

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05813

研究課題名(和文)染色体分配装置構築の分子機構解明と次世代創薬への応用

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanisms regulating bipolar spindle assembly and its application for next-generation drug discovery

研究代表者

湯川 格史 (Yukawa, Masashi)

広島大学・統合生命科学研究科(先)・助教

研究者番号：50403605

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：紡錘体微小管は、複製された姉妹染色体を均等に娘細胞に分配するために必須である。その形成破綻はゲノム不安定性を引き起こし、流産や癌を含む種々のヒト疾患の原因となる。本研究では、従来とは異なる5型キネシンに依存しない新たな紡錘体形成機構に着目し、その包括的理解を目指して分裂酵母を用いて研究を行った。その結果、微小管ポリメラーゼ活性を有する2つの分子の紡錘体形成における役割分担や6型キネシンの新たな役割を明らかにできた。さらに、機能未知RNA結合因子が紡錘体形成に関与することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

5型キネシンに依存しない新規紡錘体形成経路に関与する因子はいずれも酵母からヒトまで高度に保存されており、高等生物においても類似した役割を持つ可能性がある。近年、医療分野でキネシン阻害剤は副作用の少ない抗ガン剤として期待されており、新たな薬剤開発が進められている。しかし、臨床研究においては、ガン細胞が薬剤耐性を獲得してしまうことが大きな課題である。本研究は5型キネシン阻害時における耐性獲得機構の有用なモデル系として位置付けられることから、その成果はキネシン阻害剤による次世代抗ガン治療の実現に大きく貢献するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Mitotic spindle microtubules ensure an equal distribution of the replicated chromosomes between the two daughter cells. Its disruption leads to genomic instability and causes a variety of human diseases, including miscarriage and cancer. In this study, we focused on a novel spindle formation mechanism that does not depend on kinesin-5 motor, which is different from the conventional one, and attempted to obtain a comprehensive understanding of this mechanism by using fission yeast. As a result, we were able to clarify the division of roles between two molecules with microtubule polymerase activity and the new role of kinesin-6 motor in spindle formation. Furthermore, we found that functionally-unknown RNA-binding factors are involved in spindle formation.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：染色体分配 紡錘体 微小管 キネシンモーター 5型キネシン 微小管ポリメラーゼ RNA結合タンパク質 ストレス顆粒

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ゲノム安定性を保証する有糸分裂時の染色体均等分配は、紡錘体微小管が分裂装置として働くことにより遂行される。紡錘体は 2 つの中心体から重合した微小管を構成因子とする双極性構造をとり、その形成には 5 型キネシンファミリー蛋白質が必須であると考えられてきた。すなわち、微小管を架橋するように局在する 5 型キネシンが、プラス端方向に移動する際に反作用で生じる中心体を押し離す力(押力)を生み出し、この押力によって逆平行構造の微小管をスライドさせて紡錘体形成を促すというモデルである。実際に、ヒトを含む高等生物細胞においても 5 型キネシン阻害剤を分裂期開始前に細胞に添加すると中心体分離が起こらず、ごく近傍に存在する二つの中心体を中心とした異常な単極性紡錘体を形成する。しかし、申請者らは通常生育できない分裂酵母の 5 型キネシン (Cut7) 欠損株が、別のキネシンファミリーに属する 14 型キネシン (Pkl1) と同時欠損させた場合に生育可能となり、紡錘体形成できることを見出した。しかし、5 型キネシン非存在下において、細胞がどのように紡錘体を構築できるのか、その分子メカニズムの全貌は未解明のままである。現在、医療分野におけるガン化学療法には、微小管やキネシンモーターに対する種々の阻害剤が用いられているが、ガン細胞が薬剤耐性を容易に獲得してしまうという大きな問題がある。本研究対象である新規紡錘体形成経路は、5 型キネシン阻害時においてガン細胞が薬剤耐性を獲得する分子機構を研究するための有用なモデル系として位置づけられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、5 型キネシンモーターを必要としない新規紡錘体形成メカニズムについて分子レベルで解明することを目指し、真核モデル生物である分裂酵母を用いて、5 型キネシン (Cut7) 機能欠損時の紡錘体形成維持に必須な因子がどのような役割を果たしているか明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

5 型キネシンに依存しない新規紡錘体形成経路には、少なくとも 3 つの因子 (微小管ポリメラーゼ、微小管クロスリンカー、6 型キネシン) が必要である。本研究では、これらの因子の紡錘体形成における役割に着目し、以下の研究を行った。

- (1) 微小管ポリメラーゼの機能解析
- (2) 6 型キネシンの機能解析
- (3) 5 型キネシン温度感受性変異株のサプレッサー変異の取得と解析

### 4. 研究成果

#### (1) 微小管ポリメラーゼの機能解析

分裂酵母には微小管ポリメラーゼ活性を有する 2 つの分子 (Alp14 と Dis1) が存在するが、いずれも 5 型キネシンに依存しない新たな紡錘体形成経路に必須である。これら 2 つの分子は生育に必須な機能を共有しているが、機能的にどのように連携しているかは不明であった。そこで、Dis1 非存在下で温度感受性を示す新たな *alp14* 変異 (*alp14-26*) を作成し、Alp14 と Dis1 を同時に不活性化させた際の紡錘体形成について詳細に観察した。その結果、*alp14-26dis1* 二重変異株は制限温度下で非常に短く壊れやすい紡錘体しか形成できず、分裂期初期に増殖停止することを見出した。さらに Alp14 と Dis1 は機能的に交換可能ではなく、Alp14 は微小管重合核形成を促進するが Dis1 は促進しないことが判った。従って、Alp14 と Dis1 は紡錘体形成において互いに異なる機能を果たし、役割分担していることが明らかとなった。

#### (2) 6 型キネシンの機能解析

新規紡錘体形成経路に必須な 6 型キネシン (Klp9) および微小管クロスリンカー (Ase1) と 5 型キネシン (Cut7) の機能関係について調べた。まず、全反射照明蛍光顕微鏡を用いた測定により、Klp9 がホモ四量体を形成してプラス端方向性の運動活性を有することを明らかにした。次に、*k1p9ase1* 二重欠損株は合成致死性を示すが、驚いたことに、この致死性が Klp9 の運動活性の欠陥によるものではないことを見出した。さらに、Klp9 非存在下でのみ温度感受性を示す *cut7* 変異 (*cut7-122*) を単離し、*cut7-122k1p9* 二重変異株の紡錘体形成について詳細に観察した結果、この二重変異株では制限温度下において紡錘体伸長に相加的な欠陥を示すことが判った。従って、微小管形成において 6 型キネシンは、①モーター活性依存的に 5 型キネシンと連携して紡錘体伸長を駆動する働きと②モーター活性非依存的に微小管クロスリンカーと連携して微小管構造を安定化させる働きという 2 つの役割を果たし、新規紡錘体形成経路においてはモーター活性依存的な働きが必須であることが明らかとなった。

### (3) 5型キネシン温度感受性変異株のサプレッサー変異の取得と解析

5型キネシンを必要としない紡錘体形成経路で働く新規因子を同定するため、*cut7* 変異株 (*cut7-22*) が示す温度感受性を抑圧する変異株を取得した。得られたサプレッサー変異について、次世代シーケンス解析により原因遺伝子を特定した結果、機能未知 RNA 結合蛋白質 Dri1 および *Ret1* の変異遺伝子を取得した。これらの遺伝子欠損株 (*dri1* 欠損株および *ret1* 部分欠失株) について、紡錘体微小管および関連モーター蛋白質の細胞内動態を精査した結果、いずれの欠損株においても 14 型キネシン Klp2 の紡錘体局在量が著しく低下することを見出した。*dri1* 欠損株では紡錘体微小管量や Klp2 発現量に影響が観察されないのに対し、*ret1* 部分欠失株では紡錘体微小管量が著しく低下していた。また、Dri1 については RNA 結合領域に変異あるいは部分欠失を導入した変異体の解析から、その RNA 結合能が機能に重要であることが判った。以上の結果から、いずれの RNA 結合蛋白質が欠損した場合も、紡錘体形成において Cut7 と拮抗的に働く Klp2 の機能が低下し、*cut7* 変異を抑圧したと考えられた。また、Dri1 は紡錘体微小管上への Klp2 のローディング、*Ret1* は紡錘体微小管の形成および安定化にそれぞれ関与し、RNA 結合能を介して各プロセスに関与する因子の発現制御に働く可能性が示唆された。

さらに、これらの RNA 結合蛋白質の細胞内局在について調べた。その結果、Dri1 蛋白質は細胞周期を通じて主に細胞質に局在し、Rae1 依存的な mRNA 核外輸送システムを介して核-細胞質間をシャトルする分子であることが判明した。一方、*Ret1* は細胞周期を通じて常に細胞核内に局在し、核移行シグナルが存在する C 末端領域を欠失させた場合、野生型より核局在量が低下することが判った。興味深いことに、高温等のストレス条件下において Dri1 蛋白質は細胞内で凝集し、シャペロン蛋白質を含む蛋白質凝集中心およびストレス顆粒と共局在すること、*dri1* 欠損株が野生株よりも高温耐性を示すことを発見した。従って、Dri1 には高温ストレス条件下において細胞増殖を制限する働きがあると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Woosang Hwang, Takashi Toda and Masashi Yukawa	4. 巻 86
2. 論文標題 Complementation of fission yeast kinesin-5/Cut7 with human Eg5 provides a versatile platform for screening of anticancer compounds	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 254-259
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/bbb/zbab212	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Masashi Yukawa, Mitsuki Ohishi, Yusuke Yamada and Takashi Toda	4. 巻 22
2. 論文標題 The putative RNA-binding protein Dri1 promotes the loading of kinesin-14/Klp2 to the mitotic spindle and is sequestered into heat-induced protein aggregates in fission yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4795
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22094795	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shintaro Akabane, Naohide Oue, Yohei Sekino, Ryuichi Asai, Pham Quoc Thang, Daiki Taniyama, Kazuhiro Sentani, Masashi Yukawa, Takashi Toda, Ken-Ichi Kimura, Hiroyuki Egi, Wataru Shimizu, Hideki Ohdan and Wataru Yasui	4. 巻 71
2. 論文標題 KIFC1 regulates ZWINT to promote tumor progression and spheroid formation in colorectal cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 441-452
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.13098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Masashi Yukawa, Yasuhiro Teratani and Takashi Toda	4. 巻 24
2. 論文標題 Escape from mitotic catastrophe by actindependent nuclear displacement in fission yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102031
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.isci.2020.102031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Masashi Yukawa, Yasuhiro Teratani and Takashi Toda	4. 巻 9
2. 論文標題 How essential kinesin-5 becomes non-essential in fission yeast: Force balance and microtubule dynamics matter	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9051154	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Naooki Kurisawa, Masashi Yukawa, Hiroyuki Koshino, Takumu Onodera, Takashi Toda and Ken-ichi Kimura KI	4. 巻 28
2. 論文標題 Kolavenic acid analog restores growth in HSET-overproducing fission yeast cells and multipolar mitosis in MDA-MB-231 human cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioorganic and Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 115154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmc.2019.115154	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Masashi Yukawa, Masaki Okazaki, Yasuhiro Teratani, Ken'ya Furuta and Takashi Toda	4. 巻 9
2. 論文標題 Kinesin-6 Klp9 plays motor-dependent and -independent roles in collaboration with Kinesin-5 Cut7 and the microtubule crosslinker Ase1 in fission yeast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-43774-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ngang Heok Tang, Chii Shyang Fong, Hirohisa Masuda, Isabelle Jourdain, Masashi Yukawa and Takashi Toda	4. 巻 83
2. 論文標題 Generation of temperature sensitive mutations with error-prone PCR in a gene encoding a component of the spindle pole body in fission yeast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1717-1720
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1611414	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Masashi Yukawa, Tomoki Kawakami, Corinne Pinder and Takashi Toda	4. 巻 20
2. 論文標題 Two XMAP215/TOG microtubule polymerases, Alp14 and Dis1, play non-exchangeable, distinct roles in microtubule organisation in fission yeast	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20205108	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

[学会発表] 計22件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 湯川 格史, 黄 宇商, 登田 隆
2. 発表標題 分裂酵母を利用した5型キネシン阻害薬探索ツールの開発
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黄 宇商, 湯川 格史, 登田 隆
2. 発表標題 紡錘体チェックポイントと連動したアクチン依存的細胞核移動の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古山 達貴, 高屋敷 望, 小野寺 拓夢, 河村 幸男, 湯川 格史, 登田 隆, 木村 賢一
2. 発表標題 がん細胞の中心体クラスタリング阻害活性を有するkolavenic acid analog の各種抗がん剤との併用効果
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 湯川 格史, 黄 宇商, 登田 隆
2. 発表標題 紡錘体チェックポイントと連動したアクチン依存的細胞核移動の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第54回研究報告会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黄 宇商, 登田 隆, 湯川 格史
2. 発表標題 分裂酵母発現系を用いた5型キネシンの機能保存性解析と阻害剤探索への応用
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第54回研究報告会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 登田 隆, 湯川格史
2. 発表標題 酵母発現系を用いたキネシン阻害抗癌活性物質の探索とその臨床研究
3. 学会等名 酵母細胞研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 湯川 格史, 登田 隆
2. 発表標題 アクチン依存的な核移動による分裂酵母M期カタストロフからの回避機構
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 登田 隆, 湯川 格史
2. 発表標題 分裂酵母M期カastrophe/cutはアクチン依存的な細胞核移動により回避される
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 湯川 格史, 大石 充輝, 登田 隆
2. 発表標題 分裂酵母新規RNA結合タンパク質の紡錘体形成における機能解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第53回研究報告会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 登田 隆, 寺谷 康宏, 湯川 格史
2. 発表標題 アクチン依存的な核移動による分裂酵母M期カastropheからの回避
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第53回研究報告会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 湯川 格史, 大石 充輝, 登田 隆
2. 発表標題 分裂酵母の新規RNA結合タンパク質Nrp1の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 登田 隆, 湯川 格史, 栗澤 尚瑛, 小野寺 拓夢, 木村 賢一
2. 発表標題 分裂酵母を用いた抗癌活性を有する新規キネシン阻害剤の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 湯川 格史, 大石 充輝, 登田 隆
2. 発表標題 分裂酵母の新規RNA結合タンパク質Nrp1の機能解析
3. 学会等名 2019年度先進ゲノム解析研究推進プラットフォーム拡大班会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 登田 隆, Pinder Corinne, 松尾 祐児, Ahmed Shakil, 湯川 格史
2. 発表標題 正しいスピンドル長を規定する微小管重合・脱重合因子の意外な協調関係
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 登田 隆, 寺谷 康宏, Pinder Corinne, 古田 健也, 湯川 格史
2. 発表標題 分裂酵母6型キネシンKlp9はモーター依存性と非依存性の2つの別個の機能により微小管伸長を促進する
3. 学会等名 第37回イーストワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 湯川 格史, 古田 健也, 登田 隆
2. 発表標題 M期後期の紡錘体形成・伸長における分裂酵母6型キネシンKlp9の役割
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第52回研究報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 登田 隆, Pinder Corinne, 松尾 祐児, 河上 友基, 湯川 格史
2. 発表標題 正確なスピンドル長を規定する微小管重合・脱重合因子のクロストーク
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第52回研究報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺谷 康宏, 湯川 格史, 登田 隆
2. 発表標題 分裂酵母5型キネシンCut7の細胞周期M期における新規機能
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第52回研究報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大石 充輝, 湯川 格史, 登田 隆
2. 発表標題 分裂酵母の新規RNA結合タンパク質Nrp1の機能解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第52回研究報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 湯川 格史, 寺谷 康宏, 古田 健也, 登田 隆
2. 発表標題 Interplay between two mitotic kinesins and the microtubule crosslinker drives spindle elongation during anaphase B
3. 学会等名 10th International Fission Yeast Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 登田 隆, 寺谷 康宏, Pinder Corinne, 古田 健也, 湯川 格史
2. 発表標題 Kinesin 6 Klp9 promotes microtubule elongation during anaphase B through motor-dependent and -independent manners
3. 学会等名 Joint Annual Meeting of 71st JSCB and 19th PSSJ (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗澤 尚瑛, 湯川 格史, 越野 広雪, 小野寺 拓夢, 登田 隆, 木村 賢一
2. 発表標題 HSET 過剰発現分裂酵母株を用いた新規天然物由来HSET 阻害剤の探索
3. 学会等名 新規素材探索研究会第18回セミナー
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 湯川格史, 登田 隆	4. 発行年 2021年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 2
3. 書名 実験医学：熱ショックシャペロンによるMAPキナーゼ経路の二面的制御	

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ http://mccb.hiroshima-u.ac.jp 広島大学健康長寿研究拠点 (HiHA) http://hiha.hiroshima-u.ac.jp 研究室ホームページ http://mccb.hiroshima-u.ac.jp 広島大学健康長寿研究拠点 (HiHA) http://hiha.hiroshima-u.ac.jp
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	登田 隆  (Toda Takashi)  (50197894)	広島大学・大学院統合生命科学研究科・特任教授    (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------