

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580140

研究課題名(和文)サイクリンA-CDK活性の亢進による染色体恒常性破綻の分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanism underlying the breakdown of chromosomal homeostasis by aberrant activation of cyclin A-CDK

研究代表者

千葉櫻 拓(Chibazakura, Taku)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：30227334

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：動物細胞周期進行の中心制御因子の一つサイクリンA(CycA)-CDKの活性亢進は、複製開始因子Mcm7との相互作用を介したDNA複製期(S期)への移行促進や、中心体過剰複製・染色体倍数化を誘導し、染色体恒常性の破綻やがん化の促進に寄与すると考えられる。本研究でこれらの分子機構および関連性について解析した結果、(1) CycAとMcm7がヒト染色体の複製開始領域に共結合すること、(2) CycA-CDKの活性亢進は、既知の中心体複製・染色体分配制御因子Mps1を介さない未知の経路により染色体倍数化を誘導すること、(3) CycAのS期移行促進機能は染色体倍数化に関与しないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Aberrant activation of cyclin A (CycA)-CDK complex, one of the central regulatory factors for mammalian cell cycle progression, leads to the acceleration of entry into DNA replication phase (S phase) via interaction with a replication initiation factor Mcm7 and the induction of centrosomal overduplication and chromosomal tetraploidization, which both could contribute to a breakdown of chromosomal homeostasis and to carcinogenesis. In this study we analyzed the molecular mechanisms and correlation of the aforementioned phenomena, and revealed that (1) CycA and Mcm7 simultaneously bind to chromosomal replication initiation regions in human cells, (2) aberrant activation of CycA-CDK induces the chromosome tetraploidization via an unknown pathway not involving Mps1, a regulatory factor for the centrosomal duplication and chromosomal segregation, and (3) the CycA function promoting S-phase entry is not involved in chromosomal tetraploidization.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：細胞周期 がん サイクリンA サイクリン依存性キナーゼ Mcm7 S期移行 染色体倍数化

## 1. 研究開始当初の背景

細胞周期進行の中心制御因子であるサイクリン-サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 複合体は、細胞周期時期および個体組織の発生分化段階において厳密な時空間的制御を受けている。その活性制御異常は細胞の増殖・分化制御の破綻を誘導する要因となることから、がん・発生異常・老化等の疾患に深く関わるものとして極めて重要である。研究代表者らは、哺乳動物細胞において G1/S 遷移期から M 期中期にかけて発現し、細胞周期の最重要ステップである染色体複製と細胞分裂を制御するサイクリン A (CycA)-CDK 複合体の活性亢進が、S 期移行促進や染色体倍數化を誘導することを見出してきた (下記)。サイクリン A は多くのがんにおいて発現量が増大または脱制御されており、細胞増殖の加速や染色体不安定化を介して染色体恒常性の破綻、さらにはがん化の初期過程に関与することが示唆される。しかしながら、CycA-CDK の活性亢進による S 期移行促進と染色体倍數化の分子メカニズム、および両者の関連性については未だ不明であり、その解明は細胞周期制御と染色体恒常性維持、また発がん機構の基礎的理解において重要な課題と考えられる。

(1) 研究開始当初における研究代表者らの研究成果

①サイクリン A-CDK は Mcm7 との相互作用を介して S 期移行を促進する：動物細胞のクロマチン画分において CycA と複製ライセンス化因子 Mcm7 が相互作用すること、Mcm7 と相互作用できない変異型 CycA (CycA-C1) は S 期移行を促進しないこと、さらに CycA-C1 変異体と相互作用できる Mcm7 変異体により CycA-C1 変異体の S 期移行促進機能が回復することを見出し、CycA-CDK 複合体が Mcm7 との相互作用を介して S 期移行を促進することを初めて明らかにした。

②サイクリン A-CDK の恒常的活性化は中心体過剰複製を介して染色体倍數化を誘導する：M 期中期～G1 期での CycA-CDK の不活性化が CycA のタンパク質分解と CDK 阻害因子 (CKI; p21, p27 及び p107) による二重の制御を受けていること、分解抵抗性 CycA 変異体 (CycA $\Delta$ 80) を CKI 三重欠損細胞で発現させ CycA-CDK を恒常的に活性化すると、中心体過剰複製・染色体分配阻害により染色体倍數化を誘導すること、さらにこれらの現象は他のサイクリンでは見られず、CycA 特異的であることを明らかにした。

(2) 研究開始当初における国内外の関連する研究動向と本研究の位置づけ

in vitro 系でのサイクリン-CDK による複製開始因子の制御機構の解析は国内外ともに急速に進展してきたが、哺乳動物細胞において in vivo の表現型に基づいた解析は殆どなされておらず、in vivo 機能を欠損する CycA 変異体に基づく本研究は非常に重要な

位置にある。特に、通常の増殖サイクルにおいて複製開始因子群のクロマチンへのローディングに CycE が不要であることから、CycA による複製開始制御機構の解明が待たれていた。また国外では、酵母・ハエの系において S 期 CDK の活性亢進による複製進行異常と染色体不安定化の解析が進んでおり、哺乳動物の系では CycE の過剰発現による同様の現象が報告されていたが、より生理的レベルに近い CycA の恒常的発現と CKI 欠損による染色体倍數化の解析は本研究のみであった。

一方、CycA の中心体複製制御への関与については、主に国外において分子機構解析が多くなされていたが、CDK 依存的に中心体複製促進因子 Mps1 を安定化させて中心体複製を正に制御する場合と、CDK 非依存的に Mps1 以外の中心体複製抑制因子を中心体に局在させて中心体複製を負に制御する場合の異なるモデルが提唱されており、本研究における中心体過剰複製機構とこれらのモデルとの相関性を明らかにすることが急務であった。また、CycE が中心体に局在することが染色体複製開始に必要なとの報告もあり、CycA-CDK 活性亢進による中心体過剰複製と S 期移行促進との関連性の解明も重要な課題であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記の研究成果をさらに発展させ、研究期間内に (1) CycA-CDK と Mcm7 の相互作用が S 期移行を促進させる分子機構 (2) CycA-CDK の活性亢進による中心体過剰複製・染色体倍數化の分子機構 (3) CycA-CDK の活性亢進による S 期移行促進と中心体過剰複製との関連性について明らかにすることにより、CycA-CDK 複合体の活性亢進が細胞周期進行異常と染色体不安定化を介して染色体恒常性を破綻させる分子機構の統合的な解明を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) CycA-Mcm7 相互作用が S 期移行を促進させる分子機構：次世代シーケンサーを用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP)-Seq 解析による in vivo における染色体複製開始領域での CycA-Mcm7 相互作用解析、および内在性 CycA 欠損細胞において野生型・変異型 CycA (CycA-C1) が複製開始段階へ及ぼす影響の解析を行う。

(2) CycA-CDK の活性亢進による中心体過剰複製・染色体倍數化の分子機構：既知の中心体複製制御因子との関連性の検証、倍數化を誘導しない CycA 変異体の分離とその中心体への局在解析、倍數化誘導に必要な CycA 標的因子の探索を行う。

(3) S 期移行促進と中心体過剰複製との関連性：CycA-C1 変異体が中心体複製・染色体倍數化に及ぼす影響、染色体倍數化を誘導しない CycA 変異体が S 期移行促進に及ぼす影

響を検証する。

#### 4. 研究成果

##### (1) CycA-Mcm7 相互作用が S 期移行を促進させる分子機構の解析

①CycA が複製開始因子 Mcm7 との結合により S 期移行を促進することは既に示していたが、両者が染色体上の複製開始領域において相互作用しているかどうかを検証するため、ゲノムワイドな ChIP-Seq 解析を行った。

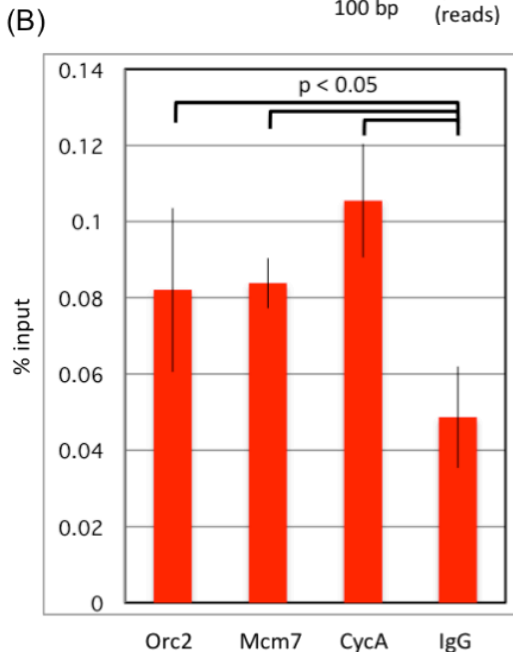
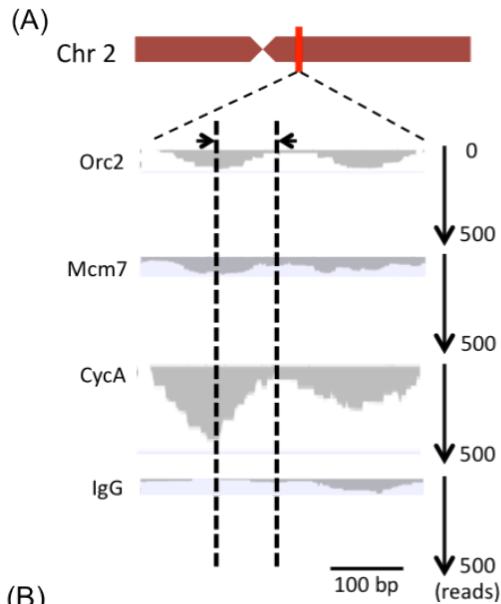


図1 抗 Orc2, Mcm7, CycA,抗体およびコントロール IgG による ChIP-Seq 解析例。(A) ヒト第 2 染色体上赤線で示した領域にマップされたシーケンスリードのピークを下に示す(縦矢印は 500 リードに相当)。(B) ChIP 後(A)中の破線で示した領域について定量的 PCR を行った結果を示す。

ヒト培養細胞抽出液より複製開始領域結合因子 Orc2, Mcm7, CycA 各々に対する抗体、およびコントロール抗体 (IgG) を用いた ChIP を行い、それぞれに含まれる染色体

DNA の配列を次世代シーケンサーにより解読し、染色体上にマップした。その結果、Orc2, CycA, Mcm7 が共通に結合しているヒト染色体領域が複数同定された。また、それらの ChIP サンプルにおいて結合領域 DNA の定量的 PCR を行ったところ、コントロール IgG と比べて有意に多かった。一例を図 1 に示す。さらに、これらの結合領域は既報のヒト染色体複製開始領域と重複していた。以上より、CycA と Mcm7 が *in vivo* で染色体複製開始領域において相互作用することが初めて明らかとなり、CycA による複製開始複合体制御の分子的基盤が示された。

しかしながら、次世代シーケンサーデータ解析ソフトウェアによりコントロールと有意差がある ChIP ピークとして抽出された染色体領域は膨大な数であったが、それらの 99% 以上はデータの目視による確認で非特異的なピークであることが判明し、解析ソフトウェアの欠陥が指摘された。そのため、現在約 20,000 箇所以上と推定されているヒト全ゲノム複製開始領域数に比べて、実際に特異性・有意差の確認出来た領域は非常に少なく (12 箇所)、今後ソフトウェアの改良を含めた検証が不可欠である。

②野生型 CycA と Mcm7 結合能欠損変異体 (CycA-C1) が複製開始段階へ及ぼす影響を明確に解析するため、CycA 欠損マウス繊維芽細胞株に野生型および C1 変異型 CycA の誘導発現系を用いた安定導入を試みたが、導入の過程で細胞が老化してしまうため、CycA 誘導発現系の安定導入は困難であった。今後 CycA 発現系の一過的導入の高効率化と、それによる複製開始段階への作用解析系の構築が必要である。

##### (2) CycA-CDK の活性亢進による中心体過剰複製・染色体倍数化の分子機構の解析

①CycA による中心体複製制御に関与すると報告されている Mps1 の阻害剤またはノックダウンにより、CycA-CDK の活性亢進に依存せずに中心体の過剰複製および染色体倍数化が誘導されることが示された。即ち、Mps1 が中心体過剰複製・染色体倍数化を抑制しており、CycA-CDK の活性亢進は Mps1 を負に制御する可能性が考えられたが、Mps1 の過剰発現によっても CycA-CDK の活性亢進による染色体倍数化は抑圧されなかった。これらの結果より、CycA-CDK の活性亢進による中心体過剰複製・染色体倍数化の誘導に Mps1 は関与していないことが示唆された。CycA の中心体複製制御への関与については、CDK 依存的に Mps1 を安定化させて中心体複製を促進するモデルと、CDK 非依存的に数種の中心体複製抑制因子を中心体に局在させて中心体複製を抑制するモデルが提唱されているが、本研究の結果はいずれのモデルとも異なる新規の制御経路を示唆した。

②分解抵抗性 CycA  $\Delta$  80 変異体に多数の部

位特異的変異を導入し、CKI 三重欠損細胞で発現させて DNA 含量を検証した結果、染色体倍數化を誘導できない変異型 CycA を 1 種分離した。しかしこの変異体は CDK 活性化能を失っており、染色体倍數化が CDK 活性化に依存することは既知であったことから、染色体倍數化能を特異的に欠損した変異体ではなかった。さらに、最近報告された CycA の中心体局在配列の変異体も作製し、CDK 活性化能および染色体倍數化能を検証したところ、両者共に欠損していた。即ち、CDK 活性化能・中心体局在化能と染色体倍數化能を分離させるような変異型 CycA は得られず、そのような変異体を用いて倍數化誘導に必要な CycA 標的因子を探索することは出来なかった。

### (3) CycA-CDK の活性亢進による S 期移行促進と中心体過剰複製との関連性の検証

CycA の S 期促進機能が染色体倍數化へ関与するかどうかを検証するため、野生型および Mcm7 結合能欠損変異型 CycA-C1 を用いて CycA-CDK の活性を亢進させた結果、どちらの場合も染色体倍數化を誘導したことから、CycA の Mcm7 との相互作用を介する S 期促進機能は染色体倍數化に関与しないことが示された。

### 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)

1. 千葉櫻 拓 「S 期の開始におけるサイクリン A の役割」生体の科学 64 巻 p. 284-291. (2013 年) 査読なし (招待論文)

ISID:2425101455

<http://ej.islib.jp/ejournal/2425101455.html>

[学会発表] (計 8 件)

1. 遠藤里佳子、針谷香澄、吉川博文、千葉櫻 拓 「高温ストレス下における細胞周期制御機構の解析」日本農芸化学会 2014 年度大会 2014 年 3 月 30 日 明治大学 (神奈川県)

2. 荒井拓也、浅野祐一、吉川博文、千葉櫻 拓 「がん細胞における p27 機能抑圧因子の探索」日本農芸化学会 2014 年度大会 2014 年 3 月 29 日 明治大学生田キャンパス (神奈川県)

3. 川上茉莉子、高橋究、桑村晴奈、小倉俊一郎、安部史紀、中島元夫、田中徹、吉川博文、千葉櫻 拓 「5-アミノレブリン酸によるがんの温熱細胞死増強機構の解析」第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 12 月 4 日 神戸国際展示場 (兵庫県)

4. 千葉櫻 拓、鳥谷部唯、高橋究、川上茉莉子、芳賀葉月、小倉俊一郎、安部史紀、中島元夫、吉川博文、田中徹 「5-アミノレブリン酸による温熱条件下でのがん細胞死増強作用」日本農芸化学会 2013 年度大会 2013 年 3 月 27 日 東北大学 (宮城県)

5. 田辺史行、松本貴嗣、志波優、渡邊智、千葉櫻 拓、吉川博文 「サイクリン A と複製開始因子 Mcm7 のヒト染色体上での相互作用解析」日本農芸化学会 2013 年度大会 2013 年 3 月 26 日 東北大学 (宮城県)

6. Chibazakura, T., Toriyabe, Y., Takahashi, K., Kawakami, M., Ogura, S., Abe, F., Nakajima, M., Tanaka, T. "Enhancement of hyperthermia-induced tumor cell death by 5-aminolevulinic acid." The 11th international Congress of Hyperthermic Oncology & The 29th Japanese Congress of Thermal Medicine (招待講演) 2012 年 8 月 31 日 ハイアットリージェンシー京都 (京都府)

7. 藤本香子、小林由香利、吉川博文、千葉櫻 拓 「高温ストレスによるがん特異的な細胞死誘導機構の解析」日本農芸化学会 2012 年度大会 2012 年 3 月 25 日 京都女子大学 (京都府)

8. 板東佳治、吉川博文、千葉櫻 拓 「がん細胞における高温ストレス下での CDK 活性制御解析」第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 16 日 パシフィコ横浜 (神奈川県)

### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

千葉櫻 拓 (CHIBAZAKURA, Taku)

東京農業大学・応用生物科学部・教授

研究者番号：30227334