

令和元年6月18日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02365

研究課題名(和文)がん染色体動態をもたらす染色体パセンジャー複合体の構造と機能

研究課題名(英文)Structure of chromosomal Passenger complex that causes chromosomal instability in cancers

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 25,700,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞の多くは、細胞分裂に伴う染色体の分配に失敗する「染色体不安定性」に陥っている。染色体を過不足なく分配するためには、染色体を分ける微小管と正確に結合することが必要で、それはAurora Bキナーゼによってなされていることが知られてたが、本研究で、このAurora Bが適正にはたらくためにはHP1によるアロステリックな活性化が必要であること、種々のがん細胞においてではAurora Bに結合するHP1の量が著しく減少していることが判明した。がんの染色体不安定性の背景を最も端的に説明する知見である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

増殖性の指標となる細胞の分裂をターゲットとする治療法はこれまで有望視されてきたものの、細胞分裂機構の破壊は、正常細胞にもダメージを与えてしまうというジレンマがあり、そこにどうやって風穴を開けるのが大きな課題であった。本研究により見出された「HP1のアロステリック効果」を糸口として、がん細胞におけるAurora Bの脆弱性をうまく利用することにより、がんの細胞分裂を選択的に標的とする新規抗がん治療の開発に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Incorrect attachment of kinetochore microtubules is the leading cause of chromosome missegregation in cancers. The highly conserved mitotic kinase Aurora B ensures faithful chromosome segregation through destabilizing incorrect microtubule attachments and promoting bi-orientation of chromosomes on the mitotic spindle. It was unknown whether Aurora B dysfunction affects chromosome segregation fidelity in cancers and, if so, how. Through this study, we show that HP1 is an allosteric activator of Aurora B, required to attain the high activity levels. The contribution of HP1 becomes particularly important when Aurora B phosphorylates kinetochore targets to eliminate erroneous microtubule attachments. Remarkably, a reduced contribution of HP1 is widespread in cancers, which causes an impairment in Aurora B activity. Our work shows that HP1 is an essential modulator for Aurora B's function and identify a molecular basis for chromosome segregation errors in cancer cells.

研究分野：細胞生物学、腫瘍生物学

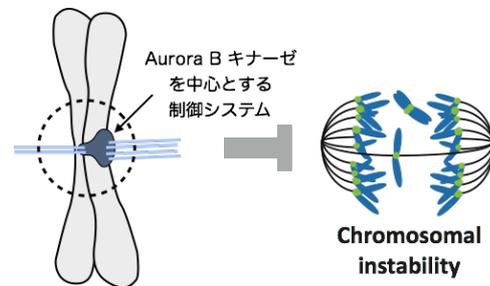
キーワード：細胞分裂 染色体不安定性 M期キナーゼ セントロメア 動原体 がん

1. 研究開始当初の背景

(1) 分裂期における染色体動態制御機能の破綻は、細胞の異数性（細胞あたりの染色体数の異常）を伴う病態と緊密に関連する。その最たる例ががんであり、生理的な細胞増殖制御が破綻したがん細胞は、ほぼ例外なく染色体の継承に失敗する「染色体不安定性」と呼ばれる細胞病態に陥っていることが知られている。最新のライブ・イメージング解析により、がん細胞の染色体不安定性の主因は、分裂期における染色体動態異常であることが示されていた (Backhoum et al., 2014)。一方で分裂制御因子の遺伝子変異は極めて稀であり、その分子背景はよくわかっていなかった (Reviewed in Tanaka and Hirota, 2009; Thompson et al., 2010)。

(2) 染色体を過不足なく分配するためには、染色体を分ける微小管と正確に結合することが前提で、その機能は、およそ全ての真核生物で、Aurora キナーゼの プロトタイプ である Aurora B が担う。細胞内で Aurora B は、INCENP、Survivin、Borealin と共に染色体パセンジャー複合体(CPC)を形成する。CPC はM期染色体のセントロメアに局在し、そこに高い Aurora B 活性を濃縮させることで、姉妹染色分体間の結合(Cohesion)を確実に保つとともに、動原体分子のリン酸化により微小管の結合エラーの解消を進め、染色体分配の失敗を未然に防いでいることが知られている。

