

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24370078

研究課題名(和文)新規分子CAMPを中心とした染色体安定性システムの解明

研究課題名(英文)Regulatory system of chromosomal stability by molecules including a novel molecule, CAMP

研究代表者

田中 耕三(Tanaka, Kozo)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：00304452

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): 本研究では、染色体の均等な分配を保証する機構(染色体安定性システム)について以下の成果を得た。1) 新規分子CAMPは、HP1, REV7, POGZと複合体を形成して機能し、またCAMPノックアウトマウスは出生直後に死亡することがわかった。2) 核膜複合体構成因子の1つであるNup188が、NuMAを紡錘体極に局在させることにより染色体分配に関与することが明らかになった。3) 微小管結合因子CLIP-170が、PIK1の動原体への局在などにより染色体分配を制御していることが判明した。4) KidとCENP-Eという2つのモーター分子が、紡錘体上での染色体整列に機能していることがわかった。

研究成果の概要(英文): We addressed the regulatory mechanism of chromosomal stability, and following findings were obtained. 1) A novel molecule CAMP functions as a complex with HP1, REV7, and POGZ. CAMP knockout mice die soon after birth. 2) A nuclear pore complex component Nup188 recruits NuMA to spindle poles for chromosome segregation. 3) A microtubule associated factor CLIP-170 regulates chromosome segregation through the mechanisms such as PIK1 recruitment to kinetochores. 4) Two motor molecules, Kid and CENP-E, function for chromosome alignment on the spindle.

研究分野：細胞生物学

キーワード：癌 細胞・組織 染色体 細胞分裂

## 1. 研究開始当初の背景

細胞分裂における染色体の均等な分配は、正確な遺伝情報の伝達に必須であり、その異常はがんをはじめとする疾患と密接に関連している。染色体の分配は紡錘体という、2つの中心体とそこから伸びる微小管よりなる装置によって行われる。複製されて対になった染色体(姉妹染色分体)は、キネトコアを介して互いに異なる中心体から伸びる微小管と結合すること(双方向性結合)により、それぞれの中心体へと引っ張られて分配される。細胞はすべての染色体が正しく分配させるための様々な機構を備えており、応募者らはこれらを総称して「染色体安定性システム」と呼んでいる。

染色体安定性システムの目指すものは、すべての染色体での双方向性結合の成立であるが、これは誤った結合が起こらないようにするだけではなく、誤った結合を修正することによって達成される。このために、キネトコアと微小管の結合は安定化するだけでなく必要に応じて不安定化されなければならない。このような柔軟性が染色体システムの本質であると考えられるが、その分子機構の多くは明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

本研究は研究代表者のこれまでの研究を進展させ、新規分子 CAMP をはじめとする分子による、ヒト細胞における染色体安定性システムを明らかにすることを目的とする。CAMP は、Zn フィンガー領域のほか、3種類のユニークな繰り返しモチーフを有し、キネトコアと微小管の結合を維持するはたらきを持つ(図 1; *EMBO J*, 2011)。本研究では CAMP をはじめとする分子について解析を行い、どのようにして染色体安定性に関与しているのかを明らかにする。本研究における染色体安定性システムの解明は、その異常による染色体不安定性の獲得や発がんの機構の解明に貢献するものと考えられる。

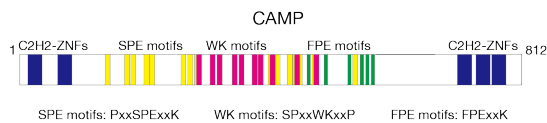


図1 CAMPの構造

## 3. 研究の方法

### (1) CAMP の機能解析

細胞内で CAMP と結合する分子を免疫沈降法によって探索した。同定された分子について染色体分配への関与を検討した。また CAMP のキネトコア 微小管結合の安定性への関与を調べる目的で、CAMP をノックダウンした細胞での微小管の動態を解析した。さらに CAMP の個体での機能を明らかにするためにノックアウトマウスを作成した。

### (2) Nup188 の機能解析

核膜孔複合体構成因子の 1 つである

Nup188 の分裂期での機能を明らかにするために、その分裂期での細胞内局在やノックダウンした際の染色体整列の異常を観察した。

### (3) CLIP-170 の機能解析

微小管結合因子 CLIP-170 の分裂期での機能について、1) 分裂期キナーゼ Pik1 との関係、2) ダイニン/ダイナクチン複合体との関係、に着目して解析した。

### (4) 染色体整列の機構の解析

最近紡錘体中央への染色体の整列は、キネトコアが微小管の側面に結合した状態で起こることが報告されたが、通常は微小管側面への結合と末端への結合が混在しており、解析が困難である。そこでキネトコアが微小管の末端に結合できない状態(キネトコア分子 Hec1 のノックダウンによる)で、染色体が紡錘体中央に移動する機構を解析した。

