

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23870001

研究課題名（和文） 新規分子 CAMP が分裂期の染色体整列を維持させる分子機構の解明

研究課題名（英文） Elucidation of molecular mechanism for maintaining chromosome alignment regulated by novel protein, CAMP

研究代表者

伊藤 剛 (GO ITOH)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：60607563

研究成果の概要（和文）：

適切な染色体の分配にとって、染色体が分裂期中期に細胞中央部で整列することが必要である。これまでに申請者は染色体の整列の維持に働く新規分子を発見し、CAMP と命名した (*EMBO J*, 2011)。本研究は CAMP が染色体整列を維持させる分子機構の解明を目的とする。そこで、申請者は分裂期特異的に CAMP と結合する分子を同定し、これらの分子が CAMP の機能にどのように貢献するかを検討した。

研究成果の概要（英文）：

Accurate chromosome segregation requires proper chromosome alignment at equatorial region in metaphase. Recently, we identified novel molecule, CAMP, which plays an important role in a maintaining of chromosome alignment (*EMBO J*, 2011). In this study, we examined a molecular mechanism for the maintaining of chromosome alignment mediated by CAMP. Therefore, I identified a CAMP interacting protein during mitosis and then assessed a relationship between CAMP and the interacting protein involved in maintaining of chromosome alignment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：キーワード：細胞・組織、生物・生体工学、プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報の正しい伝達にとって、複製され

た染色体が細胞分裂時に2つの娘細胞へと均等に分配(染色体分配)される必要がある。近年、染色体分配の分子機構はその関連分子の同定と機能解析により明らかになりつつあるが、その制御機構は極めて複雑であり不明な点が多い。

これまでに申請者は脊椎動物にのみ保存され、染色体分配に関与する新規分子 CAMP (Chromosome Alignment Maintaining Phosphoprotein) を発見した (EMBO J, 2011)。適切な染色体分配にとって、染色体が分裂中期に細胞中央部で整列することが必要である。申請者は CAMP が染色体整列の維持に働く分子であり、CAMP の分裂期における部位特異的なリン酸化が染色体整列の維持に重要であることを明らかにした。

しかしながら、CAMP がどのようなリン酸化酵素によりリン酸化され、またどのような分子を介して染色体整列に機能しているかわかっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、CAMP はどのような分子機構により染色体整列の維持に機能するのか明らかにする。

そこで、CAMP に結合する分子の同定を中心とした研究により、CAMP がどのような分子を介して染色体整列を維持させているのか調べる。

3. 研究の方法

(1) CAMP と結合する分子の同定

テトラサイクリンの添加誘導により Flag タグをもつ CAMP 全長を発現する HEC293 細胞を樹立した。

この細胞を微小管重合阻害剤(ノコダゾール)処理により分裂期に同調させ、細胞を溶解し、Flag に対する抗体によって免疫沈降を

おこなった。この Flag-CAMP 抽出液中(免疫沈降産物中)に含まれる分子をマスマスペクトロメトリーにて同定した。

(2) CAMP をリン酸化するリン酸化酵素の同定

染色体分配の進行にとって重要な働きを持つリン酸化酵素を精製し、これらが昆虫細胞より精製した CAMP と直接結合し、CAMP がリン酸化されるかどうか調べた。

(3) CAMP と微小管の結合を検討

CAMP 全長を GST タグとの融合タンパク質として昆虫細胞や大腸菌にて発現させ、精製した。これらの精製したタンパク質と微小管を in vitro で反応させた後に、超遠心を行い、微小管と結合して沈殿するのかどうか調べた。

4. 研究成果

(1) CAMP と結合する分子の同定

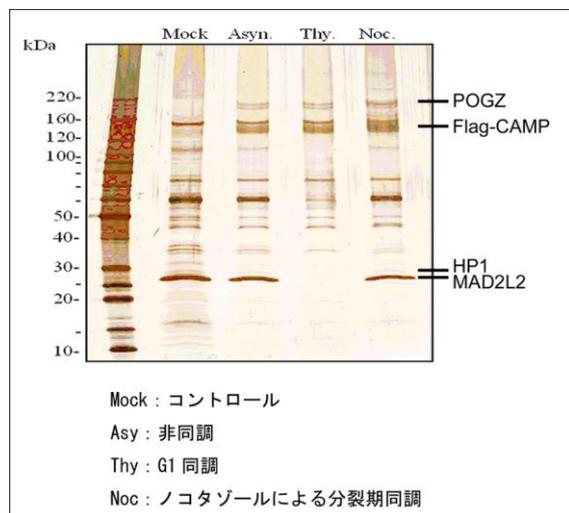


図 1: Flag-CAMP 免疫沈降実験の結果

Flag-CAMP 免疫沈降産物中に含まれる分子(図 1)をマスマスペクトロメトリーにより解析した結果、CAMP は主に HP1、POGZ、MAD2L2 と結合することが明らかとなった。近年、これらの分子が正常な染色体分配の進行にとっ

て機能する分子であることがわかってきた。今後は CAMP のどの部位がこれら分子と結合し、その結果 CAMP がこれらの分子とともにどのようにして染色体整列の維持に関与していくのかを解明する。

(2) CAMP をリン酸化する分子の同定

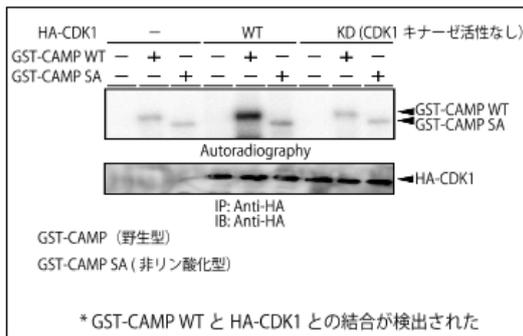


図 2: GST-CAMP と HA-CDK1 との結合実験

これまでに申請者は CAMP の分裂期特異的なリン酸化が CDK1 阻害剤である RO-3306 により薬剤処理された HeLa 細胞では抑制されることを明らかにした。そこで、CAMP は分裂期に CDK1 によりリン酸化されることが示唆された。今回、CAMP と CDK1 との直接的な結合とリン酸化の関係を調べた結果、リン酸化型の CAMP は CDK1 と結合する一方、全てのリン酸化部位をアラニンに置換した非リン酸化ミュータントでは CDK1 との結合は確認できなかった(図 2)。したがって、CAMP は CDK1 と直接結合することで、分裂期にリン酸化される分子であることがわかった。今後、CAMP のどの部位が CDK1 によってリン酸化されるのか、このリン酸化が CAMP による染色体整列の維持にどのように機能するのかを検討する。

(3) CAMP と微小管の結合を検討

CAMP は紡錘体微小管に局在する分子である。そこで、微小管と直接結合することが考

えられた。CAMP と微小管との結合実験 (Microtubule co-sedimentation assay) の結果、これらの直接的な結合は確認できなかった。したがって、CAMP と微小管が間接的に結合していることが考えられる。現在、HeLa 細胞を微小管重合剤である taxol 処理により分裂期に同調させ、細胞を溶解し、CAMP が CAMP 関連分子を介して重合した微小管に結合できるかどうかを検討している。

正確な染色体分配にとって、染色体が分裂中期に適切に整列することが重要であることがわかっている。近年、染色体分配に関与する分子が次々に同定されてきているけれども、この整列維持に関与する分子およびその仕組みはよくわかっていない。

CAMP は染色体整列維持に働く分子であり、本研究は CAMP と結合する分子の同定を主におこなっていった。今後の展望として、CAMP のどの部位が(1)で同定した CAMP 結合した分子とどのようにして結合することで染色体分配の維持に機能するのか明らかにすることを検討している。また、CAMP をリン酸化するリン酸化酵素の 1 つとして CDK1 を同定した。CDK1 による CAMP のリン酸化が CAMP と CAMP 結合分子との相互作用に寄与することで染色体整列を維持させるかどうかを結合実験と生細胞観察により順次確認していくことを予定している。これらの実験結果を総括することで、CAMP が染色体整列を維持させる分子機構の全貌を明らかにしていく。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

1. 伊藤 剛 (発表者)

新規分子 CAMP のキネトコア-微小管結合に関する機能

第 29 回染色体ワークショップ

平成 24 年 1 月 25 日

宮城県仙台市 ホテルニュー水戸屋

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :

2. 伊藤 剛 (発表者)

Function of CAMP (C13orf8, ZNF828) in kinetochore-microtubule attachment

第 34 回日本分子生物学会年会

平成 23 年 12 月 16 日

パシフィコ横浜

3. 伊藤 剛 (発表者)

染色体整列に働く新規分子 CAMP の機能について

日本生化学会・東北支部 第 77 回例会・シンポジウム

平成 23 年 7 月 23 日

東北大学さくらホール

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○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

Web-admin@idac.tohoku.ac.jp

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 剛 (Go Itoh)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号 : 60607563

(2) 研究分担者