

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15079

研究課題名（和文）大きさの異なる染色体間での分裂期における動態の違いの解明

研究課題名（英文）Explore the dynamic behaviors of different chromosomes in mitosis

研究代表者

國安 絹枝（Kuniyasu, Kinue）

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：80843127

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、任意の染色体を生き細胞で可視化・追跡するシステムを用いて、分裂期を通じた個々の染色体の動態にどのような差があるのかを明らかにすることを目的とし、CRISPR-dCas9法を応用した染色体標識による観察システムを構築した。アプタマーをベースとした染色体標識を用いて、任意の染色体が標識された細胞株を作出した。

結果、染色体への標識は、染色体分配の正確性に大きな影響を与えることがなく、分裂期を通して生細胞観察により任意の染色体の動態を追跡し観察できることがわかった。また、がん細胞株において標識された染色体での、染色体分配異常の様子や、分配異常に至る過程を詳細に観察できることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞において、染色体分配異常を引き起こす要因には様々な要因が報告されているが、技術的な問題から個々の染色体に着目し生細胞観察によりその特性を明らかにする研究は、これまで困難であった。学術的意義として、本研究は個々の染色体の個性についてリアルタイムでの解析によって明らかにするという、次世代の染色体研究に先鞭をつけるものである。また、社会的意義としては、がん細胞で特徴的に見られる染色体分配異常の発生要因に対する理解に貢献することができた。

研究成果の概要（英文）：In this study, I constructed an observation system using chromosome labeling based on the CRISPR-dCas9 method with the aim of clarifying how individual chromosomes differ in their dynamics throughout mitosis by using a system to visualize and track arbitrary chromosomes in living cells. Using aptamer-based chromosome labeling, we generated cell lines in which any chromosome was labeled.

The results showed that the labeling of chromosomes did not significantly affect the accuracy of chromosome segregation, and that the dynamics of any chromosome could be followed and observed by live cell observation throughout mitosis. In addition, we found that the labeled chromosomes in cancer cell lines can be used for detailed observation of chromosome missegregation and the process leading to missegregation.

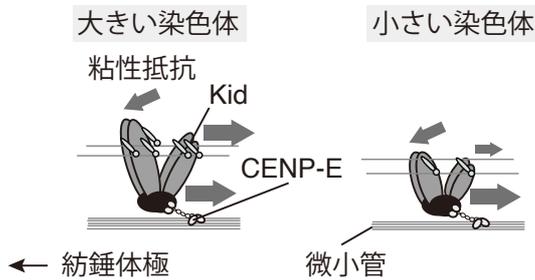
研究分野：細胞生物学

キーワード：染色体分配 染色体ラベリング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

染色体分配の過程では、染色体は紡錘体中央部に整列した後、両極へと分配される。この染色体の動態の制御の中心となるのは、セントロメア領域に形成された動原体と微小管との結合である。核膜崩壊後、染色体は CENP-E などのモーター分子によって微小管の側面に結合した状態



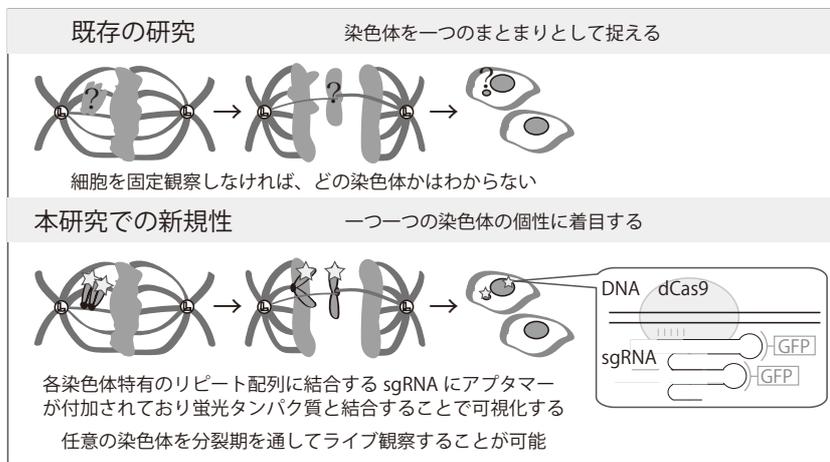
(側面結合) で、紡錘体中央部に向けて移動する。最終的に全ての姉妹染色分体の動原体が双方向の極から伸びる微小管の末端と結合(双方向性結合)することで、染色体は娘細胞へと正確に分配される。しかし双方向性結合が成立せず、誤った結合が生じると染色体の不均等な分配につながる。染色体にはこれらの動原体にはたらく力以外に、腕部に存在する Kid などのモーター分子により染色体を紡錘体極から遠ざけるようにはたらく力や、細胞質内を移動する際の粘性抵抗などがはたらいっている(図1)。また染色体には、長いものと短いもので4倍以上の差があり、長腕と短腕の長さもほぼ等しいものから短腕が痕跡的なものまで様々である。そのため染色体が紡錘体中央部へ整列する過程では、個々の染色体には異なる程度の力がかかっていると考えられる(図1)。このことから、何らかの要因により力のバランスが乱れた場合、染色体により異なる程度の影響を受けると予想される。

図1 側面結合による染色体整列過程

所属する研究室では、側面結合による染色体の紡錘体中央部への移動における CENP-E と Kid の協調的作用や (*Nat Commun*, 2015)、双方向性結合の成立への側面結合の寄与 (*Sci Rep*, 2018) などについて明らかにしてきた。申請者は最近、染色体が紡錘体中央部へ整列するタイミングのわずかな遅れが、分配異常の頻度の上昇につながることを明らかにした (*Biomolecules*, 2019)。これは染色体の動態の違いが、染色体分配異常につながり得ることを示唆している。本研究では近年開発された CRISPR-dCas9 のシステムによる任意の染色体を可視化・追跡する方法を用いることで、上記の「問い」にアプローチする。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大きさの異なる染色体間でどのような動態の違いがあるのかを明らかにすることである。従来の染色体動態のライブ観察の多くは、染色体全体を一括して可視化しており、任意の染色体を識別して見ることは困難であった。本研究の学術的独自性は、近年、間期核の解析用に開発されたアプタマーをベースとした染色体ラベリングシステム (*Proc Natl Acad Sci USA*, 2016) を用いて、



分裂期全体を通して任意の染色体のライブ観察を行い、染色体の運ばれやすさの違いに着目する点である(図2)。このシステムでは、染色体上に点在する特異的なリピート配列を認識する sgRNA に、蛍光タンパク質と結合するアプタマーを付加しており、これがヌクレアーゼ活性を欠損した dCas9 と DNA

図2 本研究と既存の研究との相違点

上に結合することで、任意の染色体を生きた細胞で可視化して観察することが可能である(図

2)。また、各々の染色体の時空間的な情報を把握するためには、標識された染色体以外にも、紡錘体や標識していないその他の染色体などの可視化も同時に行う必要がある。そこで本研究では、任意の染色体可視化システムと細胞小器官の可視化を融合したライブ観察方法を取り入れることで、より正確な任意の染色体の時空間的な情報を得ることが可能となり、従来の方法では見ることができなかった多数の情報が得られることが期待される。

### 3. 研究の方法

近年、間期核の解析用に開発されたアプタマーをベースとした染色体ラベリングシステムを用いた。染色体上に点在する特異的なリピート配列を認識する sgRNA に、蛍光タンパク質と結合するアプタマーを付加しており、これがヌクレアーゼ活性を欠損した dCas9 と DNA 上に結合することで、任意の染色体を生き細胞で可視化して観察することが可能となる。これらの遺伝子を恒常的に発現した RPE-1 細胞（正常細胞株）および U2OS 細胞（がん細胞株）を作出した。それらの細胞株において、ラベリングしたことによる細胞の生存および染色体分配異常の増加の有無を調べた。これらの細胞株を用いて分裂期を通したライブセルイメージング観察を行った。また、2 番染色体において、染色体の両端がラベリングされた細胞株を作出し、薬剤処理により単極紡錘体を誘導した時の、染色体の腕部の動きの観察を行った。

### 4. 研究成果

(1) 任意の染色体へのラベリングは、細胞の生存および染色体分配の正確性に大きな影響を与えない。

ヒト網膜色素上皮由来の正常細胞株である RPE-1 細胞および、ヒト骨肉腫由来のがん細胞株である U2OS 細胞を用いて、それらの任意の染色体に特異的に結合する sgRNA を作成し、加えて sgRNA を認識する蛍光タンパク質および dCas9 を恒常的に発現した細胞株を作出した。それらの細胞株において、細胞増殖能を検証したところ、コントロールと比較して有意な差はなかった。また、染色体分配異常の頻度においても検証したところ、コントロールと比較して染色体分配異常の頻度に有意な差はなかった。染色体数のコピー数の変化においても検証を行ったが、同様に有意な差はなかった。

(2) ラベリングされた染色体は、ライブセルイメージングによる分裂期を通した観察が可能である。

次に、作成した細胞株を用いて分裂期において核膜崩壊から核膜形成までの様子が観察可能であるのかを検証した。染色体上のラベリングした部位の GFP および dCas9 の輝度の変化を定量した結果、核膜崩壊から、ラベリング箇所の GFP および dCas9 の輝度は減少傾向にあるが、それらのラベリング箇所への集積の消失や、蛍光色素の褪色は見られず、分裂期を通してラベリングシステムを用いた染色体の動態観察が可能であることが明らかになった。

(3) がん細胞株において、ラベリングされた染色体の分配異常の検出が可能である。

任意の染色体がラベリングされた U2OS 細胞を用いて、ライブセルイメージングによるラベリングされた染色体での分配異常の検出が可能であるのかを検証した。ラベリングされた染色体において、がん細胞の染色体分配異常で見られる染色体ブリッジおよびラギング染色体を検出した。また、ラベリングされた染色体が分配異常に至る過程および、分配後の動態をライブセルイメージングで観察が可能であることが明らかになった。

(4) 任意の染色体の両端をラベリングすることで、分裂期でのより詳細な染色体の形の変化の観察が可能となる。

2 番染色体の短腕および長腕がラベリングされた U2OS 細胞を作成し、薬剤処理により単極紡錘体を誘導した状態での染色体の形の変化を、ライブセルイメージングにより検証した。またこの時、動原体も同時に可視化し観察を行った。染色体が極方向へ微小管によって引き寄せられると、それに伴い染色体の短腕と長腕間の角度が小さくなり、微小管により極と逆方向へ染色体が押されると、短腕と長腕間の角度は大きくなった。分裂期では染色体は、微小管の力によりフレキシブルに形が変化することが観察された。

任意の染色体ラベリングシステムは、恒常的にラベリングした細胞の生存や染色体分配の正確性に大きな影響を与えることなく、分裂期での染色体動態が観察可能であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 國安絹枝、田中耕三
2. 発表標題 大きさや構造の異なる染色体間での分裂期における動態の比較解析
3. 学会等名 第38回染色体ワークショップ、第19回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 國安絹枝、田中耕三
2. 発表標題 任意の染色体の分裂期における動態解析
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第87回例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 國安絹枝、石川裕大、田中耕三
2. 発表標題 分裂期を通じた任意の染色体の動態観察システムの構築
3. 学会等名 第39回染色体ワークショップ・第20回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 國安 絹枝,石川 裕大,田中 耕三
2. 発表標題 分裂期における任意の染色体の動態観察システムの構築と解析
3. 学会等名 第74回日本細胞生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 國安 絹枝,石川 裕大,田中 耕三
2. 発表標題 任意の染色体の動態観察システムの構築と解析
3. 学会等名 第1回細胞分裂研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 國安 絹枝,石川 裕大,田中 耕三
2. 発表標題 任意の染色体の動態観察システムの構築と解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 國安 絹枝,石川 裕大,田中 耕三
2. 発表標題 生細胞での任意の染色体動態観察システムの構築
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------