

平成 21 年 6 月 26 日現在

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2006～2008

課題番号：18687011

研究課題名（和文） ヒト染色体セントロメアの分子構造

研究課題名（英文） Molecular structure of human chromosome centromeres

研究代表者 広田 亨 (HIROTA TORU)
財団法人癌研究会
癌研究所実験病理部・部長
研究者番号：50421368

研究成果の概要：

セントロメアは、姉妹染色分体の結合、染色体と微小管の結合、紡錘体チェックポイント信号の発信を担う、分裂期における染色体動態制御の中核として機能する染色体の特殊なドメインである。本研究では、Aurora B がセントロメアの構築にどう関わるかを検討し、次の成果を得た：分裂期に Aurora B は、HP1a というクロマチンのタンパク質をセントロメアに引き込むこと、セントロメアで HP1a は微小管の誤接続を防ぎ、染色体の不均等分配を未然に防いでいること、を見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	14,200,000	4,260,000	18,460,000
2007 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2008 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	22,900,000	6,870,000	29,770,000

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：染色体、セントロメア、動原体、ヒストン、分裂期キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) 染色体のセントロメアは、内側では姉妹染色分体の接合という、外側では動原体と紡錘体の結合という、染色体動態の制御における中核となる特殊なドメインである。

(2) クロマチンが凝縮して染色体となる
とき、CENP-Aヌクレオソームは外側にのみ分布して背合わせの配位構造をとり動原体形成の基礎をつくる。そして内側にはH3ヌクレオソームがならび、姉妹染色分体間を結合する。の特異的なジオメトリー

を構築することは、セントロメア機能に重要な構造であると推察できるが、その分子機構は不明であった。

(3) 分裂期キナーゼ **Aurora B** はクロマチンに親和性が高く、生物種を超えて染色体動態の制御に直接的な役割を持っていることが明らかになりつつあった。特に、ヒトの細胞で **Aurora B** を阻害するとセントロメアが低形成となることから、**Aurora B** によって制御を受ける分子群がセントロメアの構築に関わると考えられた。

(4) セントロメアは生物種によって特異な構造を取ることが知られているので、ヒトのセントロメアの構造を解明するためには、ヒトの細胞を用いて解析する必要があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、セントロメア特異的な蛋白質およびヒストン修飾の分布とその意義を明らかにし、この特殊な染色体ドメインの分子基盤を示すことを目指した。具体的には、セントロメアにおける修飾ヒストン H3/CENP-A の分布、その結果として誘導される HP1、**Aurora B** パッセンジャー複合体やシュゴシン等のセントロメア特異的蛋白質の動態について、あるいはコンデンシンとコヒーシンといった染色体全般の構築を担う複合体の動態を解析する。次いで、これらセントロメア構成分子群の動態に **Aurora B** の関与を検討する。そして、セントロメアの構造と機能における、**Aurora B** とセントロメア構成分子群との連携の給与性を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) セントロメア特異の構造がどのような分子

群あるいはヒストン修飾により構築されるのかを明らかにする。高解像度の光学顕微鏡にて得られた画像をデコンボリューション演算による処理を行い、それらの観察をもとに細胞分裂の進行に伴うセントロメアの3次元モデルを再構成する。

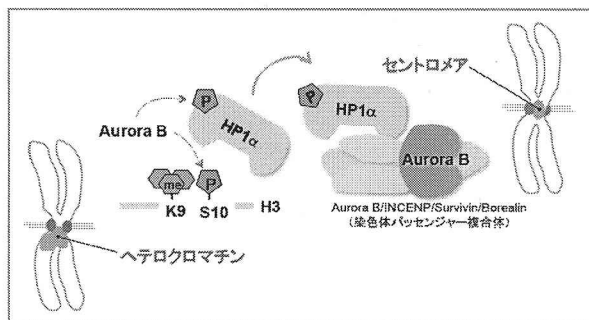
(2) 本研究に先立って、われわれは **Aurora B** がヒストン H3 がリン酸化する結果として、ヘテロクロマチンタンパク質 (HP1 α) の解離が誘導されることを見出した (Hirota et al., Nature, 2005)。この知見に続き、HP1 α も同様に **Aurora B** によってリン酸化される可能性を検討し、HP1 α の解離機構を明らかにする。最終的に分裂期における HP1 α の細胞内局在とその機能を解析する。

(3) セントロメア機能の評価方法を確立する。姉妹染色分体の結合制御の制御に関しては、コヒーシンやシュゴシンの定性、定量的検討を、生細胞観察下、あるいは免疫細胞染色、染色体スプレッドにて行う。また、**Aurora B** を阻害すると、中期赤道面へ整列できない染色体が頻発することから、微小管と動原体との結合調節に **Aurora B** が関わっていることが示唆されていることから、動原体と微小管の結合様式の詳細な検討を可能とする細胞、即ちそれぞれの構造物を蛍光標識した細胞を樹立する必要がある。その細胞を生細胞で観察し、**Aurora B** が働くところをピンポイントで突き止める。

4. 研究成果

(1) 分裂期において **Aurora B** の活性依存的にクロマチンより解離する HP1 α の動態と機能を追究することによって、期せずして、動原体と微小管の正しい結合を保証する仕組みの中で **Aurora B** がいかに重要な役割を担っ

ているのかということを見ることができた。まず、HP1 α はM期特異的にAurora Bによってリン酸化を受けることと、リン酸化サイトの一つがSer92であることが分かった。リン酸化HP1 α の大部分は細胞質に存在したが、興味深いことに一部のリン酸化HP1 α はAurora B/染色体パッセンジャー複合体(CPC)と相互作用し、その結果セントロメアに局在することが、免疫沈降法や免疫染色法によって判明した(図参照)。さらにHP1 α とAurora Bの結合はHP1 α Ser92のリン酸化によって安定化することがFRAP解析で示唆された。



(2) セントロメアにおけるHP1 α とAurora Bの相互作用の意義をノックダウン実験あるいは種々の変異体の補完実験を行って検討したところ、この相互作用はメロテリック結合(一つの動原体に両極から伸びた微小管が結合)のような動原体における微小管の誤接続を防ぐという特異な役割を担っていることを明らかにした。つまり、このような誤接続はAurora B依存性にM期チェックポイントが維持されて、そして修復されると考えられていたが、これらのAurora Bの機能はHP1 α との連携があって始めて可能となることが分かった。換言すれば、Aurora Bは、HP1 α をセントロメアに引き込むことによって、微小管の誤接続を防ぎ、染色体の不均等分配を未然に防ぐことによって、染色体の安定した分配を保証していると解釈できる。

(3) セントロメアにおけるAurora Bの機能は、

極めて低濃度のAurora B阻害薬に感受性があり、その結果、微小管の誤接続が頻発することが報告されたが(Cimini et al., 2006)、本研究で見出したAurora BとHP1 α との相互作用もこの低濃度の阻害薬によって抑えられることが判明している。HP1 α は分裂酵母でも正常な染色体分配に必須であることが知られていたことから、数多く存在するであろうAurora Bの関連分子の中でも特に重要で且つ普遍的な分子連係である可能性があると考えている。

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 13 件)

- ① Uchida, K.S.K., Takagaki, K., Kumada, K., Noda, T., Hirota, T. (2009) Kinetochores stretching inactivates the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol.* 184: 383-390.
- ② Tanaka, K., Hirota, T. (2009) Chromosome segregation machinery and cancer. *Cancer Sci.* 100: 1158-1165.
- ③ Munirajan AK, Ando K, Mukai A, Takahashi M, Suenaga Y, Ohira M, Koda T, Hirota T, Ozaki T, Nakagawara A. (2008) KIF1Bbeta functions as a haploidinsufficient tumor suppressor gene mapped to chromosome 1p36.2 by inducing apoptotic cell death. *J Biol Chem.* 283: 24426-24434.
- ④ Nakajima, M., Kumada, K., Hatakeyama, K., Noda, T., Peters, JM., Hirota, T. (2007) The complete removal of cohesin from chromosome arms depends on separase. *J Cell Sci.* 120: 4188-4196.
- ⑤ Lipp, JJ., Hirota, T., Peters, JM. (2007) Aurora B controls the association of condensin I but not condensin II with mitotic chromosomes. *J Cell Sci.* 120: 1245-1255.
- ⑥ Gerlich, D., Hirota, T., Koch, B., Peters, JM., Ellenberg, J. (2006) Condensin I stabilizes chromosomes mechanically through a dynamic interaction in living cells. *Curr Biol.* 16: 333-344.

⑦ 進藤軌久、広田 亨 (2009) ヒストンの化学修飾：新たな標的エピジェネティクスを目指して. 臨床血液 50(4) 282-288.

⑧ 中島真人、広田 亨 (2008) Aurora 阻害薬. 分子細胞治療 4 (6) 480-488.

⑨ 広田 亨、進藤軌久 (2008) ヒストンのリン酸化によるクロマチン機能の制御. 実験医学 26: 1353-1358.

⑩ 大石智一、清宮啓之、広田 亨 (2007) Aurora キナーゼによる分裂期微小管の制御. 細胞 39 (11) 482-486.

⑪ 広田 亨 (2007) 染色体の構築とその動態を制御する分裂期キナーゼ Aurora B. 実験医学 25 (5) 704-711.

⑫ 広田 亨 (2006) ヒストンのリン酸化-動的エピジェネティクスをになう修飾. 実験医学 24 (8) 1110-1116.

⑬ 広田 亨 (2006) オーロラキナーゼによる染色体の制御. 細胞工学 25(5) 506-510.

[学会発表] (計 29 件)

① Uchida K, Takagaki K, Kumada K, Hirota T. How cells silence the spindle assembly checkpoint. MEXT Priority Research, International Symposium "Cell Cycle and Cell Architecture" 2009.2.27. (Nagoya)

② 高垣謙太郎、広田 亨. Aurora B による M 期チェックポイントの制御. 第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会、合同大会. 2008. 12. 10 (神戸)

④ 内田和彦、広田 亨. 細胞分裂中期において動原体に加えられた“張力”の定量的解析. 第 67 回日本癌学会学術総会. 2008. 10. 28. (名古屋)

⑤ Hirota, T. How Aurora B controls chromosome segregation in mitosis. Tokyo Institute of Technology GCOE Symposium 'Chromosome biology' 2008.10.24. (Tokyo)

⑥ 広田 亨. ヒストンの化学修飾：新たな標的エピジェネティクスを目指して. 第 70 回日本血液学会. 2008. 10. 10. (京都)

⑦ Hirota, T. Kinetochores stretching: Setting the stage for chromosome segregation. The 9th

International Congress on Cell Biology. 2008.10.8. (Seoul)

⑧ 中島真人、熊田和貴、野田哲生、広田 亨. 染色体腕部コヒーシオン解離におけるセパレーズの関与について. 第 60 回日本細胞生物学会大会. 2008. 6. 29. (横浜)

⑨ 広田 亨 染色体動態と分裂異常. 第 49 回日本臨床細胞学会総会教育講演. 2008. 6. 8. (東京)

⑩ Hirota, T, Uchida, K., Takagaki, K. Kinetochores stretching: Setting the stage for chromosome segregation. The 3rd NIG International Symposium on 'Chromosome Dynamics' 2008.5.26. (Mishima)

⑪ 広田 亨. 染色体分離の瞬間を規定する仕組み：紡錘体チェックポイントについて. 日本生化学会中部支部例会. 2008. 5. 24 (岐阜)

⑫ Hirota, T, Takagaki, K., Uchida, K. How Aurora B controls chromosome segregation in mitosis. The 65th KSBMB annual meeting. 2008.5.9. (Seoul)

⑬ Hirota, T, Uchida, K. Kinetochores stretching: Setting the stage for chromosome segregation. Seminars at EMBL. 2008.3.12. (Heidelberg)

⑭ 広田 亨. 動原体の微小管相互作用感知系の研究. 第 25 回染色体ワークショップ. 2008. 1. 31. (湯河原)

⑮ Hirota, T. How Aurora B controls chromosome segregation in mitosis. 第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会、合同大会. 2007. 12. 12. (横浜)

⑯ 中島真人、広田 亨. The complete removal of cohesin from chromosome arms depends on separase. 第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会、合同大会. 2007. 12. 11. (横浜)

⑰ 内田和彦、広田 亨. 細胞分裂中期において動原体が受ける張力の定量的解析. 第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会、合同大会. 2007. 12. 11. (横浜)

⑱ Hirota, T. The molecular metabolism that underlies mitotic chromosome assembly. 第 65 回日本癌学会学術総会. 2007. 10. 4. (横浜)

⑲ Takagaki, K., Hirota, T. Aurora B controls dynamic localization of HP1 α in mitosis. 第 65

回日本癌学会学術総会. 2007. 10. 4. (横浜)

⑳ 高垣謙太郎、広田 亨. Aurora B キナーゼによる HP1 α の動態制御. 第 7 回核ダイナミクス研究会. 2007. 9. 25. (札幌)

㉑ Hirota, T., Takagaki, K., Uchida, K. How Aurora B controls mitotic chromosome assembly. The 19th FAOBMB Conference, 2007.5.28. (Seoul)

㉒ 高垣謙太郎、広田 亨. Aurora B による HP1 α 解離過程の解析. 第 24 回染色体ワークショップ. 2007. 2. 1. (唐津)

㉓ 中島真人、広田 亨. 染色体腕部コヒーシオン解離過程におけるユビキチン・プロテアソーム系の関与. 第 24 回染色体ワークショップ. 2007. 2. 1. (唐津)

㉔ Hirota, T. How Aurora kinases control mitotic chromosome assembly. The 3rd International Symposium on Novel perspectives in cancer research and translation to the clinic. 2006.11.9. (Sendai)

㉕ 広田 亨. 染色体制御の分子機構. 日本分子生物学会関東支部例会. 2006. 10. 6. (新潟)

㉖ 広田 亨. オーロラキナーゼによる細胞分裂の制御. 第 65 回日本癌学会学術総会. 2006. 9. 29. (横浜)

㉗ 広田 亨. How chromosomes are assembled in mitosis. 特定領域研究・生体ナノシステムの制御・国際会議. 2006. 9. 1. (松島)

㉘ 広田 亨. Aurora キナーゼの生理と病理. 第 10 回がん分子標的治療研究会. 2006. 6. 16. (東京)

㉙ 広田 亨. Aurora-B キナーゼによる染色体の制御. 第 3 回クロマチン・フロンティアーズ・ジャパン. 2006. 5. 17. (東京)

[図書] (計 1 件)

① Hoshi, O., Hirota, T., Kimura, E., Komatsubara, N., Ushiki, T. (2007) Immunocytochemistry for analyzing chromosomes. Chromosome Nanoscience and Technology pp.79-87 CRC Press.

[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
財団法人癌研究会
癌研究所実験病理部・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
財団法人癌研究会
癌研究所実験病理部
研究員
研究者番号：70419951

内田和彦
財団法人癌研究会
癌研究所実験病理部
研究員
研究者番号：40380555