## 4. 研究成果

### (1) CAMP の機能解析

CAMP と結合する分子として、HP1(heterochromatin protein-1)、POGZ(pogo transposable element with ZNF domain)が同定された。解析の結果 HP1、POGZ 共に CAMP の C 末端にある Zn フィンガー領域に結合することがわかった。HP1、POGZ および CAMP 発見のきっかけとなった Mad2L2(Rev7)をノックダウンすると、いずれも染色体整列の異常が見られ、これらが染色体分配に関与することが明らかになった。

CAMP をノックダウンした細胞で微小管の動態を解析したところ、微小管のターンオーバーが亢進していることが判明し、CAMP が微小管の安定性に関与している可能性が示唆された。

CAMP ノックアウトマウスを作成したところ、ホモノックアウトマウスは生後すぐに死亡することがわかった。この原因として神経系の異常が考えられ、脳の解析を行っている。また CAMP の成体での機能を解析するために、コンディショナルノックアウトマウスを作成している。

### (2) 核膜孔複合体構成因子 Nup188

核膜輸送を担っている核膜孔複合体構成因子の一部は、核膜崩壊後に染色体分配に関与している。そこで核膜孔複合体構成因子の 1 つである Nup188 の分裂期での機能を検討した。その結果 Nup188 は細胞分裂期に紡錘体極に存在し、これをノックダウンすると高頻度に染色体の整列異常が見られた。解析の結果、Nup188 は微小管を束ねる機能をもつ NuMA を紡錘体極へ局在させることにより染色体分配に関与することが示唆された(図 2; *Cancer Sci*, 2013)。

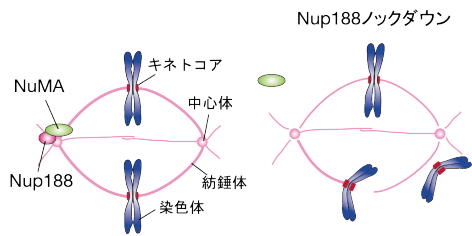


図2 Nup188の分裂期での機能

### (3) 微小管結合因子 CLIP-170

CLIP-170 は微小管結合因子の 1 つであり、分裂期にはキネトコアに局在して微小管との結合に関与する。この機構について解析を行ったところ、CLIP-170 が分裂期キナーゼである Plk1 と結合し、そのキネトコアへの局在に関わることが明らかになった。CLIP-170 は Plk1 を動原体に局在させることにより、自分自身や周辺の分子のリン酸化を介してキネトコアと微小管の結合を制御している可能性が考えられた(図 3; *J Cell Sci*, 2014)。

CLIP-170 はダイナクチンのサブユニットである p150glued と結合することによりキネトコアに局在する。興味深いことに p150glued をノックダウンすると CLIP-170 を単独でノックダウンした場合よりも染色体整列異常が軽度であった。検討の結果、CLIP-170 はダイナクチンと結合しているモーター分子ダイニンによる染色体を紡錘体極へと輸送するはたらきに拮抗して、キネトコアの微小管末端への結合を促進している可能性が示唆された。

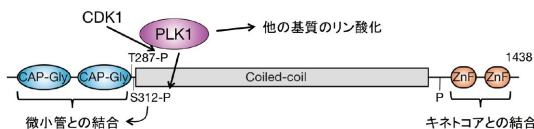


図3 CLIP-170の機能

### (4) 染色体整列の機構

分裂前中期に染色体が紡錘体赤道面に迅速に整列することは、キネトコアと微小管の正しい結合の成立に重要であると考えられる。そこで染色体整列の機構について解析を行ったところ、これまでヒト細胞でははたらきが明らかでなかったモーター分子 Kid が分裂期初期の染色体の紡錘体中央への移動に寄与していることがわかった。また別のモーター分子 CENP-E が Kid に引き続いて染色体整列にはたらくことが示唆され、2 つのモーター分子の使い分けによる染色体整列のモデルを提唱した(図 4; *Nat Commun*, 2015)。

