

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：72602
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2012
課題番号：23651243
研究課題名（和文） 分裂期キナーゼ機能不全細胞の探索に向けた染色体不安定性誘発試験の開発
研究課題名（英文） A new method to evaluate the function of mitotic kinases by monitoring chromosome dynamics
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

## 研究成果の概要（和文）：

分裂期キナーゼは、細胞がM期において正確な染色体分配を達成するために必須の役割を担っている。M期キナーゼの機能の低下は、染色体動態の異常を誘発する。本研究では、分裂期キナーゼの活性低下に鋭敏に反応する染色体動態を指標とする、分裂期キナーゼの機能を評価する実験系を開発した。つまり、分裂期キナーゼ阻害薬の濃度を段階的に上げたときに、誘発される染色体不安定性を指標にした分裂期キナーゼの機能評価法を構築した。この Stepwise-challenging assay と呼ぶ方法を、染色体不安定性の顕著な、代表的ながん細胞について行い、分裂期キナーゼの機能を検討した。

## 研究成果の概要（英文）：

Mitotic kinases play crucial roles in separating chromosomes correctly and safely as cells divide. Dysfunction of mitotic kinases therefore causes defective chromosome movements and segregation. In this study, we aimed to develop an assay to indicate cryptic dysfunction of mitotic kinases by monitoring chromosome behavior during mitosis, which is otherwise difficult to detect in conventional means. We found that increasing dose of specific inhibitors of mitotic kinases, caused abnormal chromosomal movements progressively. This what we called the stepwise-challenging assay was then used to address the function of mitotic kinases in several cancer cells that are known to have chromosomal instability.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

## 研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・ケミカルバイオロジー

キーワード：M期、染色体、がん細胞、キナーゼ阻害薬

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 多くの悪性腫瘍（がん）を構成する細胞は、染色体数が正二倍体から逸脱した異数性を示し、細胞分裂の度に染色体数が変動する染色体不安定性と呼ばれる細胞病態に陥っている。

(2) 染色体不安定性は、M期における染色体動態の制御を担うシステムという、本来、フェールセーフな細胞機能のロバストネスが低下していることが背景にあると考えられる。従って、がん細胞における染色体動態制御システムの脆弱点を見出すことは、細胞病

態に沿った治療を実現すると考えられる。

(3) 分裂期キナーゼは、細胞がM期において、染色体の構築、紡錘体の制御、動原体と微小管の結合、染色体の整列から分離まで、正確な染色体分配を達成するために必須の役割を担っている。それぞれの過程において特定のリン酸化基質があり、リン酸化反応によって制御されていると考えられる。

(4) 分裂期キナーゼの阻害薬を、生化学的には活性低下を検出できないような低濃度で用いても、染色体動態には異常を来すことがある。つまり、染色体動態異常を分裂期キナーゼの機能低下の「高感度の検出器」としてもちることができると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、分裂期キナーゼの活性低下に鋭敏に反応する染色体動態を指標とする、分裂期キナーゼの機能を評価する実験系を開発する。この方法を用いることによって、染色体の不安定性を特徴とするがん細胞に有する「分裂期キナーゼの脆弱性」を突き止めることを目的とする。

## 3. 研究の方法

分裂期キナーゼの阻害薬に高感受性である細胞ほど低い濃度において染色体動態異常が誘発される。この観察に基づいて、本研究では、分裂期キナーゼ阻害薬の濃度を段階的に上げたときに誘発される染色体不安定性を指標にした分裂期キナーゼの機能評価法 (Stepwise-challenging assay) を開発する。次いで、この方法を用いて、さまざまながん細胞を解析し、分裂期キナーゼの機能を評価する。

## 4. 研究成果

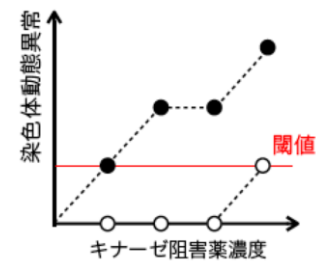
(1) 分裂期キナーゼの機能低下とキナーゼ阻害薬の感受性との関連性を検証すべく、HeLa細胞においてAurora BとPlk1キナーゼをRNAi法によって段階的にノックダウンするプロトコルを検討した。

(2) 分裂期キナーゼAurora BおよびPlk1について発現量依存的に、特異的阻害薬の感受性 (EC50) が変化することをHeLa細胞において観察して、阻害薬に対する感受性の違いが、細胞内のキナーゼ活性をある程度反映することを示した。

(3) 膵臓がんの培養細胞株4つのラインについて、M期キナーゼ活性の機能を評価すべく、まずは、ヒストンをGFP標識するためのウイルスベクターを構築した。これを用いて染色体を可視化し、生細胞の細胞分裂の観察

を行った。

(4) 阻害薬に対する感受性 (表現型出現する薬剤濃度) の違いがあった。それらの差異は、期待通り、分裂期キナーゼの発現量を概ね反映していた (図は結果の概略を示す)。



ここでAurora BとPlk1を阻害した時の染色体動態異常とは、染色体の中期赤道面への整列不全とロゼット上の染色体配列の程度について評価し、異常なし (0点) から軽度 (1点)、中程度 (2点)、高度 (3点) と段階的に評点をつけた。

(5) 阻害薬濃度を漸増したときの染色体動態を観察することによって、細胞の分裂期キナーゼ機能の推量できることが判った。この“Stepwise-challenging assay”と呼ぶアッセイの原理は確立したと言える。今後、他の分裂期キナーゼでも評価方法を確立し、さらに多種多様ながん細胞の検討をすすめたい。

## 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5件)

1: Shindo, N., Kumada, K., \*Hirota, T. (2012) Separase sensor reveals dual roles for separase coordinating cohesin cleavage and cdk1 inhibition. *Dev. Cell* 23: 112-123.

2: Deardorff MA., Bando, M., Nakato, R., Watrin, E., Itoh, T., Minamino, M., Saitoh, K., Komata, M., Katou, Y., Clark, D., Cole, KE., De Baere, E., Decroos, C., Di Donato, N., Ernst, S., Francey, LJ., Gyftodimou, Y., Hirashima, K., Hullings, M., Ishikawa, Y., Jaulin, C., Kaur, M., Kiyono, T., Lombardi, PM., Magnaghi-Jaulin, L., Mortier, GR., Nozaki, N., Petersen, MB., Seimiya, H., Siu, VM., Suzuki, Y., Takagaki, K., Wilde, JJ., Willems, PJ, Prigent, C., Gillessen-Kaesbach, G., Christianson, DW., Kaiser, FJ., Jackson, LG., Hirota, T., Krantz ID., \*Shirahige K. (2012) HDAC8 mutations in Cornelia de Lange syndrome affect the cohesin acetylation cycle.

*Nature* 489: 313-317.

3: Abe, S., Nagasaka, K., Hirayama, Y., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Aoyagi, Y., Obuse, C., and \*Hirota, T. (2011). The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II. *Genes Dev.* 25, 863-874.

4: Ito, G., Kanno, S., Uchida, K.S.K., Chiba, S., Sugino, S., Watanabe, K., Mizuno, K., Yasui, A., Hirota, T., and \*Tanaka, K. (2011). CAMP (C13orf8, ZNF828) is a novel regulator of kinetochore-microtubule attachment. *EMBO J.* 30, 130-144.

5: Smith, E., Hegarat, N., Vesely, C., Roseboom, I., Streicher, H., Straatman, K., Flynn, H., Skehel, M., Hirota, T., Kuriyama, R., \*Hochegger, H. (2011) Differential control of Eg5 dependent centrosome separation by Plk1 and Cdk1. *EMBO J.* 30: 2233-2245.

[学会発表] (計 28 件)

1: Hirota, T. How cells ensure separation of sister chromatids in mitosis. International Symposium on Molecular Medicine. 2013.02.28 (Suwon, Korea)

2: 広田 亨. M期プロテアーゼ・セパレーズの活性プローブによって分かったこと. 東京理科大学先端生命研・水曜セミナー. 2013.01.30. (野田)

3: Hirota, T. How cells ensure separation of sister chromatids in mitosis. Jacques Monod Conference "Cell cycle" 2012.09.05-09 (Roscoff, France)

4: Hirota, T. Consecutive functions of separase ensure the chromosome segregation switch. Seminar at Research Institute of Genetics and Development, CNRS. 2012.09.04 (Rennes, France)

5: 広田 亨. 染色体分離を執行するM期プロテアーゼ・セパレーズの活性制御. 特定領域研究「細胞増殖制御」終了シンポジウム. 2012.08.30-31. (大岡山)

6: Hirota, T. How cells ensure trigger chromosome assembly in cells entering mitosis. Symposium Proteolysis and Cohesion. 2012.08.23-24 (Vienna, Austria)

7: Hirota, T. How cells ensure separation of sister chromatids in mitosis. Seminar at Oxford University Dunn School of Pathology. 2012.04.19 (Oxford, UK)

8: Hirota, T. How cells ensure separation of sister chromatids in mitosis. Seminar at Cancer Research UK London Research Institute. 2012.04.18 (London, UK)

9: Hirota, T. Dual functions of separase ensure switch-like initiation of anaphase. Joint Spring Meeting of BSCB/BSCB/JSDB. 2012.04.15-18 (Coventry, UK)

10: Hirota, T. How cells ensure separation of sister chromatids in mitosis. Seminar at Imperial College London. 2012.04.13 (London, UK)

11: 広田 亨. がん細胞における異数性の発生要因を考える. 第28回新潟県立中央病院集談会・特別講演 2012.03.02 (上越)

12: 阿部優介, 広田 亨. アナログ感受性変異体による Greatwall キナーゼの機能解析. 第29回染色体ワークショップ. 2012.1.25-27 (秋保温泉)

13: 熊田和貴, 広田 亨. Separase の自己切断による染色体分配制御. 第29回染色体ワークショップ. 2012.1.25-27 (秋保温泉)

14: 進藤軌久, 広田 亨. Separase は染色体分離において一人二役を果たす. 第29回染色体ワークショップ. 2012.1.25-27 (秋保温泉)

15: Uchida, K.S.K., Hirota, T. Does the spindle-assembly checkpoint monitor the presence of tension? 第30回日本分子生物学会. ワークショップ. 2011.12.13-16 (横浜)

16: Hirota, T. Probing separase activity reveals its switch-like activation at the metaphase-to-anaphase transition. 第30回日本分子生物学会. シンポジウム. 2011.12.13-16 (横浜)

17: Shindo, N., Hirota, T. Dual role of separase during the metaphase-to-anaphase transition ensures chromosome segregation in mammalian cells. Annual meeting of American Society of Cell Biology. 2011.12.03-09 (Denver)

18: Hirota, T. How mitotic kinases control chromosome segregation. 熊本大学 GCOE・リエゾンラボ研究会. 2011.11.02 (熊本)

19: 広田 亨. 染色体分離の正確性を保証するメカニズム. ケミカルバイオロジー勉強会・理化学研究所. 2011.10.26. (和光)

20: Hirota, T. Heterochromatin protein 1 is an essential component of the chromosomal passenger complex to prevent missegregation of chromosomes.

21: Hirota, T. Heterochromatin protein 1 is an essential component of the chromosomal passenger complex to prevent mis-segregation of chromosomes. 平成23年度遺伝研研究会「クロマチンダイナミクスの分子機構」 2011.10.20 (三島)

22: Hirota, T. The switch-like activation of separase ensures chromosome segregation. The GCOE International Workshop "Mitosis". 2011.07.04 (Yokohama)

23: Hirota, T. Probing separase activity reveals its switch-like activation at the metaphase-to-anaphase transition. The MEXT Priority Research International Symposium "Cell Division". 2011.06.29-07.01 (Hakone)

24: 広田 亨. 染色体分離の同期性を保証するメカニズム. 北海道大学大学院・先端生命科学研究所・分子生物学特別セミナー. 2011.06.24. (札幌)

25: Hirota, T. Probing separase activity reveals its switch-like activation at the metaphase-to-anaphase transition. The 2<sup>nd</sup> Dynamic Kinetochores Workshop. 2011.06.15-18 (Vienna)

26: 広田 亨. がん細胞における異数性の発生要因を考える. 要望講演. 第52回日本臨床細胞学会総会. 2011.05.20-22. (福岡)

27: Hirota, T. How chromosome assembly is triggered in cells entering mitosis. Impromptu Seminar at the IMP. 2011.04.14 (Vienna)

28: Hirota, T. How chromosome assembly is triggered in cells entering mitosis. 6th UK-Japan Cell Cycle Meeting. 2011.04.10-13 (Windermere)

[図書] (計6件)

1: 進藤軌久、広田 亨 (2013) 総説「細胞分裂の仕組みに迫る—染色体分離のキラー酵素 separase の活性の可視化と作用機序の解明」バイオサイエンスとインダストリー. 71: 229-233.

2: 阿部優介、広田 亨 (2013) 総説「Greatwall によるリン酸化バランス調節に基づくM期開始制御」実験医学増刊号・ヒトと医学のステージへ拡大する細胞周期 (中山敬一編、東京、羊土社) pp. 175-181.

3: Kumada, K., and \*Hirota, T. (2012) Separase. Review. Handbook of Proteolytic Enzymes. Third Edition, Edited by Rawlings and Salvesen, Elsevier.

4: 広田 亨 (2012) 記事「がん医療を拓く—ふぞろいを狙い撃つ」ロハスメディカル 85 巻. 2012年10月号

5: 進藤軌久、広田 亨 (2012) 総説「バイオセンサーにより明らかにされた染色体分離におけるセパラーゼの異なる2つの役割」ライフサイエンス新着論文レビュー

6: Nagasaka, K., Gallego-Paez, L.M., \*Hirota, T. (2011) Mitosis and Meiosis: Molecular Control of Chromosome Separation. Review. Encyclopedia of Life Sciences, John Wiley & Sons, Ltd.

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: セパレーズ・バイオセンサー  
発明者: 広田亨、進藤軌久、熊田和貴  
権利者: 公益財団法人がん研究会  
種類: 仮出願

番号： 61/670306

出願年月日：平成24年7月

国内外の別：米国

〔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 (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

### (2) 研究分担者 なし

### (3) 連携研究者

阿部優介 (ABE YUSUKE)

公益財団法人がん研究会・がん研究所・  
実験病理部・博士研究員

研究者番号：50615896

内田和彦 (UCHIDA KAZUHIKO)

公益財団法人がん研究会・がん研究所・  
実験病理部・博士研究員

研究者番号：40380555

進藤軌久 (SHINDO NORIHISA)

公益財団法人がん研究会・がん研究所・  
実験病理部・博士研究員

研究者番号：00512253

熊田和貴 (KUMADA KAZUKI)

公益財団法人がん研究会・がん研究所・  
実験病理部・博士研究員

研究者番号：10370149