

平成 30 年 4 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04368

研究課題名(和文) 効率的な染色体整列による染色体安定性の維持機構の解明

研究課題名(英文) Maintenance of chromosomal stability by efficient chromosome alignment

研究代表者

田中 耕三 (Tanaka, Kozo)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：00304452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、染色体が紡錘体上で整列して正確に分配されるしくみについて研究を行った。染色体整列の過程では、染色体上の動原体が紡錘体を形成する微小管の側面に結合する状態(側面結合)を経て、末端に結合する状態(末端結合)に移行する。そこで側面結合に関与する分子の探索を行い、モーター分子であるダイニンやCENP-Eの関与を明らかにした。また側面結合と末端結合が協調的にはたらくことで、染色体が整列して正確に分配されることがわかった(Sci Rep, 2018)。さらに染色体安定性維持に重要な紡錘体チェックポイントに、分裂期キナーゼであるPlk1が関与することを明らかにした(Sci Rep, 2017)。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanisms of chromosome alignment on the spindle and faithful chromosome segregation. In the process of chromosome alignment, kinetochores on chromosomes first attach to the lateral surface of spindle microtubules (lateral attachment), and then attach to the end of microtubules (end-on attachment). We searched for molecules involved in lateral attachment, and found the involvement of the motor proteins, dynein and CENP-E. We also found that lateral attachment and end-on attachment cooperatively contribute to chromosome alignment and faithful chromosome segregation (Sci Rep, 2018). Furthermore, we revealed that a mitotic kinase Plk1 plays a role in the spindle assemble checkpoint, which is important for the maintenance of chromosomal stability (Sci Rep, 2017).

研究分野：細胞生物学・分子腫瘍学

キーワード：癌 細胞・組織 染色体

1. 研究開始当初の背景

ゲノムが安定に維持されるためには、細胞分裂に際して染色体が均等に娘細胞に分配されなければならない。大多数のがん細胞では染色体の数的・質的な異常が認められ、その背景には細胞分裂時に染色体が均等に分配されない状態、いわゆる染色体不安定性が存在する。染色体不安定性はがんの発生や進展に密接に関連していると考えられるが、その実体については未解明の点が多い。研究代表者らは染色体が均等に分配され、安定に維持されるしくみの解明に取り組んできた (H24~H26 基盤研究(B), H26~H27 新学術領域研究, *EMBO J*, 2011, *Cancer Sci*, 2013, *J Cell Sci*, 2014)。

染色体が均等に分配されるためには、まず染色体が紡錘体の赤道面に整列することが必須であり、通常この染色体の整列は核膜崩壊後 20 分程度の間に迅速に進行する。赤道面では染色体上の動原体が紡錘体微小管の末端に結合し(末端結合)、双方向性結合(複製された染色体の一对の動原体がそれぞれ異なる紡錘体極からの微小管と末端結合すること)を形成している(図1)。これまで

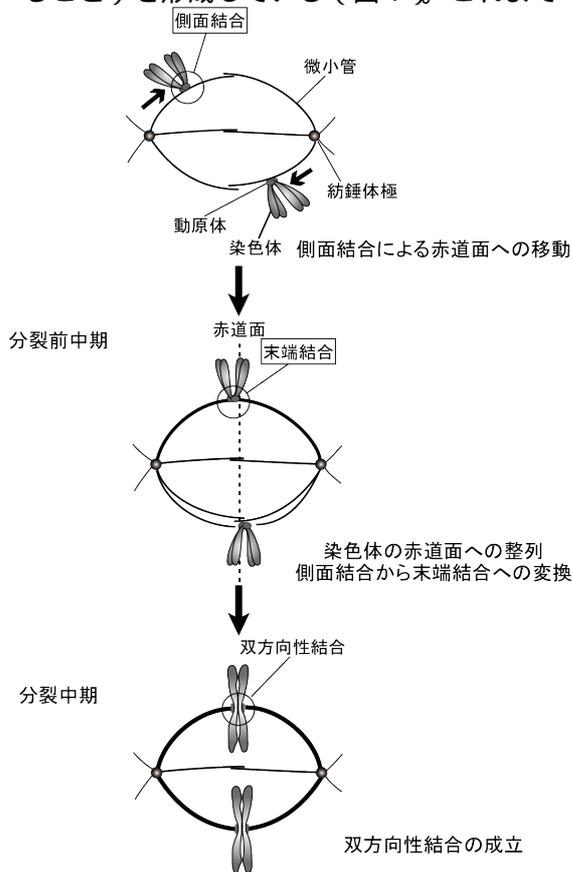


図1 双方向性結合の成立の過程

染色体は双方向性結合を形成した後赤道面に整列すると考えられていたが、最近染色体はまず側面結合(動原体が微小管の側面に結合すること)を形成して赤道面へと移動し、赤道面において双方向性結合が成立することが示唆された(図1)。赤道面では2つの紡錘体極からの微小管が等しい密度で存在するため双方向性結合が成立しやすい一方、

