

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870054

研究課題名(和文)染色体分配における双方向性結合の形成に関わるリン酸化シグナルネットワークの解明

研究課題名(英文) Establishment of molecular network of mitotic kinases regulating chromosome segregation in mitosis

研究代表者

池田 真教 (Ikeda, Masanori)

東北大学・加齢医学研究所・教育研究支援者

研究者番号：80645010

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)：体細胞分裂期での正確な染色体分配を保証するキネトコア-微小管結合の形成過程を、微小管とキネトコアの2つの結合様式(側面結合と末端結合)の使い分けという視点から連続的に捉え、分裂期キナーゼの機能と、その連動性を解明することを目的に研究を実施し、以下の成果を得た。1) Aurora BとPlk1という2つの分裂期キナーゼが対立することでキネトコアと微小管の結合様式を使い分け、効率的に双方向性結合が形成される可能性が示唆された。2) Plk1はBub1を足場にMps1やKnl1のリン酸化を介して双方向性結合の形成を保証する紡錘体チェックポイント活性を調節することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Correct attachment between kinetochore and microtubule is required for precise distribution of duplicated sister chromatids in mitosis. We investigated the functional roles of mitotic kinases and the functional relationships between the kinases in the establishment of formation of kinetochore-microtubule attachment during mitosis, focusing on two types of binding mode between kinetochore and microtubule (lateral attachment and end-on attachment). We obtained following results. 1) Two mitotic kinases, Aurora B and Plk1, may counteract to form biorientated kinetochore-microtubule attachment efficiently by discriminating between lateral and end-on attachment. 2) Plk1 plays important roles in control of the activity of spindle assembly checkpoint ensuring establishment of biorientation through Plk1-mediated phosphorylation of Mps1 and Knl1 exerted by Plk1-Bub1 complex.

研究分野：細胞生物学

キーワード：染色体分配 キネトコア 微小管 紡錘体チェックポイント 分裂期キナーゼ Plk1 Mps1

1. 研究開始当初の背景

真核生物は、発生や細胞増殖の度に細胞分裂を繰り返し、複製された染色体を次世代に正しく分配しなければならない。このような細胞分裂期での染色体の正確な分配は、染色体のセントロメア領域に形成されるキネトコアと微小管の正しい結合に依存する(双方向性結合の形成)。核膜崩壊後、染色体が微小管に捕捉される際、キネトコアは効率的に微小管の側面部に結合(側面結合)する一方、双方向性結合が成立すると、キネトコアは微小管末端部に結合(末端結合)し、微小管による染色体の牽引に耐えうる安定な結合を形成する。従来、側面結合は不安定な一過性の結合であるため、双方向性結合の成立は末端結合の形成として一元的に理解されてきた。しかし、近年、キネトコアはまず微小管と側面結合し、それを維持したまま紡錘体中央部に移動した後、双方向性結合を形成することも示唆されており、双方向性結合の成立には依然、不明な点が多く残されている。双方向性結合の成立には Plk1 や Aurora B、Mps1、Bub1 など代表される一群の分裂期キナーゼが重要な役割を担う。特に、セントロメアに局在する Aurora B は双方向性結合が成立していないキネトコア-微小管結合を特異的に不安定化し、双方向性結合の成立に中心的な役割を担う。しかし、双方向性結合形成過程における分裂期キナーゼの機能を体系的に示した例はこれまでになく、双方向性結合を制御するシグナル伝達機構はほとんど不明である。

2. 研究の目的

細胞分裂期での染色体分配のダイナミックな制御はキネトコアと微小管の双方向性結合の成立に依存する。近年、双方向性結合の成立は、側面結合と末端結合という2つのキネトコア-微小管結合の様式の使い分けにより効率的に行われる可能性が示唆されて

いる。興味深いことに、Plk1 や Bub1 の機能欠損細胞では側面結合が蓄積するのに対し、Mps1 や Aurora B の機能障害は末端結合の蓄積を誘発し、染色体分配の異常を引き起こす。このことは、種々の分裂期キナーゼが側面結合と末端結合の使い分けを調節する可能性を示唆する。本研究では、正確な染色体分配を司るキネトコアと微小管の双方向性結合の形成を側面結合と末端結合の2つの結合様式の使い分けという視点から連続的に捉え、Plk1、Bub1、Mps1、Aurora B を中心に染色体動態の変化に応じた種々の分裂期キナーゼの機能と、その運動性を解明し、双方向性結合形成を制御するリン酸化シグナルを明らかにすることを目的とし、研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 染色体動態の変化に応じた分裂期キナーゼの機能解明

双方向性結合の成立はキネトコアの形態的变化、およびその構成因子の転換、さらには微小管動態の安定化を伴う。そこで、染色体の挙動の変化に応じたキネトコア-微小管結合の様式や、キネトコアの構造および形態の変化、微小管動態の変化を免疫染色やライブセルイメージングを用いて調べる。さらに、これらの要素に対する各種分裂期キナーゼの阻害効果を調べることで染色体動態の変化に応じた分裂期キナーゼの機能的役割を明らかにする。

(2) 染色体動態の変化に応じた分裂期キナーゼ間相互作用解析

免疫染色やライブセルイメージングを用いて染色体動態の変化に応じた各種分裂期キナーゼの活性・局在の変化を調べる。また、各種キナーゼの野生型、不活性型、あるいは活性型変異体を人為的にキネトコアに固相化することで、局在の変化を止め、種々のキナーゼ動態や活性変化に対する効果を調べ、

時空間的に分裂期キナーゼ間の相互作用を明らかにする。同様の実験系を用いて、キネトコア-微小管結合、キネトコア構造、微小管動態の変化などへの影響もあわせて検証し、染色体動態の変化に応じた各種キナーゼが示す局在変化の生理的意義についても検証する。

(3) 分裂期キナーゼの機能的差異を生み出すしくみの解明

全ての分裂期キナーゼは双方向性結合の成立に伴い、キネトコア局在を消失あるいは減少させる。そこで、キネトコアと微小管の結合状態、微小管によりキネトコア間に生じる張力、微小管動態の変化を人為的に操作し、各種分裂期キナーゼの局在や活性に及ぼす影響を調べることで分裂期キナーゼの動態変化と染色体動態の変化の相関を明らかにし、種々の分裂期キナーゼの機能的差異を生み出す機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 双方向性結合形成過程における分裂キナーゼの機能的役割とその連動性の解明

免疫染色を用いて染色体動態の変化に応じたキネトコア-微小管結合の様式およびキネトコアの形態変化を調べたところ、核膜崩壊直後に側面結合が増大すること、さらに、側面結合を形成したキネトコアではその形態的变化は見られず、末端結合の形成に伴いキネトコアは形態的な変化を示すことを見出した。一方で、各種分裂期キナーゼを不活性化させた細胞でのキネトコア-微小管結合の様式を調べてみると、Aurora B 阻害細胞では微小管の安定化を伴いながら末端結合の著しい増大が認められるのに対し、PIK1 阻害細胞では側面結合の増大が認められた。また、染色体動態の違いに応じて体系的にキネトコア分子 23 種の局在を解析したところ、これらの分子の局在パターンは染色体動態の

変化に応じて大きく 4 つグループに大別できること、さらに、このうち側面結合に關与する分子のほとんどは Aurora B の活性に依存するのに対し、PIK1 の活性には依存しないことを明らかにした。興味深いことに、Bub1 と Mps1 のキネトコア局在は Aurora B 阻害細胞では消失するのに対し、PIK1 阻害細胞では維持されること、特に Mps1 のキネトコア局在は PIK1 阻害細胞で著しく増大することを見出した。さらに、PIK1 阻害細胞で見られる Mps1 のキネトコアへの集積は微小管に依存することを明らかにした。一方、PIK1 のキネトコア局在は Aurora B 阻害細胞でも維持されることを明らかにした。以上のことから、Aurora B は末端結合の形成を阻害するだけでなく、側面結合の形成を促進することで双方向性結合の形成に中心的役割を担う可能性が示唆された。それに対し、PIK1 は末端結合の形成、あるいは側面結合を末端結合に変換する機能を担う可能性が示唆された。PIK1 阻害細胞でキネトコアに集積する Mps1 は側面結合を形成したキネトコアに強く結合することを踏まえると、Mps1 の動態変化が PIK1 の下流でその機能を担う可能性が想定され、現在検証を続けている。