つまり細胞は、Aurora B キナーゼを中心とする制御システムをセントロメアに備えることにより、安定で過不足のない染色体の分配を正確かつ確実に進めている (図)。



(3) 特記すべきは、この機能は Aurora B 活性を一部だけ抑制するによっても破綻し、微小管と動原体の不適切な結合を引き起こすことが知られている (Cimini et al., 2006)。こうした観察はがんの染色体不安定性の背景に Aurora B 機能の不十分さがあることを予測させていた。

(4) これまで Aurora キナーゼの研究を進め、その機能や制御に関する知見を蓄積してきた (Hirota et al., Nature 2005 など)。最も新しくは、M期にクロマチン分子の HP1 が、セントロメアに局在する CPC の INCENP に直接結合して、CPC の構成因子となり、アロステリックな機序で Aurora B を活性化するメカニズムを見出した。重要なことは、この HP1 の効果は、Aurora B 活性が動原体に及び結合エラーの解消に不可欠であったことから HP1 と CPC の結合が染色体不安定性と関連している可能性が浮かび上がっていた。

<引用文献>

Backhoum SF, Silkworth WT, Nardi IK, Nicholson JM, Compton DA, Cimini D. (2014) The mitotic origin of chromosomal instability. *Curr Biol.* 24: R148-149.

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

Thompson SL, Backhoum SF, Compton DA. (2010) Mechanisms of chromosomal instability. Review. *Curr Biol.* 20: R285-295.

Cimini D, Wan X, Hirel CB, Salmon ED. (2006) Aurora kinase promotes turnover of kinetochore microtubules to reduce chromosome segregation errors. *Curr Biol.* 16: 1711-1718.

Hirota T, Lipp JJ, Toh BH, Peters JM. Histone H3 serine 10 phosphorylation by Aurora B causes HP1 dissociation from heterochromatin (2005) *Nature.* 438: 1176-1180.

2. 研究の目的

CPC は Aurora B のキナーゼの活性によりM期における一連の染色体分配過程を制御する。とりわけ、微小管と動原体の結合という染色体分配の“要所”において不可欠な役割を担う。本研究では、染色体不安定性を伴う種々のがん細胞における Aurora B の機能を評価する。特に、アロステリックな活性化因子 HP 1 の関与を調べることで、セントロメアにおける Aurora B に焦点を絞って活性を見極める。こうして CPC 制御を基軸として、「正確な染色体動態を支える細胞機能」と「染色体不安定性の細胞病態」を明らかにすることを目的とする。こうしてがんにおける染色体分配システムの脆弱点をピンポイントで明らかにし、分裂期を介入点とした新たな治療法の開発基盤形成を目指す。

3. 研究の方法

(1) HP1 と CPC の結合および Aurora B 活性に対する効果を生化学的に検討する。リコンビナントタンパク質を調整して試験管内で起こる生化学反応を解析し、HP のもつアロステリック効果の機序を明らかにする。

(2) 分裂期細胞における HP1 と CPC の結合効果を検討する。HP1 との結合に必要なドメインを欠いた CPC を条件的に発現する細胞を作成し、表現系を解析し結合の意義を明らかにする。

(3) HP1 は M 期において Aurora B 依存性にリン酸化を受けることが判明しているのでその効果を検討する。リン酸化部位を同定しそこに変異を導入した場合の表現系を解析することにより、その意義を明らかにする。

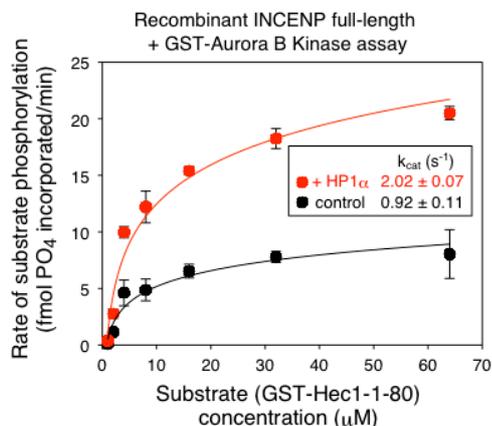
(4) 正常二倍体細胞と異数性を示すさまざまな臓器由来のがん細胞パネルを用いて、HP1 を結合した CPC 量を検討する。さらに、正常二倍体細胞に対してがん関連遺伝子を導入し細胞周期制御を破綻させた形質転換細胞を用いて、その HP1-CPC について解析する。こうして細胞の悪性化と CPC 組成や Aurora B キナーゼ活性の変化、その結果がセントロメア構造と機能にどのような影響があるかを明らかにする。

(5) 腫瘍組織における CPC の構造変化の検出を試みる。最終的には、こうして得られた「がん染色体動態」という細胞病態の理解に基づいた治療の介入点とその方策を探る。

4. 研究成果

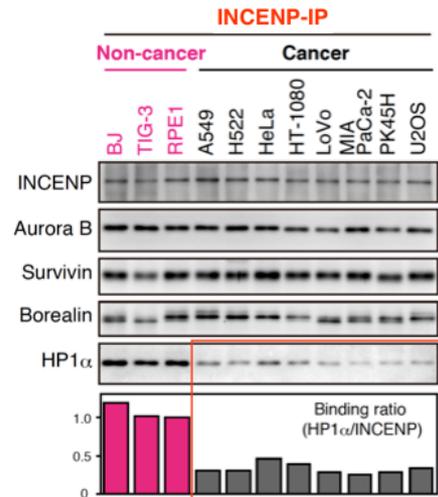
(1) Aurora B が十分なキナーゼ活性をもち適正に働くためにはHP1という補助分子の関与が不可欠であること、即ち、HP1はAurora Bのアロステリックな活性化因子であることを見出した。下図の酵素速度論的解析曲線が示すように、Aurora B キナーゼの酵素反応効率を示す k_{cat} 値はHP1の存在によって約2倍上昇するというデータが得られた。

(2) 細胞内でHP1と結合したAurora B複合体の量が減少するとAurora Bの機能が低下し、微小管の接続エラーが生じて染色体の分配が失敗するようになること示唆される。実際に、正常二倍体細胞においてHP1の結合を阻害したところ、細胞分裂像をイメージング画像で観察すると、染色体分配異常（細胞分裂異常）が誘導され、本仮説が正しいことが示された。



(3) 異数体化を示すがん細胞では、著明に CPC の HP 1 結合量が著明に低下していることを見出した。具体的には、正常細胞株と種々のがん細胞株のM期細胞を集めて、Aurora B 複合体 (HP1 α /INCENP) を免疫沈降により精製し、そこに共沈する HP1 の量を調べたところ、正常二倍体細胞株と比べ、調べ得た全てのがん細胞株で HP1 の結合量が著しく減少しているというデータが得られた (図)。

つまり、Aurora B に結合する HP1 の量が減少していること、そしてその結果、Aurora B の酵素活性が低下していることを見出すことができた。これらの知見に基づいて、「がん細胞では Aurora B 複合体の量的な不均衡を来した結果、Aurora B のはたらきが弱まり染色体の分配異常を誘発している」ことを提唱した (Abe et al. 2016 a)。



(4) CPC と HP1 の相互作用を促す正のフィードバック機構が明らかとなった。HP1 は CPC に対してアロステリックな活性化因子であるが、CPC に結合した HP1 は Aurora B によってそのヒンジ部のリン酸化を受け、その結果、HP1 と CPC の結合が安定化することが判明した (図)。

これらの観察より、HP1 と CPC の相互作用には正のフィードバック制御を備えることにより、安定して Aurora B が高い活性を維持していることが示めされた (Abe et al. 2016 b)。



(5) HP1 と CPC の結合量が減少する背景を検討した。まずがん細胞で HP1 の発現量を実験的に増加したところ、それらの外来性 HP1 が CPC と結合した分だけ、内因性 HP1 の結合量が減少した。つまりがん細胞では HP1 と結合容量が低下していることが分かった。正常二倍体細胞においてがん関連遺伝子を導入・不活性化して、いわゆる悪性形質転換を施すと、HP 1 の結合量が著しく減少したことから、がん細胞における細胞周期の制御破綻との関連性示唆された。

<引用文献>

Abe, Y., Sako, K., Takagaki, K., Hirayama, Y., Uchida, KSK., Herman, J., DeLuca, JG., and Hirota, T. (2016 a) HP1-assisted Aurora B kinase activity prevents chromosome segregation errors. *Dev. Cell.* 36: 487-497.

Abe, Y., Hirota, T. (2016 b) System-level deficiencies in Aurora B control in cancers. *Cell Cycle.* 15(16):2091-2092.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Konishi, M., Shindo, N., Komiya, M., Tanaka, K., Itoh, T., Hirota, T. (2018) Quantitative analyses of the metaphase-to-anaphase transition reveal differential kinetic regulation for securin and cyclin B1. *Biomed Res.* 39: 75-85. doi:10.2220/biomedres.39.75.
- ② 高橋元子, 広田 亨 (2017) M 期における染色体構築のメカニズム. *生化学* 89 (4): 515-524.
- ③ Takahashi, M., Wakai, T., and Hirota, T. (2016) Condensin I-mediated mitotic chromosome assembly requires association with chromokinesin KIF4A. *Genes Dev.* 30: 1931-1936. doi: 10.1101/gad.282855.116.
- ④ Nagasaka, K., Hossain, JM., Roberti, JM., Ellenberg, J., and Hirota, T. (2016) Sister chromatid resolution is an intrinsic part of chromosome organization in prophase. *Nat Cell Biol.* 18: 692-699. doi: 10.1038/ncb3353.

- ⑤ Abe, Y., Hirota, T. (2016) System-level deficiencies in Aurora B control in cancers. *Cell Cycle*. 15(16):2091-2092. DOI: 10.1080/15384101.2016.1185850
- ⑥ Abe, Y., Sako, K., Takagaki, K., Hirayama, Y., Uchida, KSK., Herman, J., DeLuca, JG., and Hirota, T. (2016) HP1-assisted Aurora B kinase activity prevents chromosome segregation errors. *Dev. Cell*. 36: 487-497. doi: 10.1016/j.devcel.2016.02.008
- ⑦ Takahashi, M., Tanaka, K., Wakai, T., and Hirota, T. (2016) Phosphoproteomic analysis of human mitotic chromosomes identified a chromokinesin KIF4A. *Biomed Res.* 37: 161-165. doi: 10.2220/biomedres.37.161.
- ⑧ Tanaka, K., and Hirota, T. (2016) Chromosomal instability: a common feature and a therapeutic target of cancer. Review. *Biochim Biophys Acta*. 1866: 64-75. doi: 10.1016/j.bbcan.2016.06.002.
- ⑨ Nagasaka, K. and Hirota, T. (2015) Clarifying the role of condensins in shaping chromosomes. News and Views. *Nat Cell Biol.* 17: 711-713 doi: 10.1038/ncb3183
- ⑩ Minamino, M., Ishibashi, M., Nakato, R., Akiyama, K., Tanaka, H., Kato, Y., Negishi, L., Hirota, T., Sutani, T., Bando, M., and Shirahige, K. (2015) Esco1 acetylates cohesin via a mechanism different from that of Esco2. *Curr. Biol.* 25: 1694-706. doi: 10.1016/j.cub.2015.05.017.
- ⑪ 小西 惇、松高 愛、広田 亨 (2015) 染色体不安定性の成因. *細胞* 47 (5): 5-8.

[学会発表] (計 19 件)

- ① Toru Hirota “Molecular grounds underlying chromosomal instability in cancers” Seminar at Okinawa Institute of Science and Technology (OIST), Okinawa, 2018.01.31.
- ② Toru Hirota “Molecular grounds underlying chromosomal instability in cancers” 理化学研究所統合生命医科学研究センター・疾患生物学セミナーシリーズ, 横浜, 2017.12.25.
- ③ 広田 亨 「がん細胞における染色体制御システムの破綻」福井大学・学術研究院工学系部門・セミナー、福井市、2017.07.05.
- ④ Toru Hirota “Molecular grounds for chromosomal instability in cancers” 平成 29 年度名古屋大学大学院基盤医学特論・特徴あるプログラム・Cancer Science Course, 名古屋, 2017.06.29.
- ⑤ Toru Hirota “Kinetic control of the M/A transition in failsafe mitosis” The 76th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (JCA), Yokohama, 2017.09.29.
- ⑥ Toru Hirota “Cooperative acts of condensins and topoisomerases in shaping mitotic chromosomes.” The 2nd meeting on SMC proteins: Chromosomal organizers from bacteria to human, Nanyo Yamagata, 2017.06.13-16.
- ⑦ Toru Hirota “Kinetic control of the M/A transition in failsafe mitosis” SKKU International Symposium on Biomedical Science, Suwon Korea, 2016.10.
- ⑧ 広田 亨 「クロマチン分子 HP1 による Aurora B キナーゼの活性化：明かされつつあるがん染色体動態の分子背景」第 89 回日本生化学会大会、シンポジウム「疾患における細胞核・クロマチンの動態変動」、仙台市、2016.09.
- ⑨ 広田 亨 「分子イメージング顕微鏡解析法が見出した動原体のストレッチング」第 57 回日本組織細胞化学会総会・学術集会、共催ワークショップ：広がる超解像顕微鏡の世界。東京、2016.09.
- ⑩ 広田 亨 「がんにおける Aurora B システムの破綻：明らかになりつつある染色体不安定性の病理機構」金沢大学がん進展制御研究所セミナー、金沢市、2016.08.
- ⑪ 広田 亨 「分子イメージングによって見えてきたキネトコアの動的構造」第 68 回日本細胞生物学会大会・第 11 回日本ケミカルバイオロジー学会年会・合同大会、京都市、2016.06.
- ⑫ 広田 亨 「分子イメージングによって見出されたキネトコアの動的構造」よこはま NMR 研究会 第 55 回ワークショップ、横浜市、2016.03.
- ⑬ Toru Hirota “HP1-mediated allosteric regulation of Aurora B prevents chromosome segregation errors” International symposium on chromosome orchestration system. Awaji, 2016.03.
- ⑭ Toru Hirota “A system level deficiency of the chromosomal passenger complex in cancer cells” The 74th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (JCA) Nagoya, 2015.10.08
- ⑮ Toru Hirota “An origin of chromosome missegregation in mitosis” The 27th International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology, Seoul, 2015.09.21-23
- ⑯ 広田 亨 「がん細胞における染色体制御システムの破綻：明かされつつある染色体不安定性の分子背景」新学術領域・がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動・公開シンポジウム、東京、2015.09.09

- ⑰ 広田 亨「がんと染色体」第70回日本臨床細胞学会細胞検査士教育セミナー、神戸、2015.09.06
- ⑱ 広田 亨「がんと染色体」第69回日本臨床細胞学会細胞検査士教育セミナー、東京、2015.08.30
- ⑲ Toru Hirota “Dynamic deformation of kinetochores controls mitotic progression” The 4th Dynamic Kinetochores Workshop, Copenhagen (Denmark) 2015.05.18-22.

〔図書〕(計1件)

Uchida, KSK, and Hirota, T. (2016) Spindle assembly checkpoint: its control and aberration. DNA Replication, Recombination and Repair - Molecular Mechanisms and Pathology. Hanaoka and Sugawara ed. pp 429-447. Springer.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称：HP1 の機能に着目した抗がん剤のスクリーニング方法及び評価系

発明者：広田 亨、阿部 優介

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2016-035505

出願年月日：平成 29 年 2 月 27 日

国内外の別： 国内

○取得状況 (計1件)

名称：細胞観察用蛍光プローブ及びこれを使用する方法

発明者：広田 亨、進藤軌久、熊田和貴

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2014-010635

取得年月日：平成 26 年 1 月 26 日

国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等

① がん研究所実験病理部・広田研究室

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

② がん研究会がん研究所

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

③ Researchmap：広田 亨

https://researchmap.jp/toru_hirota/

アウトリーチ活動

① 広田 亨「知っておこう、がんのこと」穂積公民館講演会、小山市、2016年10月

② 広田 亨「がんと染色体」第70回細胞検査士教育セミナー、2015年9月6日

③ 広田 亨「染色体動態の制御とその破綻」東京都立日比谷高校・細胞生物学講義、2015年7月23日

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。