染色体が赤道面から離れていると2つの動原体が共に一方の極からの微小管と結合してしまうような誤った結合が成立しやすいと考えられる(図2)。このことは染色体が効

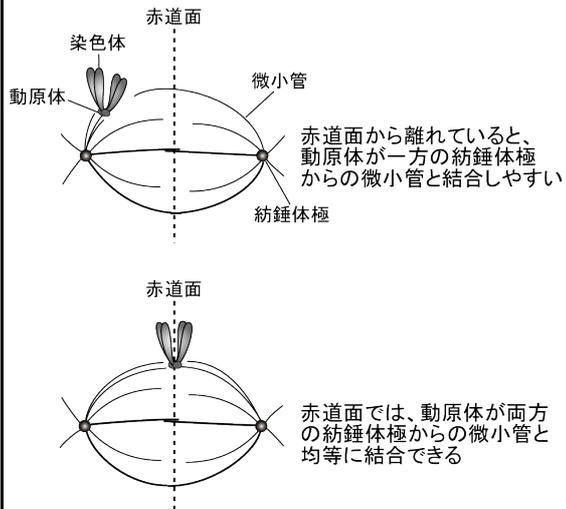


図2 双方向性結合の成立における染色体整列の重要性

率よく赤道面に移動しないと不適切な動原体と微小管の結合が形成されやすくなり、染色体の不均等な分配につながる可能性を示唆している。しかし側面結合の機構や側面結合による染色体の赤道面への移動の機構、側面結合から双方向性結合が形成される機構については不明な点が多い。そこでこれらの機構を明らかにし、効率的な染色体整列がおこるしくみを解明するという着想に至った。

2. 研究の目的

細胞分裂期の初期に染色体が紡錘体の赤道面に整列することは、その後染色体が娘細胞に均等に分配されるために必須である。本研究では染色体が安定に維持されるしくみについての応募者らのこれまでの研究をふまえ(H24~H26 基盤研究(B), *EMBO J*, 2011)、染色体の効率的な整列の機構とその染色体安定性維持への寄与について明らかにすることを目的とする。染色体の赤道面への移動は、染色体上の動原体と紡錘体微小管の適切な結合の形成に重要であると考えられ、これが迅速に進行しないと染色体の安定性が損なわれることが予想される。本研究では動原体と微小管の結合様式の変換という観点から、効率的な染色体整列のしくみを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 側面結合の分子機構の解明

これまでの研究から、分裂前中期(側面結合が多い)と分裂中期(末端結合が多い)では、動原体を構成する分子の種類は大きく異なることがわかっている。また側面結合と末端結合が共に損なわれると、染色体が紡錘体から離れてしまう。そこで末端結合に必須の分子である Hec1 と共に発現抑制すると、染色体が紡錘体から離れてしまう分子を、側面結

合に關与する分子として同定する。また側面結合時の動原体構造を、蛍光顕微鏡での画像取得後に電子顕微鏡観察用の切片を作成する CLEM(correlative light and electron microscopy)法によって詳細に観察する。

(2) 染色体整列の機構の解明

(1)で明らかになった側面結合と末端結合に關与する分子を発現抑制した際の染色体整列や染色体分配を調べ、染色体整列の機構を明らかにする。

(3) 側面結合から双方向性結合が形成される機構の解明

側面結合から末端結合へ変化する際に働く分子を同定するために、染色体分配過程初期の各段階における種々の動原体分子の局在を検討する。またこの過程に機能していると考えられる Plk1 の働きを明らかにする。

(4) 効率的な染色体整列と染色体安定性の関連の解明

これまでの結果をもとに染色体整列の効率性が失われる状況を作り、そのような状況で染色体不安定性が引き起こされるかどうかを検討する。

4. 研究成果

(1) 側面結合の分子機構の解明

側面結合に關係する分子を同定するために、キネトコアに局在する分子のうち微小管結合能をもつものを末端結合に必須の分子である Hecl と共に発現抑制し、染色体が紡錘体から離れてしまうものを検討した。その結果、モーター分子ダイニンのキネトコア局在に必要な Zw10 を Hecl と共に発現抑制すると、紡錘体から染色体が離れてしまう細胞の割合が増加した。このことからダイニンが側面結合に關与することが示唆された。これをふまえて分裂期初期の染色体動態を観察したところ、中心体方向への速い移動がダイニン依存性であることが明らかになった。興味深いことにダイニンがない状態でも微小管の短縮に依存して染色体のゆっくりした中心体方向への移動が起こることがわかった。そこでその原因を調べたところ、別のモーター分子である CENP-E が側面結合の状態で動原体を微小管末端に繋ぎ止め、それにより微小管の短縮に伴って動原体の中心体方向への移動が起こることが示唆された(図3; *Sci Rep* 2018)。さらに蛍光顕微鏡での画像取得後に電子顕微鏡観察を行う CLEM 法を用いて、側面結合時の動原体と微小管の観察を行った。

(2) 染色体整列の機構の解明

側面結合している染色体が紡錘体中央に整列する機構として、キネトコアに局在するモーター分子 CENP-E と染色体腕部に局在するモーター分子 Kid が、紡錘体の形成にともなって共同して染色体整列に關与することを明らかにした(*Nat Commun*, 2015)。またキネトコアに局在する微小管結合因子

CLIP-170 が、ダイニンのはたらきに対抗してキネトコアを微小管先端につなぎとめることで、側面結合から末端結合への変換に寄与する可能性が示唆された(*FEBS Lett*, 2015)。これをふまえて、側面結合と末端結合に關与する分子を発現抑制した際の染色体整列や染色体分配を比較することにより、側面結合が末端結合と強調して適切な動原体と微小管の結合にはたらいっていることが示唆された(*Sci Rep* 2018)。

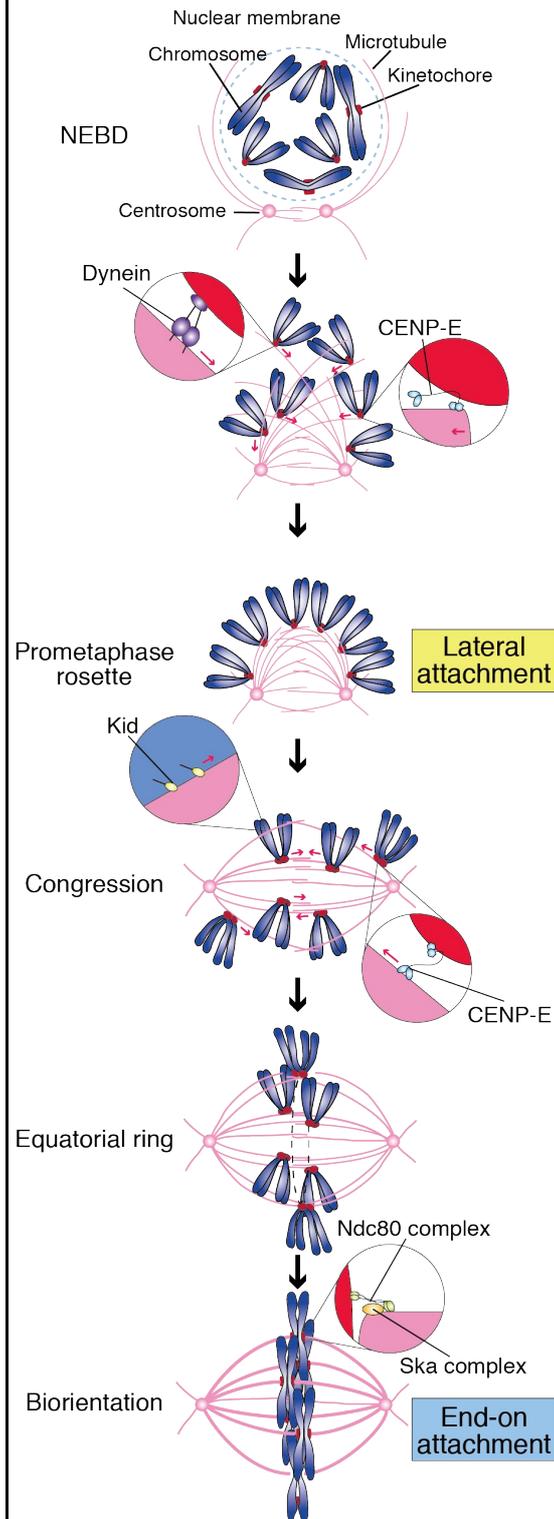


図3 染色体整列の機構

(3) 側面結合から双方向性結合が形成される機構の解明

染色体分配過程初期の各段階における種々の動原体分子の局在を検討し、側面結合から双方向性結合が形成される際に機能する分子の候補を同定した(*Sci Rep* 2018)。また分裂期キナーゼ Plk1 の紡錘体チェックポイントに関する機能を明らかにした(*Sci Rep* 2017)。

(4) 効率的な染色体整列と染色体安定性の関連の解明

Kid の発現抑制細胞では染色体整列に要する時間が延長し、染色体不均等分配や微小核が出現する頻度が上昇した。他のモーター分子の発現量を変化させた場合も同様の結果が得られた。これらのことから、効率的な染色体整列が染色体安定性に必要であることが示唆された。

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 11 件)

1. Itoh G*, Ikeda M* (*equally contributors), Iemura K, Amin MA, Kurimiya S, Tanaka M, Mizuno N, Osakada H, Haraguchi T, Tanaka K. Lateral attachment of kinetochores to microtubules is enriched in prometaphase rosette and facilitates chromosome alignment and bi-orientation establishment. *Sci Rep* (2018) 8, 3888. 査読有.
DOI: 10.1038/s41598-018-22164-5.
2. Ikeda M, Tanaka K. Plk1 bound to Bub1 contributes to spindle assembly checkpoint activity during mitosis. *Sci Rep* (2017) 7, 8794. 査読有.
DOI: 10.1038/s41598-017-09114-3.
3. 田中耕三. 染色体不安定性とがん. **血液内科** (2017) 75, 117-122. 査読無.
<http://www.kahyo.com/item/KS201707-751>
4. Tanaka K, Hirota T. Chromosomal instability: A common feature and a therapeutic target of cancer. *Biochim Biophys Acta* (2016) 1866, 64-75. 査読有.
DOI: 10.1016/j.bbcan.2016.06.002.
5. Takahashi M, Tanaka K, Wakai T, Hirota T. Phosphoproteomic analysis of human mitotic chromosomes identified a chromokinesin KIF4A. *Biomed Res* (2016) 37, 161-165. 査読有. DOI: 10.2220/biomedres.37.161.
6. 家村顕自, 田中耕三. 分裂期において染色体を効率よく運ぶための仕組み. **生化学** (2017) 89, 102-105. 査読無.
DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890102
7. Amin MA, Kobayashi K, and Tanaka K. CLIP-170 tethers kinetochores to microtubule plus ends against poleward force by dynein for stable

kinetochore-microtubule attachment. *FEBS Lett* (2015) 589, 2739-2746. 査読有.

DOI: 10.1016/j.febslet.2015.07.036.

8. Tanaka K. Mitosis. *eLS* (2015) 査読有.
DOI:
10.1002/9780470015902.a0001356.pub2.
9. 田中耕三. 1枚の写真館 「側面結合」との出会い. **細胞工学** (2016) 35, 95. 査読無.
<https://gakken-mesh.jp/journal/detail/9784780901757.html>
10. 田中耕三. 治療標的としての Aurora キナーゼによる動原体制御. **血液内科** (2015) 71, 712-717. 査読無.
<http://www.kahyo.com/item/KS201512-716>
11. 田中耕三. 特集 染色体安定性制御と疾患 総論 染色体不安定性の病態生理. **細胞** (2015) 47, 212-214. 査読無.
http://hokuryukan-ns.co.jp/magazines/archives/2015/04/20155_3.html

[学会発表](計 38 件)

