

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650070

研究課題名(和文) 分裂期染色体を緩やかにまとめるグルーの実体とその生理的意義

研究課題名(英文) Physiological significance of the inter-chromosomal glue that loosely clusters mitotic chromosomes

研究代表者

高木 昌俊 (Takagi, Masatoshi)

国立研究開発法人理化学研究所・今本細胞核機能研究室・専任研究員

研究者番号：60324779

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト培養細胞などで分裂期初期における染色体動態を観察すると、個々の染色体が独立に挙動するのではなく、全ての染色体が緩やかにまとまった一群として挙動していることが分かる。本研究では、Ki67抗原が、分裂期染色体が一群として挙動することを促すような「染色体間グルー(糊)」として機能する可能性を検討した。また染色体間グルーの果たす生理的意義について、分配を果たした全ての染色体が分裂終期に一つの核に収納される確率を高めることで、染色体安定性維持に貢献する可能性を提案した。

研究成果の概要(英文)：Observation of chromosome dynamics at the early stage of mitosis in human cultured cells revealed that most chromosomes behave as a gently consolidated group. In this study, we investigated the possibility that the Ki-67 antigen might function as "inter-chromosomal glue" which promotes the behavior of whole mitotic chromosomes in a group. In addition, we proposed a possibility that the inter-chromosomal glue might contribute for the maintenance of chromosome stability via raising the probability that all segregated chromosomes in anaphase are stored in one nucleus in telophase.

研究分野：細胞生物学

キーワード：分裂期染色体 Ki-67 AID 染色体安定性 染色体間グルー 微小核

### 1. 研究開始当初の背景

分裂期染色体を生化学的に調製すると、一つの細胞に由来する染色体がボール状にまとまっていることが多い。また分裂期初期の染色体動態を観察すると、個々の染色体が独立に挙動するのではなく、殆どの染色体が緩やかな一群として挙動しているように見える。これらの観察から染色体どうしをまとめるグルー(染色体間グルー)の存在が示唆されるが、分子的な実体が未知であるため、その役割について検討されることは国内・国外ともになかった。報告者はこれまでに、分裂期染色体の表層に局在する Ki67 抗原の機能解析を行い、Ki67 抗原を培養細胞から除去することにより、2-3 対程度の染色体が分裂期初期に染色体の一群から離脱することを示した。またカエル卵抽出液を用いた分裂期染色体再構成系にカエル Ki67 抗原に対する特異抗体を添加することにより、分裂期染色体同士の相互作用が損なわれることを示した。いずれも Ki67 抗原が染色体間グルーの実体である可能性を示唆する結果である。これを端緒に、染色体間グルーの分子レベルでの解析や役割の検討がはじめて可能になると思われた。これとは全く別に、分裂期の後に一組の染色体の全てが一つの核に収納されることの重要性が改めて示された。これに失敗し少数の染色体を含む微小核が出現すると、微小核において大規模な染色体再編が急速に進行し、細胞癌化が一気に加速する(Stephens ら[2010]、Crasta ら[2012])。細胞は全ての染色体を一つの核に収納するための積極的なメカニズムを備えているものと予想された。以上を踏まえ申請者は、染色体間グルーは核膜形成時に微小核形成を抑制することで、染色体安定性の維持に貢献しているのではないかと予想し、本研究を着想した。

### 2. 研究の目的

ヒト培養細胞などで分裂期初期における染色体動態を観察すると、個々の染色体が独立に挙動するのではなく、全ての染色体が緩やかにまとまった一群として挙動しているように見える。また分裂期同調した培養細胞から染色体を生化学的に調製すると、一つの細胞に由来する染色体は緩やかにまとまり、ボール状の構造を成す。分裂期染色体が一群として挙動することを促すような「染色体間グルー(糊)」の存在が予想される。本研究では、これまでに具体的な検討が一切なされてこなかった染色体間グルーについて、その成分の同定に挑み、かつ性状解析を行う。また染色体間グルーの果たす生理的意義について、全ての染色体が一つの核に収納される確率を高めることで、染色体安定性維持に貢献する可能性を特に検討する。

### 3. 研究の方法

研究提案の端緒である Ki67 抗原について、

染色体間グルー活性をもつことを定量的に示す。一方で Ki67 抗原以外にも染色体間グルーとして機能する可能性のある因子を生化学的に探索し、活性を評価する。また生化学的および薬理的解析によりグルー活性の性状を探る。以上により、染色体間グルーに関する基礎的な情報の取得を行う。

染色体間グルー活性が認められた因子について、細胞からの除去または過剰発現により活性を操作し、微小核形成頻度への影響を評価する。微弱な影響しかでない可能性も予想されるので、細胞の選定や評価系の微調整などを慎重に行う。また核膜形成過程の効率に關与する因子などを予め除去し、細胞の感受性を高めた上で、グルー活性除去の影響を評価する。以上により、「染色体間グルー活性が微小核形成を抑制することで、染色体安定性の維持に寄与する」とする仮説の根幹となる部分について、その妥当性を検証する。

