

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370082

研究課題名（和文） 動原体ストレッチングによる紡錘体形成チェックポイントの制御

研究課題名（英文） Role of kinetochore stretching in controlling the spindle-assembly checkpoint

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

研究成果の概要（和文）：

セントロメアに形成される微小管との結合装置である動原体は、染色体動態制御の中枢である。その動原体の重要な機能の一つは、微小管との結合を感知する「紡錘体形成チェックポイント」の発信にあるが、微小管との結合がどのようにしてこの信号の発信を止めるのかはよく分かっていない。本研究では「動原体のストレッチング」という現象が、チェックポイントを解除するために必要であるという発見（内田ら、2009）に基づいて、ストレッチングの背景を調べることによって、この命題に取り組んだ。動原体ストレッチングを起こす分子背景は見出せなかったものの、微小管の重合と脱重合による微小管先端の伸び縮みを、動原体が受容し、その結果、動原体の形態が変化してストレッチするということが判明した。さらに、微小管が動原体に結合しているものの「張力」が発生しない状況（単極性の紡錘体、クロモキネシンのノックダウン、染色体腕部が殆どない人工染色体）を作り出したところ、それでもなお動原体のストレッチングは両方向性を獲得した場合と同程度に観察された。これらの結果より、チェックポイントは張力を感知しないという可能性が強く示唆され、チェックポイントの理解に新たな視点を提供した。

研究成果の概要（英文）：

Faithful segregation of chromosomes relies on the spindle-assembly checkpoint (SAC), which delays anaphase onset until all kinetochores are attached to microtubules (MT). The SAC monitors MT attachment at kinetochores, but whether it also senses the presence of 'tension' has long been a matter of debate. We found that 'tension' applied across sister kinetochores, which stretches centromeres, is dispensable, but stretching of kinetochores is required for silencing the SAC (Uchida et al., 2009). It is therefore crucial to investigate if 'tension' underlies kinetochore stretching. We addressed this question experimentally by engineering the conditions that microtubules are attached to kinetochores but free from the pulling force. Under these conditions, we found that kinetochores underwent stretching upon MT attachment. These results suggest that intact kinetochore-pulling force is not required for kinetochore stretching, thus challenging the notion that SAC directly monitors the presence of tension.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2010年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：細胞分裂、染色体、動原体、微小管、M期チェックポイント、中期後期移行

## 1. 研究開始当初の背景

1) 細胞周期の中でゲノムの継承を正確に進めるための仕掛けはいくつか存在するが、中でも分裂期において染色体が分離する直前に存在する「紡錘体形成チェックポイント」が最終検問として機能し、染色体継承の安定性を保証している。

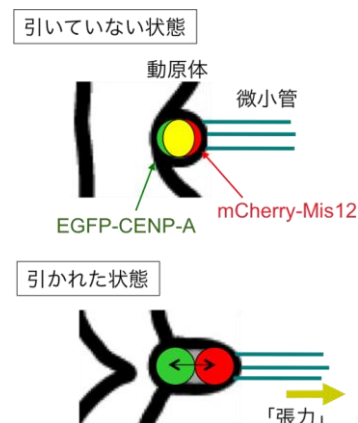
2) 紡錘体形成チェックポイントという名称は、紡錘体の形成を妨げる微小管阻害薬で処理することによって細胞が分裂期で停止する機能を指して付けられたが、その実体は、染色体の動原体と微小管の結合不全に反応して、その結合していない「未接続の動原体」から発信する抑制シグナルである。

3) 後期は、後期促進因子 APC/C というユビキチンリガーゼ複合体の活性により、その基質である M 期サイクリン(サイクリン B) あるいはセクリンと呼ばれるタンパク質を分解することで誘導されるが、紡錘体形成チェックポイントは APC/C の活性を抑制することにより後期への進行を阻害する。

4) 動原体が接続していても十分な「張力」(=微小管が動原体を極方向に引く力)が発生しなければ、やはり紡錘体形成チェックポイントが作動して後期への進行を妨げることが酵母からヒト細胞までが備え持つ染色体分配を制御する普遍的な機構であることが知られている。つまり、両方向性を獲得した後でも張力が不足すると中期の進行が大幅に遅延しうる。この観察は張力の必要性を

示しているが、張力が不足すると動原体と微小管の結合が脆弱化するという特性があるために、張力不足そのものがチェックポイント信号を発信させるのかどうかは明らかではない。

5) 我々は先行研究において、動原体にかかる張力を可視化する目的で、動原体を構成する2つのタンパク質 CENP-A と Mis12 を 緑と赤の蛍光色素で標識した細胞を作り出した(特別領域研究、平成 18-19 年度)。



これを用いて解析した結果、「動原体は弾性構造体であり、両方向性獲得後、継続的に動原体の変形を繰り返す」ことを見出し、この現象を「動原体ストレッチング」と命名した。

## 2. 研究の目的

本研究では、「動原体ストレッチング」の分子機構とその意義を明らかにすることで、「張力」はチェックポイント機構に感知されるのかという命題にアプローチすることを目的とした。これまでの観察に基づくと、「動原体は弾性構造体であり、その繰り返されるストレッチングが紡錘体形成チェックポイ

ントのサイレンシングを促進し、中期から後期への移行を促進する」という作業仮説が導き出されるので、これを検討する。こうした研究を進めることで、染色体の分離というクライマックスに向けて分裂中期にどのような意義があり、後期開始がいかに制御されているのかの理解を目標とした。

### 3. 研究の方法

動原体のストレッチングは 微小管と動原体の外層との相互作用によってもたらされると考えられるので、そこに存在するモーター分子や分裂期キナーゼの役割を調べることにより、ストレッチングの分子メカニズムに迫る。また、後期促進因子 (APC/C) 活性のモニタリング系を開発し、紡錘体形成チェックポイントの不活性化における動原体ストレッチングの必要性と、チェックポイントの不活性化を誘導する分子機構の検討を通じて、張力の意味を究明する。具体的には以下の実験を行うことにした。

1) 紡錘体形成チェックポイント活性のモニタリング系の構築：紡錘体形成チェックポイントの解除は APC/C の活性化をもたらす、その結果、その基質であるサイクリン B とセキユリンの分解がおこる。従って、チェックポイント活性の「読み出し」として、サイクリン B の細胞内量をモニターする系を作り、動原体ストレッチングの有無によるサイクリン B の分解速度を調べる。

2) 動原体ストレッチングをもたらす分子背景の解析：微小管による動原体の牽引力の発生には、モーター蛋白質の関与が考えられるので、その候補分子 Kif2a と Kif2b、CENP-E、Kif18a について調べる。またこれらのモータ

ーは Polo キナーゼ (Plk1) によって制御されていることが知られているので、Plk1 の動原体局在を阻害することにより Plk1 の関与を検討する。そして、いずれかの方法によりストレッチングを阻害したときのチェックポイントの反応性を検討する。

3) 「張力」とストレッチングの関連性の検討：微小管が動原体に結合しているもの「張力」が発生しない状況を、1) 単極性の紡錘体、2) クロモキネシンのノックダウンにより Polar wind を不応性にする、3) 染色体腕部が殆どない人工染色体、を実験的に作成し、ストレッチングの発生を定量する。

4) 動原体における微小管との結合力を、Aurora B の活性を調節することによって変化させ、動原体ストレッチングへの影響を検討する。まずは Aurora B の阻害薬処理、ついで、Aurora B の基質として知られる Ndc80 の非リン酸化型変異体細胞を作成して検討する。

### 4. 研究成果

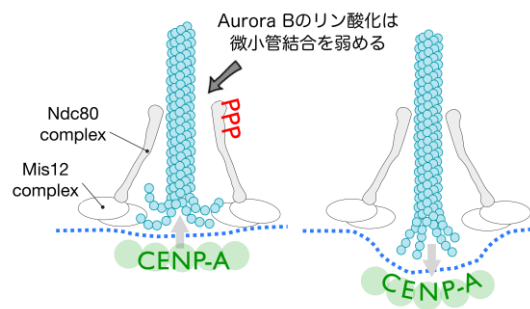
1) ストレッチングの発生と APC/C の活性化に関連性を検討したところ、動原体のストレッチング」という動原体の形態変化が、チェックポイントを解除するために必要であることを見出した。ストレッチングしている動原体の数を増やすことによって APC/C の活性化の速度が速くなることが判明した。従って、動原体のストレッチングは、チェックポイントを解除するというよりは、むしろ細胞を中期から後期への移行を誘導する反応の駆動力となっていることを示唆した。