1. Manuel Campos, 家村顕自, 田中耕三. 染色体オシレーションと異常な結合の修正を記述する動原体-微小管結合の数学的モデル. 2017年度生命科学系合同年次大会(第40回日本分子生物学会年会) 2017年12月6日~12月9日 神戸ポートアイランド(神戸市・兵庫県)
2. Kenji Iemura, Kinue Kuniyasu, Manuel Campos, Guan Chen, Kozo Tanaka. Chromosomal instability in cancer and aging. 第12回研究所ネットワーク国際シンポジウム 2017年11月28日~11月29日 東京大学(港区・東京都)
3. Kenji Iemura, Kozo Tanaka. A novel mechanism for maintenance of chromosomal stability. 第76回日本癌学会学術総会 2017年9月28日~9月30日 パシフィコ横浜(横浜市・神奈川県)
4. 國安絹枝, 家村顕自, 田中耕三. 染色体整列の時空間的な遅延が染色体不安定性を引き起こす. 第69回日本細胞生物学会大会 2017年6月13日~6月15日 仙台国際センター(仙台市・宮城県)
5. 池田真教, 田中耕三. 紡錘体チェックポイント活性の維持に関わる分子基盤の解明. 第69回日本細胞生物学会大会 2017年6月13日~15日 仙台国際センター(仙台市・宮城県)
6. 家村顕自, 田中耕三. Aurora A は正常細胞における染色体均等分配システムの堅牢性を保証する. 第69回日本細胞生物学会大会 2017年6月13日~6月15日 仙台国際センター(仙台市・宮城県)
7. Kenji Iemura, Kozo Tanaka. Chromosome oscillation ensures faithful chromosome segregation through Hec1 phosphorylation

- by Aurora A. EMBO Workshop “Dynamic Kinetochore” 2017年6月6日~6月9日 エジンバラ大学 (エジンバラ, 英国)
8. Kozo Tanaka. Chromosomal instability in aging and cancer. Tohoku Forum for Creativity Thematic Program 2017 Aging Science: from Molecules to Society Topic1 “Aging Biology” 2017年5月10日~5月12日 東北大学 (仙台市, 宮城県)
 9. Kozo Tanaka. Alterations in chromosome dynamics impair the fidelity of chromosome transmission. International Workshop on Quantitative Biology 2017 2017年4月14日~4月15日 慶応大学 (横浜市, 神奈川県)
 10. Kinue Kuniyasu, Kenji Iemura, Kozo Tanaka. Defect in efficient chromosome alignment cause chromosomal instability The 2017 Japan-NIH Joint Symposium 2017年2月15日~2月17日 Seiry Auditorium, Tohoku University (Sendai・Miyagi)
 11. Masanori Ikeda and Kozo Tanaka. Regulatory mechanism of spindle assembly checkpoint by mitotic kinase Plk1 and its role in mitotic progression. The 2017 Japan-NIH joint Symposium 2017年2月15日~2月17日 Seiry Auditorium (Sendai・Miyagi, Japan)
 12. Kenji Iemura and Kozo Tanaka. Centrosomal kinase Aurora A is required for the robust system of equal chromosome segregation. The 2017 Japan-NIH joint Symposium 2017年2月15日~2月17日 Seiry Auditorium (Sendai・Miyagi, Japan)
 13. 國安絹枝, 家村顕自, 田中耕三. 染色体整列の効率性の低下が染色体不安定性を引き起こす. 第34回染色体ワークショップ 第15回核ダイナミクス研究会 2017年1月11日~1月13日 かずさアカデミアホール (木更津市・千葉県)
 14. 池田真教, 田中耕三. PIK1によるM期進行を司る新規分子基盤の解明. 第34回染色体ワークショップ・第15回核ダイナミクス研究会 2017年1月11日~1月13日 かずさアカデミアホール (木更津市・千葉県)
 15. 家村顕自, 田中耕三. 中心体キナーゼ Aurora Aは染色体均等分配の堅牢性の維持に寄与する. 第34回染色体ワークショップ・第15回核ダイナミクス研究会 2017年1月11日~1月13日 かずさアカデミアホール (木更津市・千葉県)
 16. Kinue Kuniyasu, Kenji Iemura, Kozo Tanaka. Defect in efficient chromosome alignment cause chromosome instability. 第39回日本分子生物学会年会 2016年11月30日~12月2日 パシフィコ横浜 (横浜市・神奈川県)
 17. 池田真教, 田中耕三. 分裂期キナーゼ PIK1による紡錘体チェックポイント制御機構とその機能的役割の解明. 第39回日本分子生物学会年会 2016年11月30日~12月2日 パシフィコ横浜 (横浜市・神奈川県)
 18. 家村顕自, 田中耕三. 中心体キナーゼ Aurora Aは分裂期染色体動態にตอบสนองして動原体分子をリン酸化する. 第39回日本分子生物学会年会 2016年11月30日~12月2日 パシフィコ横浜 (横浜市・神奈川県)
 19. Kozo Tanaka. Chromosomal instability caused by defective chromosome dynamics. 2016 International Conference of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology 2016年10月12日~10月14日 COEX (ソウル・韓国)
 20. 田中耕三. 染色体不安定性とがん. 第75回日本癌学会学術総会 2016年10月6日~10月8日 パシフィコ横浜 (横浜市・神奈川県)
 21. Kozo Tanaka. Chromosomal instability caused by defective chromosome dynamics. 第75回日本癌学会学術総会. 2016年10月6日~10月8日 パシフィコ横浜 (横浜市・神奈川県)
 22. 池田真教, 田中耕三. 細胞分裂期進行における分裂期キナーゼ PIK1の新規機能の解明. 第89回日本生化学会大会 2016年9月25日~9月27日 仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス (仙台市・宮城県)
 23. 國安絹枝, 家村顕自, 田中耕三. 効率的な染色体整列の染色体安定性への関与. 第89回日本生化学会大会 2016年9月25日~9月27日 仙台国際センター/東北大学川内北キャンパス (仙台市・宮城県)
 24. 家村顕自, 田中耕三. 中心体キナーゼ Aurora Aは分裂中期におけるキネトコア-微小管結合の修正に寄与する. 第68回日本細胞生物学会大会 2016年6月15日~6月17日 京都テルサ (京都市・京都府)
 25. 家村顕自, 田中耕三. 中心体キナーゼ Aurora Aが触媒する分裂期中期における動原体分子のリン酸化の役割. 第82回日本生化学会東北支部例会 2016年5月21日~5月22日 弘前大学 (弘前市・青森県)
 26. 家村顕自, 田中耕三. 赤道面に整列した染色体でのキネトコア-微小管結合修正における Aurora Aの役割. 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合同開催 2016年1月12日~1月14日 松島一の坊 (松島町・宮城県)