### 4. 研究成果

初年度及び次年度は、染色体動態を適切に観察・評価するための実験系の洗練に費やされた。具体的には、染色体倍数性が比較的よく保たれている HCT116 細胞を新たに導入した。また染色体間グルーの成分であると予想される因子を細胞から除去する際に、長時間を要する siRNA の使用を止め、ゲノム編集により AID (オーキシン誘導性デグロン) タグを付する手法を採用した。細胞周期同調とオーキシン添加による条件的分解とを組みわせることにより、分裂期直前の数時間の操作で対象因子を細胞から除去することが可能となった。またゲノム編集により内在性因子に蛍光タグを付することが容易に行えるようになり、種々のマーカー因子の挙動を生細胞観察できる細胞株を多数樹立した。これらの細胞株は本研究において有効に利用されたが、今後より広範な研究において重要な役割を担うと予想される。

最終年度においては、Ki67 抗原(または Ki67 抗原と直接相互作用するモータータンパク質である Hklp2)を除去した細胞の詳細な観察を行った。予想に反して「染色体動態の異常」や「微小核形成頻度の上昇」を明らかに認めることはできず、より詳細な評価系の開発や、関連因子を予め除去することにより細胞を感作した上で解析するなどの工夫が求められた。一方で、Ki67 抗原の除去により「分裂期染色体構造の異常」が惹起されることを新たに認めた。この点についてより詳細に観察をし、また Ki67 抗原が II 型トポイソメラーゼと相互作用することを示す生化学的解析を加え、論文発表した。

本研究を遂行する間に、「染色体グルー」の主成分であると予想される Ki67 抗原の細胞機能について、新たな知見が爆発的な勢いで発表された。報告者を含むグループにより、Ki67 抗原の染色体表層領域の構築における重要性が示された(Booth ら[2014])のを皮

切りに、Ki67 抗原が分裂期染色体の密集を妨げるサーファクタントとして機能する可能性が示され (Cuylenら [2016])、また Ki67 抗原ノックアウトマウスの作成もなされた (Sobecki ら [2016])。さらに Ki67 抗原が分裂期染色体構築に関与するとの報告が、報告者らを含めた複数研究室からなされた (Takagi ら [2016]、Booth ら [2016])。一方で、Ki67 と直接相互作用するモータータンパク質である Hklp2 が近傍にある染色体同士の間調的挙動に必要であることを示す解析結果も既に得られている (Vladimirova ら [2013])。これらの状況を鑑みると、本研究提案についても他グループとの競合が予想される。これまでに蓄積した独自知見を十全に活かして、早期の成果発表を目指している。

#### 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5件)

Mimura, Y., Takagi, M., Clever, M., and Imamoto, N. (2016). ELYS regulates the localization of LBR by modulating its phosphorylation state. *J Cell Sci.* (accepted on September 28, 2016) (査読あり) DOI: 10.1242/jcs.190678.

Takagi, M., Natsume, T., Kanemaki, M.T., and Imamoto, N. (2016). Perichromosomal protein Ki67 supports mitotic chromosome architecture. *Genes. Cells.* 21(10):1113-24. (査読あり) DOI: 10.1111/gtc.12420.

Song, C., Takagi, M., Park, J., Xu, R., Gallagher-Jones, M., Imamoto, N., and Ishikawa, T. (2014) Analytic 3D imaging of mammalian nucleus at nanoscale using coherent x-rays and optical fluorescence microscopy. *Biophys J.* 107(5):1074-81. (査読あり) DOI: 10.1016/j.bpj.2014.07.028.

Takagi, M., Nishiyama, Y., Taguchi, A., and Imamoto, N. (2014) Ki67 antigen contributes to the timely accumulation of protein phosphatase 1gamma on anaphase chromosomes. *J Biol Chem.* 289(33):22877-87. (査読あり) DOI: jbc.M114.556647.

Booth, D., Takagi, M., Sanchez-Pulido, L., Petfalski, E., Vargiu, G., Samejima, K., Imamoto, N., Ponting, C., Tollervy, D., Earnshaw, W.C., and Vagnarelli, P. (2014) Ki-67 is a PP1-interacting protein that organizes the mitotic chromosome

periphery. *eLife* (accepted on April 27, 2014). (査読あり)  
DOI:10.7554/eLife.01641.

##### [学会発表](計3件)

高木 昌俊、「Ki67 抗原は分裂期染色体構造を染色体表層から支持する」第39回 日本分子生物学会 2016年12月2日(神奈川・横浜市)

高木 昌俊、「Ki67 抗原の LR ドメインが読みとるヒストンコードの探索」第67回 日本細胞生物学会 2015年7月2日(東京・江戸川区)

高木 昌俊、「Ki67 抗原が分裂期染色体表層に PCF を樹立する分子機構」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 安芸グランドホテル 2014年12月15日(広島・廿日市市)

##### [図書](計0件)

##### [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

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

高木 昌俊 (Takagi, Masatoshi)  
国立研究開発法人理化学研究所・今本細胞核機能研究室・専任研究員  
研究者番号: 60324779

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )