレーズをノックダウンしたところ、A 位の切断も見られなくなった。このことから A 位の切断は分子間切断であることが示唆された。この分子間切断の役割を、A 位の非切断変異体によって調べたところ、この変異体ではセパレーズの急峻な活性化が起こらず、十分な活性に達しないために、コヒーシンが切れのこって染色体分配エラーに至ること分かった。このことから、セパレーズは分子間切断によって急峻な活性化を誘導していると考えられた。

(3) セパレーズ分子間切断と既知のセパレーズ活性化機構 (セパレーズの抑制的リン酸化およびセキュリンの結合) との関連性を検討した。そのために、そのリン酸化修飾を特異的に捉える抗体を作成し、脱リン酸化する (抑制がはずれる) タイミングを調べたところ、ちょうど後期直前のセパレーズの活性化が見られる時期に一致することが分かった。またセキュリンの結合も同様に、セパレーズの活性化のタイミングと一致し、セパレーズが切断された後はセキュリンと結合しなくなることが分かった。つまり、セパレーズの活性化においては、セパレーズの切断、脱リン酸化、セキュリンからの解離の三者の反応が相互に関連すると考えられた。現在、その因果関係を明らかにすべく、それぞれの反応を阻害する変異体による検討を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、連携研究者に下線を施した)

[雑誌論文] (計 19 件)

- ① Nagasaka, K., Hossain, JM., Roberti, JM., Ellenberg, J., Hirota, T. (2016) Sister chromatid resolution is an intrinsic part of chromosome organization in prophase.

- Nat Cell Biol. 18: 692-699.  
doi: 10.1038/ncb3353.
- ② Abe, Y., Hirota, T. (2016) System-level deficiencies in Aurora B control in cancers. *Cell Cycle*. In-press.  
doi: 10.1080/15384101.2016.1185850
- ③ Abe, Y., Sako, K., Takagaki, K., Hirayama, Y., Uchida, KSK., Herman, J., DeLuca, JG., Hirota, T. (2016) HP1-assisted Aurora B kinase activity prevents chromosome segregation errors. *Dev. Cell*. 36: 487-497.  
doi: 10.1016/j.devcel.2016.02.008
- ④ Takahashi, M., Tanaka, K., Wakai, T., Hirota, T. (2016) Phosphoproteomic analysis of human mitotic chromosomes identified a chromokinesin KIF4A. *Biomed Res*. 37: 161-165. doi: 10.2220/biomedres.37.161.
- ⑤ Nagasaka, K. and Hirota, T. (2015) Clarifying the role of condensins in shaping chromosomes. *News and Views. Nat Cell Biol*. 17: 711-713 doi: 10.1038/ncb3183
- ⑥ Minamino, M., Ishibashi, M., Nakato, R., Akiyama, K., Tanaka, H., Kato, Y., Negishi, L., Hirota, T., Sutani, T., Bando, M., Shirahige, K. (2015) Escol acetylates cohesin via a mechanism different from that of Escol2. *Curr. Biol*. 25: 1694-706.  
doi: 10.1016/j.cub.2015.05.017.
- ⑦ 小西 惇、松高 愛、広田 亨 (2015) 染色体不安定性の成因. *細胞* 47 (5): 5-8.
- ⑧ Gallego-Paez, LM., Tanaka, H., Bando, M., Takahashi, M., Nozaki, N., Nakato, R., Shirahige, K., and Hirota, T. (2014) Smc5/6-mediated replication progression contributes to chromosome assembly in human cells. *Mol. Biol. Cell*. 25 (2): 302-317.  
doi: 10.1091/mbc.E13-01-0020.
- ⑨ 高橋元子、進藤軌久、広田 亨 (2014) ライブ・セル・イメージング解析を用いた細胞分裂研究法：バイオセンサーによる酵素活性の時空間的解析. *実験講座.Surgery Frontier*, 21 (2): 205-209.
- ⑩ Ando, K., Ozaki, T., Hirota, T., Nakagawara, A. (2013) NFBFD1/MDC1 is phosphorylated by Plk1 and controls G2/M transition through the regulation of Topoisomerase II alpha-mediated decatenation checkpoint. *PLoS One*. 8 (12): e82744.  
doi: 10.1371/journal.pone.0082744.
- ⑪ Itoh, G., Sugino, S., Mizuguchi, M., Kanno, S., Amin, MA., Iemura, K., Ikeda, M., Yasui, A., Hirota, T., Tanaka, K. (2013) The nucleoporin Nup188 is required for chromosome alignment in mitosis. *Cancer Sci*. 104(7): 871-879.  
doi: 10.1111/cas.12159.
- ⑫ 進藤軌久、広田 亨 (2013) 細胞分裂の仕組みに迫る：染色体分離のキー酵素 separase の活性の可視化と作用機序の解明. *バイオサイエンスとインダストリー*, 71 (3): 229-233
- ⑬ Shindo, N., Kumada, K., Hirota, T. (2012) Separase-sensor reveals dual roles for separase coordinating cohesin cleavage and cdk1 inhibition. *Dev. Cell* 23: 112-123.  
doi: 10.1016/j.devcel.2012.06.015.
- ⑭ Deardorff MA., Bando, M., Nakato, R., Watrin, E., (34 名省略), Hirota, T., Krantz ID., Shirahige K. (2012) HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesin acetylation cycle. *Nature* 489: 313-317. doi: 10.1016/j.devcel.2012.06.015.
- [学会発表] (計 25 件)
- ① Toru Hirota “A system level deficiency of the chromosomal passenger complex in cancer cells” The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (JCA) Nagoya, 2015.10.08
- ② Toru Hirota “An origin of chromosome missegregation in mitosis” The 27th International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, Seoul (Korea), 2015.09.21-23
- ③ 広田 亨 「がん細胞における染色体制御システムの破綻：明かされつつある染色体不安定性の分子背景」新学術領域・がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動・公開シンポジウム, 東京, 2015.09.09
- ④ 広田 亨 「がんと染色体」第 70 回日本臨床細胞学会細胞検査士教育セミナー, 神戸, 2015.09.06
- ⑤ Toru Hirota “Dynamic deformation of kinetochores controls mitotic progression” The 4th Dynamic Kinetochore Workshop, Copenhagen (Denmark) 2015.05.18-22.
- ⑥ 広田 亨 “HP1-assisted Aurora B kinase activity prevents chromosome segregation errors” 国際高等研究所研究プロジェクト「クロマチンデコーディング」研究会, 京阪奈市, 2015.03.20

- ⑦ Toru Hirota “Control of chromosome structure outside mitosis” 2014 Asia GenomeCheck Conference, Suwon (Korea) 2014.03.07.
- ⑧ Toru Hirota “An origin of chromosome missegregation in mitosis” The 37th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, Yokohama, 2014.11.27.
- ⑨ Toru Hirota “A molecular lesion of chromosome missegregation in mitosis” The 73rd Japanese Cancer Association, Annual Meeting, Yokohama, 2014.09.26.
- ⑩ 広田 亨 「ライブ・セル・イメージングがもたらすがん研究の新展開」第11回日本病理学会カンファレンス, 神戸市, 2014.08
- ⑪ Toru Hirota “Smc5/6-mediated regulation of replication progression contributes to mitotic chromosome assembly” The 18th IMCB Symposium: SMC from molecule to disease, Tokyo, 2013.11.29.
- ⑫ Toru Hirota “Cell cycle regulation of chromosome structure that maintains genomic instability” The 72nd Annual Meeting of Japanese Cancer Association, Yokohama, 2013.10.03.
- ⑬ Toru Hirota “What makes kinetochores so dynamic?” The 3rd Dynamic Kinetochores Workshop, Porto (Portugal), 2013.05.14-17.
- ⑭ 広田 亨 「がん細胞における異数性の発生要因を考える」第8回新潟横断的消化器疾患研究会, 新潟市, 2013.03.23.
- ⑮ Toru Hirota “How cells ensure separation of sister chromatids in mitosis” The 1st International Symposium on Molecular Medicine. Suwon (Korea), 2013.02.28.
- ⑯ Toru Hirota “How cells ensure separation of sister chromatids in mitosis” CNRS Jacques Monod Conference on Cell cycle, Roscoff, France, 2012.09.07.
- ⑰ Toru Hirota “How chromosomes are assembled in mammalian cells” Symposium on sister chromatid cohesion, Vienna, 2012.08.24.
- ⑱ Toru Hirota “Dual functions of separase ensure switch-like initiation of anaphase” Joint Spring Meeting of BSCB/BSCB/JSDB. Coventry (United Kingdom), 2012.04.17.

〔図書〕(計3件)  
Uchida, KSK, and Hirota, T. (2016) Spindle assembly checkpoint: its control and aberration. DNA Replication, Recombination and Repair - Molecular Mechanisms and Pathology. Hanaoka and Sugawasa ed. pp 429-447. Springer

〔産業財産権〕  
 ○出願状況 (計1件)  
 名称: HP1 の機能に着目した抗がん剤のスクリーニング方法及び評価系  
 発明者: 広田 亨、阿部 優介  
 権利者: 同上  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2016-035505  
 出願年月日: 平成28年2月26日  
 国内外の別: 国内

○取得状況 (計1件)  
 名称: 細胞観察用蛍光プローブ及びこれを使用する方法  
 発明者: 広田 亨、進藤軌久、熊田和貴  
 権利者: 同上  
 種類: 特許  
 番号: 特願 2014-010635  
 取得年月日: 平成26年1月26日  
 国内外の別: 国内

〔その他〕  
 ホームページによる成果の発信  
 がん研究所実験病理部・広田研究室  
<http://www.jfcr.or.jp/tci/exppathol/>

がん研究会がん研究所  
<http://www.jfcr.or.jp/laboratory/index.html>

- アウトリーチ活動
- ① 第70回細胞検査士教育セミナー  
「がんと染色体」平成27年9月6日
  - ② 東京都立日比谷高校・細胞生物学講義  
「染色体動態の制御とその破綻」  
平成27年7月23日
  - ③ 栃木県立栃木高等学校創立記念講演会  
「細胞の不思議に魅せられて」  
平成25年11月13日
  - ④ 江東区高校生向けサマースクール  
「がん教育」平成25年7月25日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

広田 亨 (Hirota, Toru)  
 公益財団法人がん研究会  
 がん研究所・実験病理部・部長  
 研究者番号: 50421368

### (2) 連携研究者

進藤 軌久 (Shindo, Norihisa)  
 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: 00512253