(2) 双方向性結合形成における PIK1 の新規機能の解明

双方向性結合の形成は紡錘体チェックポイント(SAC)と呼ばれる監視機構によって保証されており、Mps1 はその活性化・維持に必須な機能を担う。近年、SAC は Mps1 がキネトコアタンパク質 Knl1 をリン酸化することで触媒される一連のシグナルカスケードであることが示されている。私たちは PIK1 阻害細胞では核膜崩壊後も Mps1 がキネトコアに集積し、活性が抑制されること、さらに In vitro リン酸化実験により PIK1 は Mps1 を直接リン酸化することを見出した。さらに、意外にも PIK1 は Mps1 の活性化を介して SAC 活

性を調節することを見出した。一方で、PIK1 は Mps1 だけではなく Knl1 を直接リン酸化すること、Mps1 非存在下では Knl1 のリン酸化を介した SAC 活性化能を有することを見出した。PIK1 のキネトコア局在は Bub1 との結合が関与することが以前に報告されている。興味深いことに、Bub1 を発現抑制し、PIK1 との結合を欠損した Bub1 変異体を発現させた細胞では、Mps1 や Knl1 のリン酸化が抑制されることを明らかにし、双方向性結合形成における PIK1 の新たな機能は Bub1 との結合を介して発揮されることを明らかにした。以上のことから、PIK1 は Bub1 を足場に Mps1 の活性化を介して SAC の活性化に関与すること、PIK1-Bub1 複合体は Mps1 だけではなく、キネトコアタンパク質 Knl1 のリン酸化を介した SAC 活性化能も併せ持つことを明らかにした。

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)

Isidor, B., Kury, S., Ikedo, M., Tanaka, K. and Bezieau, S. (他 31 名). De Novo Truncating Mutations in the Kinetochore-Microtubules Attachment Gene CHAMP1 Cause Syndrome Intellectual Disability. Human Mutation 37, 354-358 (2016). 査読有。DOI: 10.1002/humu.22952

[学会発表](計8件)

池田真教、田中耕三。M 期キナーゼ PIK1 による紡錘体チェックポイント制御機構の解明。第 33 回染色体ワークショップ・第 14 回核ダイナミクス研究会。2016 年 1 月 12 日～1 月 14 日。松島一の坊(宮城・松島)。

鈴木康弘、乗田理恵、池田真教、菅野新一郎、佐藤靖史。Vasohibin ファミリーの機能解析における新展開。第 23 回日本血管生

物医学会学術集会。2015 年 12 月 10 日～12 日。神戸国際会議場(兵庫・神戸)。

池田真教、田中耕三。ゲノム安定性を司る紡錘体チェックポイントの新規分子機構の解明。第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会。2015 年 12 月 1 日～12 月 4 日。神戸国際展示場(兵庫・神戸)。

蝦名真行、加藤恭丈、池田真教、田中耕三、五十嵐和彦。核局在 MAT11alpha のセントロメア領域における役割。第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会。2015 年 12 月 1 日～12 月 4 日。神戸国際展示場(兵庫・神戸)。

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～12 月 17 日。安芸グランドホテル(広島・廿日市)。

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 25 日～11 月 27 日。パシフィコ横浜(神奈川・横浜)。

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 15 日～10 月 18 日。国立京都国際会館・グランドプリンスホテル京都(京都・京都)。

池田真教、田中耕三。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 3 日～9 月 6 日。蓼科グランドホテル滝の湯(長野・茅野)。

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

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

6．研究組織

(1)研究代表者

池田 真教（IKEDA, Masanori）

東北大学・加齢医学研究所・教育研究支援者

研究者番号：80645010

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし