

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：23657118

研究課題名（和文） ゲノム継承を確実にする染色体分離の同期性を保証する仕組み

研究課題名（英文） Understanding the mechanism of synchronous chromosome segregation that ensures the faithful inheritance of genomic information.

研究代表者

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・研究員

研究者番号：00512253

研究成果の概要（和文）：

染色体が正常に分離するためには、姉妹染色分体の結合の解除と姉妹染色分体の紡錘体極の方向への引き離しが協調的に起こる必要がある。本研究により、セパレーズはプロテアーゼとして活性化したのち、Cdk1 キナーゼ活性を抑制することにより、姉妹染色分体の紡錘体極の方向への引き離しを促進することがあきらかになった。したがって、セパレーズが2つの役割を同時にはたすことにより正確な染色体分離を保証していると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

In order to ensure faithful chromosome segregation, cells have to coordinate the dissociation of cohesion and subsequent induction of poleward movement of disjoined sister chromatids. We found that separase inhibited the Cdk1 kinase activity upon its proteolytic activation to facilitate poleward movement of sisters. Thus, by consecutively acting as a protease and a Cdk1 inhibitor, separase coordinates two key processes to ensure faithful chromosome segregation.

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	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：分子生物学

キーワード：染色体、セパレーズ、染色体分離、コヒーシン、バイオセンサー、Cdk1 キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は、細胞分裂の度に染色体数が変動する「染色体不安定性」と呼ばれる性質を有していることがあり、この性質を獲得することが転移や浸潤といったがんの生物学的悪性度と関連していることが知られている。その臨床的な重要性にも拘らず、染色体不安定性の発生メカニズムは、よく分かっていなかった。

ヒトの細胞では、染色体が中期赤道面に整

列した後に、忽然と全ての姉妹染色分体が同時に分離しそれぞれの極へと引っ張られて分離することが知られている。この分離の適切なタイミングはどのような仕組みで決定されているのか？動原体より発信する「紡錘体チェックポイント」シグナルは、動原体と微小管の正しい結合が完了するまで後期の開始を抑制することによって、分離のタイミングを規定している。我々は、紡錘体チェックポイント信号の源泉を探る目的で動原体

の動態を生きた細胞で可視化することを試み、「動原体ストレッチング」と命名した現象を発見した (Uchida et al., 2009)。この現象が紡錘体チェックポイントの解除を促して染色体分離を誘導する動原体の運動であることが判明したので、現在、染色体不安定性との関連性を調べている。

2. 研究の目的

正確な染色体分離は、正確な動原体と微小管の結合によって達成されるが、その成否は紡錘体チェックポイントが厳重に監視している。しかし、チェックポイントを通過した細胞には安定した染色体分配が保証されているのか？ ヒトの細胞は、後期の開始時に染色体が「いっせいに」分離するという特徴があるにも拘らず、「染色体分離の同期性」についてはほとんど研究されていないため、その生物学的意義は未だ全く分かっていない。本研究では「染色体分離の同期性」に着目し、そのメカニズムの解明に挑戦する。がん細胞における「染色体不安定性」の病態究明の一步とする。

3. 研究の方法

(1) 単極後期の開始と紡錘体チェックポイントとの関連性の検討

後期のモデルとして単極後期を扱う前に、2極後期との相違を多角的に検討する必要がある。単極後期の誘導は Aurora B 阻害薬添加約 40 分後に観察されるので (Hauf et al., 2003)、Aurora B の不活性化が間接的に後期を誘導したと考えられる。先ず、通常の 2 極後期と同様に、単極後期の開始が紡錘体形成チェックポイントの解除を伴うのかを調べることは重要である。そのために、紡錘体形成チェックポイント活性の最終的なアウトプットを検出するため、APC/C の分解標的タンパク質であるサイクリン B 及びセクリンを蛍光標識した生細胞において単極後期あるいは 2 極後期を観察し、これらのタンパク質の分解動態を定量する。次に、チェックポイント分子である Mad2, BubR1 などの細胞内動態、微小管と動原体の結合状態、Cdk1 ほか分裂期キナーゼの活性、を経時間的に検討し、主として紡錘体形成チェックポイントの解除の観点から、単極後期と 2 極後期との類似性を明確にする。

(2) K-fiber による牽引力の瞬発的増大を誘導するスイッチング機構の解明

単極後期における「同期した染色体の極方向への移動」を制御していると考えられる微小管が、

どのような機構で瞬発的に牽引力を増大させるのかを解明することが、同期性の中核をなすと考えられる。先ずチューブリンおよび微小管の重合脱重合の指標となる EB3 を可視化した細胞を樹立して、単極後期開始に伴う微小管動態の変化を観察する。次いで、制御機構について、酵母の後期で Cdk1 と拮抗する Cdc14 が INCENP を脱リン酸化するという反応が後期に特異的な微小管動態に必須であることが知られているので (Pereira and Schiebel, 2003)、そのヒト相同遺伝子において同様の機構の存在を調べる。具体的には INCENP の疑似リン酸化変異体の導入によって、染色体の極方向への移動の同期性が損なわれている可能性がある。Cdc14 に相当する分子はヒト細胞で見つかっておらず、候補となるフォスファターゼについてノックダウンでその関与を検討する。

微小管動態観察の結果、K-fiber の選択的な脱重合が起こっている可能性があるが、その場合は、候補となる脱重合促進するモータータンパク質の活性 ON/OFFこそが、同期性の根源的反応であるかもしれない。脱重合活性の ON/OFF はリン酸化による制御が知られているので、INCENP 脱リン酸化に関与するフォスファターゼと Cdk1 との間で、緩やかな生化学反応を瞬間的な変化に変換するような「スイッチ」が存在していることが想定され、数理的なモデリングによる理解を試みる。

(3) 染色体分離の開始とセパレースの活性化及びコヒーシン分解のキネティック測定

単極後期で観察された「同期した染色体の極方向への移動」は、教科書的な理解に反し、コヒーシンの分解とは独立して、姉妹染色分体を引っ張る「エンジン」が別に存在していることを意味している。また、我々は先行研究において、微小管作動薬によって紡錘体形成チェックポイントを稼働させた状態において、部分的なセパレースの活性化が起こっている可能性を見出しているが、このこともコヒーシンの分解が染色体分離の直接的な引き金ではないことを支持している

(Nakajima et al., 2007)。従って、コヒーシンを分解するセパレーズの活性化と染色体分離とのタイミングを明確することが重要だが、細胞内に微量にしか存在しないセパレーズの活性を計測するのは難題である。そこで、本研究では、セパレーズ活性のレポーター細胞の開発に挑戦する。

セパレーズの切断配列を含むペプチドの両端に (Hauf et al., 2001)、緑色蛍光 (AcGFP) および赤色蛍光 (mCherry) を融合したプローブを作成し、それに染色体セントロメアへの局在化配列 (INCENP 由来) を付加する。ペプチドが切断されると、赤色蛍光が遊離して黄色が緑色に変化するという仕掛けで、セパレーズ活性を検出することを試みる。このセンサーを細胞に発現させて、細胞内局在、後期における切断およびそのセパレーズ依存性を検証する。その後、中期から後期への移行時、紡錘体チェックポイント稼働時におけるセパレーズの活性を経時的に定量し、これまで実は不明であったコヒージョン解除と染色体分離のタイミングを明確にする。

4. 研究成果

コヒーシン切断酵素であるセパレーズのバイオセンサー (特許出願済) を用いて染色体分離の前後におけるセパレーズの活性の変化を測定したところ、セパレーズは染色体全体で染色体分離の直前に急激に活性化していることがわかった。そこで、このような急激な活性化を可能にする機構を明らかにするために、セパレーズの抑制因子であるセキュリンあるいはサイクリンBの関与を調べたところ、それぞれ個別にセパレーズ抑制ができない条件ではセパレーズ活性化キネティックには異常は見られなかったが、両方ともセパレーズ抑制できない条件においては染色体分離より大幅に早く活性化が始まるが、弱い活性のままであることがわかった。さらにこの解析の過程で、サイクリンBによってセパレーズが抑制されない条件では (上記のようにセパレーズ活性化キネティックは正常だが)、染色体の極方向への移動に異常が見られた。詳細な解析の結果、この異常がサイクリンB-Cdk1 キナーゼがセパレーズによって抑制されなくなっていることによることを突き止めた。したがって、セパレーズがコヒーシン切断と同時に、サイクリンB-Cdk1 キナーゼの活性を抑制

して微小管による牽引力の増大を促進している、という予想外の結果を得たことになる (図1)。以上の結果をまとめて *Developmental Cell* 誌上にて報告した (Shindo et al., 2012)。



図1 セパレーズは二刀流
セパレーズはプロテアーゼとしてコヒーシンを分解すると同時に Cdk1 キナーゼの抑制も行なっている。
歌川国芳画 『報警忠孝伝 宮本武蔵』より

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3件)

- ① 進藤 軌久、広田 亨
細胞分裂の仕組みに迫るー染色体分離の鍵酵素 separase の活性の可視化と作用機序の解明ー
バイオサイエンスとインダストリー
71(3): 229-233
- ② 進藤 軌久、広田 亨
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

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/5439> (2012)

- ③ Norihisa Shindo, Kazuki Kumada and Toru Hirota

Separase sensor reveals dual roles for separase coordinating cohesin cleavage and cdk1 inhibition.

Developmental Cell 23:112-123. (2012)

[学会発表] (計5件)

- ① 進藤 軌久、広田 亨

セパレーズの急峻な活性化機構について
第30回染色体ワークショップ・第11回核ダイナミクス研究会合同会議

2012年12月19日~2012年12月21日, 兵庫県淡路市-淡路夢舞台国際会議場

- ② 熊田 和貴、進藤 軌久、広田 亨

染色体分配制御における Separase の自己切断の役割

第35回日本分子生物学会年会, 2012年12月11日~2012年12月14日, 福岡県福岡国際会議場

- ③ 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年1月27日, 宮城県仙台市-秋保温泉ホテルニュー水戸

- ④ 熊田 和貴、進藤 軌久、広田 亨

Separase 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年1月27日, 宮城県仙台市-秋保温泉ホテルニュー水戸

- ⑤ Norihisa Shindo and Toru Hirota

Dual role of separase during the metaphase-to-anaphase transition ensures chromosome segregation in mammalian cells

51th ASCB Annual Meeting, 4th Dec., 2011 Denver, CO, USA (2011)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: Separase sensor reveals dual roles for separase coordinating cohesin cleavage and cdk1 inhibition.

発明者: 進藤 軌久、熊田 和貴、広田 亨

権利者: 公益財団法人がん研究会

種類: 特許

番号: 仮出願番号 61/670, 306

出願年月日: 2012年7月11日

国内外の別: 外国

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.jfcr.or.jp/tci/exppathol/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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・研究員

研究者番号: 00512253