2) ストレッチングの発生にかかわると思われた上記のモータタンパク質のノックダウ

ンを行ったが、いずれにおいても、ストレッチングの発生は大きく影響されなかった。また、既知の Plk1 を動原体に局在させるメカニズムの経路を阻害しても Plk1 の局在は大きく影響されることがなかった。そのため、ストレッチングを阻害したときのチェックポイントの反応性を検証することができなかった。

3) 単極性紡錘体を観察したところ、ストレッチングの発生には、微小管結合は必要であるものの、必ずしも動原体を引く力「張力」は必要でないことが示唆された。次いで、この可能性を検証するために、これをヒトの人工染色体を恒常的に発現する細胞を作成し、染色体腕部を欠如しているために動原体に引く力が作用し得ない状況をつくった。その結果、こうした動原体においても、ストレッチングは通常の発生頻度で観察され、ストレッチングは「張力」によって発生する訳ではないことが判明した。

4) 微小管のダイナミクスを抑えるとストレッチングは消失した。そして、Aurora B 活性を低下した状態、あるいは Aurora B の標的基質と思われる動原体分子 Ndc80 の非リン酸化型変異体を発現させて、微小管先端を側面から捕捉する力を強めた状態においては、ストレッチングの発生頻度が上昇することがわかった (右図参照)。このことから、ストレッチングは、微小管の重合と脱重合による微小管先端の伸び縮みを、動原体が受容し、その結果、動原体の形態が変化しているという新たな視点が導き出された。



5) 紡錘体形成チェックポイントと関連のある動原体ストレッチングの発生に、いわゆる張力が関与しないという発見は、即ち、チェックポイントは張力を感知しないという可能性を示唆する。この視点は、チェックポイント信号の発生のメカニズムを刷新するものである。

#### 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9件、全て査読有り)

1: Abe, S., Nagasaka, K., Hirayama, Y., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Aoyagi, Y., Obuse, C., and \*Hirota, T. (2011). The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II. *Genes Dev.* 25, 863-874.

2: Ito, G., Kanno, S., Uchida, K.S.K., Chiba, S., Sugino, S., Watanabe, K., Mizuno, K., Yasui, A., Hirota, T., and \*Tanaka, K. (2011). CAMP (C13orf8, ZNF828) is a novel regulator of kinetochore-microtubule attachment. *EMBO J.* 30, 130-144.

3: Smith, E., Hegarat, N., Vesely, C., Roseboom, I., Streicher, H., Straatman, K., Flynn, H., Skehel, M., Hirota, T., Kuriyama, R., \*Hochegger, H. (2011) Differential control of Eg5 dependent centrosome separation by Plk1 and Cdk1. *EMBO J.* 30: 2233-2245.

4: Abe, Y., Okumura, E., Hosoya, T., \*Hirota, T., and \*Kishimoto, T. (2010). A single starfish Aurora performs dual functions of Auroras A and B in human cells. *J. Cell Sci.* 123, 3978-3988.

5: Nozawa, R., Nagao, K., Masuda, H., Iwasaki, O., Hirota, T., Nozaki, N., Kimura, H., and \*Obuse, C. (2010). Human POGZ modulates HP1 dissociation from mitotic chromosome arms through Aurora B activation. *Nat. Cell Biol.* 12, 719-727.

6: Ohishi, T., Hirota, T., Tsuruo, T., \*Seimiya, H. (2010) TRF1 mediates mitotic abnormalities induced by Aurora-A overexpression. *Cancer Res.* 70: 2041-2052.

7: Kodama, M., Otsubo, C., Hirota, T., Yokota, J., Enari, M., \*Taya, Y. (2010) Requirement of ATM for Rapid p53 Phosphorylation at Ser46 without Ser/Thr-Gln Sequences. *Mol. Cell. Biol.* 30: 1620-1633.

8: Uchida, K.S.K., Takagaki, K., Kumada, K., Noda, T., and \*Hirota, T. (2009). Kinetochore stretching inactivates the spindle assembly checkpoint. *J. Cell Biol.* 184, 383-390.

9: Tanaka, K., and \*Hirota, T. (2009). Chromosome segregation machinery and cancer. *Cancer Sci.* 100, 1158-1165.

[学会発表] (計 3 7 件)

1: Hirota, T. How chromosome assembly is triggered in cells entering mitosis. 6th UK-Japan Cell Cycle Meeting. 2011.04.10-13 (Windermere)

2: Hirota, T. How chromosome assembly is triggered in cells entering mitosis. Impromptu Seminar at the IMP. 2011.04.14 (Vienna)

3: 広田 亨. がん細胞における異数性の発生要因を考える. 要望講演. 第 52 回日本臨床細胞学会総会. 2011.05.20-22. (福岡)

4: Hirota, T. Probing separase activity reveals its switch-like activation at the metaphase-to-anaphase transition. The 2<sup>nd</sup> Dynamic Kinetochore Workshop. 2011.06.15-18 (Vienna)

5: 広田 亨. 染色体分離の同期性を保証するメカニズム. 北海道大学大学院・先端生命科学研究所・分子生物学特別セミナー. 2011.06.24. (札幌)

6: Hirota, T. Probing separase activity reveals its switch-like activation at the metaphase-to-anaphase transition. The MEXT Priority Research International Symposium "Cell Division". 2011.06.29-07.01 (Hakone)

7: Hirota, T. The switch-like activation of separase ensures chromosome segregation. The GCOE International Workshop "Mitosis". 2011.07.04 (Yokohama)

8: Hirota, T. Heterochromatin protein 1 is an essential component of the chromosomal passenger complex to prevent missegregation of chromosomes. 平成 23 年度遺伝研研究会「クロマチンダイナミクスの分子機構」 2011.10.20 (三島)

9: 広田 亨. 染色体分離の正確性を保証するメカニズム. ケミカルバイオロジー勉強会・理化学研究所. 2011.10.26. (和光)

10: Hirota, T. How mitotic kinases control chromosome segregation. 熊本大学 GCOE・リエゾンラボ研究会. 2011.11.02 (熊本)

11: Shindo, N., Hirota, T. Dual role of separase during the metaphase-to-anaphase transition ensures chromosome segregation in mammalian cells. Annual meeting of American Society of Cell Biology. 2011.12.03-09 (Denver)

12: Hirota, T. Probing separase activity reveals its switch-like activation at the metaphase-to-anaphase transition. 第 30 回日本分子生物学会. シンポジウム. 2011.12.13-16 (横浜)

13: Uchida, K.S.K., Hirota, T. Does the spindle-assembly checkpoint monitor the presence of tension? 第 30 回日本分子生物学会. ワークショップ. 2011.12.13-16 (横浜)

14: 進藤軌久, 広田 亨. Separase は染色体分離において一人二役を果たす. 第 29 回染色体ワークショップ. 2012.1.25-27 (秋保温泉)

15: 熊田和貴, 広田 亨. Separase の自己切断による染色体分配制御. 第 29 回染色体ワークショップ. 2012.1.25-27 (秋保温泉)

16: 阿部優介, 広田 亨. アナログ感受性変異体による Greatwall キナーゼの機能解析. 第 29 回染色体ワークショップ. 2012.1.25-27 (秋

保温泉)

17: 広田 亨. がん細胞における異数性の発生要因を考える. 第28回新潟県立中央病院集談会・特別講演 2012.03.02 (上越)

18: 広田 亨. ヒト細胞における染色体の分配機構. 国立がん研究センター研究所. セミナー. 2010.05.28. (東京)

19: 広田 亨. 染色体分離の瞬間を規定するメカニズム. かずさ DNA 研究所. セミナー. 2010.09.17. (木更津)

20: Hirota, T. How chromosomes are assembled in cells entering mitosis. The MEXT Priority Research International Symposium "Mitosis". 2010.11.08. (Tokyo)

21: Shindo, N., Hirota, T. Visualization of separase activity defines the activation timing at the metaphase-to-anaphase transition. Annual meeting of American Society of Cell Biology. 2010.12.11 (Philadelphia)

22: 高垣謙太郎, 内田和彦, 広田 亨. Aurora B は HP1 $\alpha$  の動態制御を介し安定した染色体分配を保証する. 第 69 回日本癌学会学術総会. 2010.09.20-22 (大阪)

23: 田中耕三、伊藤 剛、安井 明、広田 亨. 新規 Mad2L2 結合分子 CAMP によるキネトコア—微小管結合の制御. 第 69 回日本癌学会学術総会. 2010.09.20-22 (大阪)

24: 長坂浩太、阿部聡司、広田 亨. The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II. 第 33 回日本分子生物学会年会. 2010.12.07-10 (横浜)

25: リナ・マルセロ・ガジェゴ・パエツ、坂東優篤、広田 亨、白髭克彦. Characterization of the Smc5/6 complex in human cells. 第 33 回日本分子生物学会年会. 2010.12.07-10 (横浜)

26: 長坂浩太、阿部聡司、広田 亨. Cdk 1 による Condensin II のリン酸化が染色体凝縮を誘導する. 第 28 回染色体ワークショップ. 2011.1.11-13 (山代温泉)

27: 進藤軌久、広田 亨. セパレーズの可視化でわかってきたこと. 第 28 回染色体ワー

クショップ. 2011.1.11-13 (山代温泉)

28: 田中耕三、伊藤 剛、安井 明、広田 亨. 新規 Mad2L2 結合分子 CAMP によるキネトコア—微小管結合の制御. 第 28 回染色体ワークショップ. 2011.1.11-13 (山代温泉)

29: Hirota, T. Kinetochores stretching promotes the metaphase-to-anaphase transition. 61st Annual Meeting of the Japanese Society for Cell Biology. 2009.06.02-04 (Nagoya)

30: Hirota, T., Kishimoto, T. Organizer: The MEXT Priority Research International Workshop "Chromosome segregation machinery" 2009.06.05 (Tokyo)

31: Hirota, T. How chromosomes segregation is triggered in human cells. Seminar at Eidgenössische Technische Hochschule Zürich (ETHZ). 2009.08.28 (Zurich)

32: Hirota, T., Uchida K.S.K. Kinetochores stretching promotes the metaphase-to-anaphase transition. FASEB Meeting "Mitosis: Spindle assembly and function" 2009.08.30-09.04 (Lucca)

33: Hirota, T. How mammalian cells trigger chromosome segregation at the correct time. Seminar at European Molecular Biology Laboratories (EMBL). 2009.11.23 (Heidelberg)

34: 広田 亨. ヒト細胞における染色体分離の制御. 東京大学医科学研究所. GCOE 特別セミナー. 2009.11.18. (東京)

35: 高垣謙太郎、広田 亨. Aurora B は HP1 $\alpha$  の動態制御を介し安定した染色体分配を保証する. 第 27 回染色体ワークショップ. 2010.1.20-22 (御殿場)

36: 進藤軌久、広田 亨. ヒト細胞における染色体分離開始とセパレーズ活性化のタイミング. 第 27 回染色体ワークショップ. 2010.1.20-22 (御殿場)

37: Hirota, T. Toward targeting chromosome segregation machinery for cancer therapeutics" 8th Annual meeting of Japanese Society of Medical Oncology. 2010.03.29 (Tokyo)

〔図書〕（計5件）

1: Nagasaka, K., Gallego-Paez, L.M., \*Hirota, T. (2011) Mitosis and Meiosis: Molecular Control of Chromosome Separation. Review. Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons, Ltd.

2: Kumada, K., \*Hirota, T. (2011) Separase. Review. Handbook of Proteolytic Enzymes 3rd Edition, Elsevier.

3: 広田 亨 (2010) 「染色体動態を制御する動原体微小管のダイナミクス」 細胞工学 29 (9) 862-867

4: 広田 亨 (2010) 「紡錘体形成チェックポイント」 細胞周期フロンティア・佐方功幸ほか編（東京、共立出版） pp 94-101.

5: 広田 亨、進藤軌久 (2009) ヒストンのリン酸化によるクロマチンの制御. 実験医学 26: 1353-1358

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

該当なし

○取得状況（計0件）

該当なし

〔その他〕

ホームページ

<http://www.jfcr.or.jp/tci/exppathol/index.html>

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者 広田 亨  
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) 研究分担者 なし
- (3) 連携研究者 高垣謙太郎  
公益財団法人がん研究会  
がん研究所・実験病理部  
博士研究員  
研究者番号：70419951

内田和彦

公益財団法人がん研究会  
がん研究所・実験病理部  
博士研究員  
研究者番号：40380555

進藤軌久

公益財団法人がん研究会  
がん研究所・実験病理部  
博士研究員  
研究者番号：00512253

熊田和貴

公益財団法人がん研究会  
がん研究所・実験病理部  
博士研究員  
研究者番号：10370149