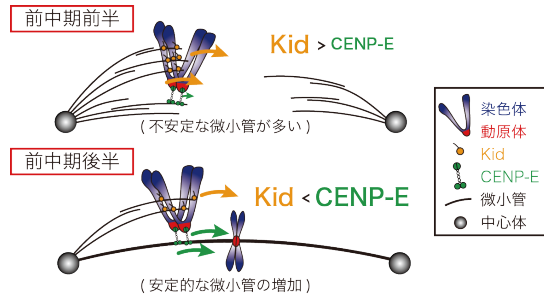


図4 KidとCENP-Eによる染色体整列のモデル

### 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 8 件)

1. 家村顕自, 田中耕三. Chromokinesin Kid and kinetochore kinesin CENP-E differentially support chromosome congression without end-on attachment to microtubules. *Nat Commun* (2015) 6, 6447. 査読有.  
DOI: 10.1038/ncomms7447.
2. Amin MA, 伊藤剛, 家村顕自, 池田真教, 田中耕三. CLIP-170 recruits PLK1 to kinetochores during early mitosis for chromosome alignment. *J Cell Sci* (2014) 127, 2818-2824. 査読有.  
DOI: 10.1242/jcs.150755.
3. 伊藤剛, 杉野史朗, 池田真教, 水口真裕美, 菅野新一郎, Amin MA, 家村顕自, 安井明, 広田亨, 田中耕三. Nucleoporin Nup188 is required for chromosome alignment in mitosis. *Cancer Sci* (2013) 104, 871-879. 査読有.  
DOI: 10.1111/cas.12159.
4. 田中耕三. Regulatory mechanisms of kinetochore-microtubule interaction in mitosis. *Cell Mol Life Sci* (2013) 70, 559-579. 査読有.  
DOI: 10.1007/s00018-012-1057-7.
5. 田中耕三. Mad2/Mad2L2(Rev7)の構造と機能. *生化学* (2013) 8, 629-637. 査読無.
6. 田中耕三. 染色体分配を司る動原体と微小管の相互作用. *細胞工学* (2013) 32, 291-296. 査読無.  
DOI: 10.1007/s00018-012-1057-7.
7. 田中耕三. Dynamic regulation of kinetochore-microtubule interaction during mitosis. *J Biochem* (2012) 152, 415-424. 査読有.  
DOI: 10.1093/jb/mvs109.
8. 田中耕三. 染色体分配の分子機構と関連分子を標的としたがん治療への展望. *実験医学* (2012) 30, 3118-3124. 査読無.

[学会発表](計 2 4 件)

1. 池田真教, 田中耕三. 体細胞分裂期での M 期チェックポイントを制御する新規分子機構の解明. 第 32 回染色体ワークショップ、第 13 回核ダイナミクス研究会、2014

- 年 12 月 15 日、安芸グランドホテル(宮島・広島)
2. 池田真教、田中耕三、Mps1 キナーゼの局在・活性制御機構と分裂期チェックポイントにおけるその機能的役割の解明、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 26 日、パシフィコ横浜(横浜・神奈川)
  3. 家村顕自、水野夏紀、小林絹枝、田中耕三、効率的な染色体整列における Kid 及び CENP-E の機能解析、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜(横浜・神奈川)
  4. 池田真教、田中耕三、M 期チェックポイントキナーゼ Mps1 の活性調節機構とその機能的役割の解明、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 18 日、京都国際会館(京都・京都)
  5. 家村顕自、伊藤剛、田中耕三、染色体整列制御分子 CAMP は分裂期停止時におけるがん細胞の生存に寄与する、第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 27 日、パシフィコ横浜(横浜・神奈川)
  6. 池田真教、染色体恒常性の維持に必須な分裂期チェックポイント制御機構の解明、平成 26 年度がん若手研究者ワークショップ、2014 年 9 月 5 日、蓼科グランドホテル滝の湯(蓼科・長野)
  7. 田中耕三、動原体キネシン CENP-E とクロモキネシン Kid による染色体運動の制御、理研シンポジウム第 4 回分子モーター討論会、2014 年 6 月 27 日、大阪大学(大阪・大阪)
  8. 家村顕自、伊藤剛、池田真教、Amin MA、田中耕三、Chromokinesin Kid and kinetochore kinesin CENP-E differentially support chromosome congression during prometaphase、アメリカ細胞生物学会(ASCB)年会、2013 年 12 月 16 日、Ernest N. Morial Convention Center(ニューオーリンズ・米国)
  9. 池田真教、伊藤剛、家村顕自、Amin MA、田中耕三、分裂期初期におけるキネトコア微小管結合の解析、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 5 日、神戸ポートアイランド(神戸・兵庫)
  10. 家村顕自、伊藤剛、田中耕三、染色体整列制御分子 CAMP は分裂期停止時における細胞の生存に関与する、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3 日、神戸ポートアイランド(神戸・兵庫)
  11. 池田真教、伊藤剛、家村顕自、水野夏紀、田中耕三、染色体動態を司る動原体-微小管結合制御機構の解明、第 31 回染色体ワークショップ、第 12 回核ダイナミクス研究会、2013 年 11 月 26 日、ホテルおかだ(箱根・神奈川)
  12. 家村顕自、田中耕三、動原体キネシン CENP-E とクロモキネシン Kid による動原体微小管非存在下の分裂期における染色体運動の制御、第 31 回染色体ワークショップ、第 12 回核ダイナミクス研究会、2013 年 11 月 26 日、ホテルおかだ(箱根・神奈川)
  13. 伊藤剛、池田真教、菅野新一郎、Amin MA、家村顕自、安井明、広田亨、田中耕三、核膜複合体構成因子 Nup188 による染色体分配の制御について、第 22 回複製・組換え・修復ワークショップ、2013 年 11 月 22 日、ホテルニュー水戸屋(仙台・宮城)
  14. 伊藤剛、安井明、広田亨、田中耕三、染色体分配における核膜複合体構成因子 Nup188 の機能、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 3 日、パシフィコ横浜(横浜・神奈川)
  15. 伊藤剛、池田真教、菅野新一郎、Amin MA、家村顕自、安井明、広田亨、田中耕三、Mitotic role of Nup188, a component of the nuclear pore complex、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日、パシフィコ横浜(横浜・神奈川)
  16. 家村顕自、伊藤剛、田中耕三、分裂期での細胞周期停止持続による細胞死機構、第 46 回酵母遺伝学フォーラム研究報告会、2013 年 9 月 10 日、東北学院大学(仙台・宮城)
  17. 伊藤剛、池田真教、家村顕自、Amin MA、田中耕三、キネトコアと微小管の双方向性結合の成立過程の解析、第 65 回日本細胞生物学会大会、2013 年 6 月 21 日、ウインクあいち(名古屋・愛知)
  18. 伊藤剛、杉野史朗、池田真教、水口万裕美、菅野新一郎、Amin MA、家村顕自、安井明、広田亨、田中耕三、染色体分配における核膜孔複合体構成因子 Nup188 の機能、日本生化学会東北支部第 79 回例会・シンポジウム、2013 年 5 月 11 日、東北大学(仙台・宮城)
  19. 伊藤剛、杉野史朗、池田真教、水口万裕美、菅野新一郎、Amin MA、家村顕自、安井明、広田亨、田中耕三、The nucleoporin Nup188 is required for chromosome alignment in mitosis、NIH-Tohoku University-JSPS Symposium、2013 年 5 月 10 日、東北大学(仙台・宮城)
  20. 池田真教、伊藤剛、田中耕三、動原体と微小管の過渡的複合体形成機構の解明、第 30 回染色体ワークショップ、第 11 回核ダイナミクス研究会、2012 年 12 月 20 日、淡路夢舞台国際会議場(淡路島・兵庫)
  21. 家村顕自、伊藤剛、田中耕三、染色体整列制御分子 CAMP は分裂期停止時における細胞の生存に関与する、第 11 回核ダイナミクス研究会、2012 年 12 月 19 日、淡路夢舞台国際会議場(淡路島・兵庫)
  22. 伊藤剛、Amin MA、家村顕自、池田真教、田中耕三、キネトコアが微小管の側面に結合する分子メカニズムの解明、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、福岡国際会議場(福岡・福岡)
  23. 田中耕三、細胞周期停止の持続による細

- 胞死誘導機構の解明、特定領域研究「細胞増殖制御」終了シンポジウム、2012年8月31日、東京工業大学（目黒区・東京）
24. 田中耕三、セントロメアと微小管の位置関係による染色体分配制御機構の解明、新学術領域研究「非コードDNA」第3回班会議、2012年7月26日、ホテル時之栖（御殿場・静岡）

〔図書〕（計1件）

1. 清木元治, 秋山徹, 石川冬木, 内海潤, 近藤豊, 中山敬一, 平尾敦, 八尾良司, 清宮啓之, 久能樹, 杉浦麗子, 高久誉大, 町田晋一, 胡桃坂仁志, 廣川高久, 島田緑, 竹山廣光, 中西真, 田中耕三, 西尾美希ほか, 南山堂, 「分裂期チェックポイントアダプテーション阻害による抗がん剤耐性克服次世代がん戦略研究 Update がん基盤生物学—革新的シーズ育成に向けて—」2013, 193-199.

〔その他〕

ホームページ等

田中耕三研究室 Department of Molecular Oncology

<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/molonc/index.html>

東北大学加齢医学研究所 分子腫瘍学研究分野

[http://www.idac.tohoku.ac.jp/ja/activities/research/molecular\\_oncology/index.html](http://www.idac.tohoku.ac.jp/ja/activities/research/molecular_oncology/index.html)

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 耕三 (TANAKA, Kozo)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：00304452

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

伊藤 剛 (ITO, Go)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：60607563

広田 亨 (HIROTA, Toru)

公益財団法人がん研究会・がん研究所・部長

研究者番号：50421368

安井 明 (YASUI, Akira)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：60191110

菅野 新一郎 (KANNO, Shin-ichiro)

東北大学・加齢医学研究所・講師

研究者番号：10400417