27. 國安絹枝, 家村顕自, 田中耕三. 効率的な染色体整列の染色体安定性への関与. 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 (松島町・宮城県)
28. 池田真教, 田中耕三. M 期キナーゼ Plk1 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 (松島町・宮城県)
29. 國安絹枝, 家村顕自, 田中耕三. 効率的な染色体整列の染色体安定性への関与. 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 神戸国際会議場 (神戸市・兵庫)
30. 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 神戸国際会議場 (神戸市・兵庫)
31. 田中耕三. 効率的な染色体整列の異常による染色体不安定性の出現. 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8 日～10 月 10 日 名古屋国際会議場 (名古屋市・愛知県)
32. 小林絹枝, 家村顕自, 田中耕三. 効率的な染色体整列の染色体安定性への関与. 平成 27 年度がん若手研究者ワークショップ 2015 年 9 月 2 日～5 日 蓼科グランドホテル滝の湯 (茅野市・長野県)
33. Kenji Iemura, Kozo Tanaka. Role of Kid and CENP-E on Efficient Chromosome Alignment. International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function. 2015 年 8 月 23 日～8 月 26 日 淡路夢舞台 (淡路市・兵庫県)
34. Kenji Iemura, Kozo Tanaka. Role of Kid and CENP-E on efficient chromosome alignment. 第 10 回研究所ネットワ - ク国際シンポジウム 2015 年 7 月 23 日～7 月 24 日 北海道大学医学部学友会館 (札幌市・北海道)
35. 家村顕自, 田中耕三. 効率的な染色体整列における Kid 及び CENP-E の機能解析 第 67 回日本細胞生物学会大会 2015 年 6 月 30 日～7 月 2 日 タワーホール船堀 (江戸川区・東京都)
36. 田中耕三. 染色体不安定性と発がん. 第 9 回日本エピジェネティクス研究会 2015 年 5 月 25 日～26 日 学術総合センター (千代田区・東京都)
37. 家村顕自, 田中耕三. 効率的な染色体整

列における Kid 及び CENP-E の役割. 第 81 回日本生化学会東北支部例会 2015 年 5 月 9 日 東北大学片平さくらホール (仙台市・宮城県)

38. Kozo Tanaka. Chromosomal instability: a road to cancer and aging. Alfred Benzon Workshop 2015 年 5 月 7 日 コペンハーゲン (デンマーク)

〔その他〕

ホームページ等

田中耕三研究室 Department of Molecular Oncology

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

東北大学加齢医学研究所 分子腫瘍学研究分野

http://www.idac.tohoku.ac.jp/ja/activities/research/molecular_oncology/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 耕三 (TANAKA, Kozo)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号: 00304452

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

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

安井 明 (YASUI, Akira)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号: 60191110

菅野 新一郎 (KANNO, Shin-ichiro)

東北大学・加齢医学研究所・講師

研究者番号: 10400417