

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770180

研究課題名(和文)適切な染色体分配を保障するセントロメア構造基盤の解明

研究課題名(英文)The Analysis of Molecular Basis of Mitotic Centromere

研究代表者

丹野 悠司 (Tanno, Yuji)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：20583123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：染色体の均等分配は、細胞が次世代へと正しい遺伝情報を継承するために必須であるが、均等分配を保障する分子メカニズムについては未解明の点が多い。また、多くのがん細胞は染色体不安定性と呼ばれる高頻度の分配異常を示し、この性質が細胞のがん化やがんの悪性を促進することが示唆されている。しかしながら、染色体不安定性をもたらす分子機構については明らかとなっていない。本研究において我々は、分裂期キナーゼ Aurora B が SG01 のセントロメア局在を促進し、均等分配を保障する分子機構を明らかにした。また、染色体不安定性が、SG01 の局在異常によってもたらされる可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：Equational segregation of sister chromatids is fundamental for inheritance of accurate genetic information. However, the underlying molecular mechanism ensuring equational segregation is unclear. Chromosomal instability (CIN), characterized by a high incidence of unequal segregation, is a hallmark of cancer cells and it has been suggested that CIN promotes initiation and progression of tumorigenesis. However, the molecular mechanism underlying CIN remains elusive. In this study, we found that the molecular pathway that Aurora B promotes accumulation of SG01 at centromere. Furthermore, we uncovered that the dysfunction of the molecular network regulating centromeric localization of SG01 can be a major cause of CIN.

研究分野：生物科学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：セントロメア 染色体分配

1. 研究開始当初の背景

体細胞分裂において染色体を均等に分配することは、正しい遺伝情報を次世代へと継承するために必須の過程である。不均等な分配による染色体数の変化(異数性)は、多くの場合に細胞死を誘導し、また、がん化やがんの悪性化の引き金となることも示唆されている。このことから、染色体分配に関わる分子機構の理解は、基礎生物学のみならず医学的な見地からも重要な課題である。

複製された染色体はコヒーシと呼ばれるタンパク質複合体によって全長に渡る接着を受け、姉妹染色分体ペアを形成する。細胞が分裂期へと進行すると、細胞両極から伸びるスピンドル微小管が姉妹動原体に接続し、反対向きに引っ張る力(張力)をおよぼすが、コヒーシによる接着がこの張力に拮抗することで、染色体は赤道面上へと整列することができる。すべての染色体が整列を終えたのち、コヒーシ解離因子セパレーズが活性化し、姉妹染色分体ペアの解消・分離が起こる。分離した染色体は、スピンドル微小管の張力により娘細胞へと均等に分配される。ヒトを含めた動物細胞では、分裂期においてセパレーズ非依存的にコヒーシをかい離させる脱離経路が存在し、姉妹染色分体の効率の良い解離に寄与することが知られている。シュゴシンタンパク質 SG01 は、セントロメアへと局在して脱離経路に拮抗し、コヒーシを維持する役割を持つ。SG01 の機能を破壊した細胞は、姉妹染色分体が早期に解離し、染色体が正しく分配されない表現型を示す。

このように、セントロメアにおける SG01 の機能は均等な染色体分配に極めて重要であるものの、その局在化メカニズムについては未解明の点が多く残されている。これまで、分裂期キナーゼ Aurora B がその活性を通じて SG01 のセントロメア局在を促進することが報告されているが、その分子メカニズムについては明らかとなっていなかった。また、多くのがん細胞は、高頻度に染色体の分配異常を示す性質(染色体不安定性)にともなう異数性を示すことがよく知られているが、細胞が染色体不安定性を獲得する分子基盤については明らかとなっていない。我々の予備実験において、種々の染色体不安定性がん細胞において SG01 の局在異常が観察されたことから、SG01 局在制御機構の破綻が、染色体不安定性を引き起こす原因となりうる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、(1)「SG01 のセントロメア局在を制御する分子機構の解明」および(2)「染色体不安定性の分子基盤の解明」を目的とし、以下の点について解析を行った。

(1)「SG01 のセントロメア局在を制御する分子機構の解明」

SG01 のセントロメア局在に寄与する

Aurora B キナーゼの基質の同定

基質分子のリン酸化の生理的意義の解明

(2)「染色体不安定性の分子基盤の解明」

染色体不安定性がん細胞株における SG01 の局在異常の解析

SG01 の局在異常を引き起こす分子基盤の解析

3. 研究の方法

(1)「SG01 のセントロメア局在を制御する分子機構の解明」

SG01 自身が Aurora B の基質である可能性を検討するため、大腸菌由来のリコンビナントタンパク質を用いて *in vitro* リン酸化アッセイを行った。

同定されたリン酸化部位が、*in vivo* においても Aurora B 依存的にリン酸化されていることを確認するため、リン酸化特異的抗体を作製し、SG01 免疫沈降産物を用いてウェスタンブロットを行った。

同定されたリン酸化が SG01 のセントロメア局在を促進する可能性を検討するために、GFP を融合した非リン酸化型 SG01 変異体を細胞に発現させ、その変異型タンパク質の局在を蛍光免疫染色により解析した。

において観察された SG01 局在異常の生理的意義について、姉妹染色分体の接着維持機能および染色体分配異常について解析した。

(2)「染色体不安定性の分子基盤の解明」

染色体不安定性を示す種々のがん細胞株における SG01 のセントロメア局在を、蛍光免疫染色により解析した。

で観察された局在異常の分子基盤を調べるため、SG01 の局在制御機構について解析を行った。

4. 研究成果

(1)「SG01 のセントロメア局在を制御する分子機構の解明」

大腸菌由来のリコンビナントタンパク質を用いて *in vitro* リン酸化アッセイを行った結果、SG01 の C 末端側に位置する HP1 相互作用モチーフ近傍が直接的にリン酸化されることを見出した。

において同定されたリン酸化部位に対する抗リン酸化 SG01 抗体を作製し、分裂期同調細胞からの SG01 免疫沈降産物を用いてウェスタンブロットを行った。その結果、リン酸化シグナルが観察された。Aurora B 阻害剤処理によりシグナルが消失したことから、*in vitro* において同定されたリン酸化部位が *in vivo* においてもリン酸化されていることを確認した。

野生型 SG01、および同定されたリン酸化部位をアラニンへと置換した SG01 に、GFP タグを付加して培養細胞へと発現させた。GFP 抗体を用いた蛍光免疫染色により、分裂期にお

ける局在を解析した。その結果、アラニン置換型 SG01 は野生型に比べてセントロメアへの集積が弱まることを見出した。

アラニン置換型 SG01 の局在異常が、分裂期染色体動態に及ぼす影響を解析するため、姉妹染色体分配の接着維持機能、および染色体分配の均等性について解析を行った。その結果、分裂中期に停止させた野生型 SG01 発現細胞の大部分が接着を維持していたのに対し、アラニン置換型 SG01 発現細胞においては姉妹染色分体の早期かい離の表現型が見られた。また、野生型 SG01 発現細胞に比べて、アラニン置換型 SG01 は高頻度に分配異常を示すことを見出した。

以上より、Aurora B は SG01 を直接的にリン酸化することで SG01 のセントロメア局在を促進し、適切な姉妹染色分体の接着維持を通じて染色体の均等分配を保障することが明らかとなった。

(2) 「染色体不安定性の分子基盤の解明」

染色体不安定性を示す種々のがん細胞株と、染色体分配が正常な細胞株を用いて蛍光免疫染色を行い、SG01 のセントロメア局在を調べた。その結果、SG01 のセントロメアにおける集積が、染色体不安定性株において高頻度に弱まっていることを見出した。

で見られた SG01 のセントロメア局在異常の原因を探るため、SG01 の局在を促進する因子として報告されている HP1 の局在を蛍光免疫染色により解析した。その結果、複数の染色体不安定性がん細胞株において HP1 のセントロメア局在が減弱していることが明らかとなった。さらにその分子機構を調べるために、HP1 のクロマチン上の足場となるヒストン修飾である H3K9 のメチル化のレベルについて解析を行った。その結果、HP1

の局在量の低下と対応して、H3K9 のメチル化レベルも弱まっていることを見出した。H3K9 メチル化-HP1 -SG01 の経路が染色体不安定性の原因となっている可能性を調べるために、H3K9 メチル化酵素である SUV39H1 にセントロメア局在因子 CENP-B を付加した融合タンパク質を細胞に発現させた。人工的にメチル化が促進されることを確認された細胞において、HP1 および SG01 の局在が上昇し、驚くべきことに染色体分配異常の表現型が抑圧されることを見出した。

以上より、SG01 の局在制御機構の破綻が、多くのがん細胞が示す染色体不安定性の原因となっている可能性が示唆された。

本研究により、細胞分裂における染色体分配の分子メカニズムの一端が明らかとなった。また、SG01 の局在化経路の破綻が、がん細胞において広く観察される染色体不安定性の分子基盤となっている可能性が示唆された。今後は、Aurora B による SG01 のリン酸化が、どのようにしてセントロメア局在を促進するのか、さらなる分子機構について解

析を進める。また、H3K9 メチル化-HP1 以外の SG01 局在化経路が、染色体不安定性株において破綻している可能性についても解析を進めていく。

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 2 件)

Yuji Tanno, Yoshinori Watanabe
Targeting condensin, a vital spot of MYCN-amplified neuroblastoma
Cell Cycle, 査読無, Vol. 13, 2014, pp. 1224

Yuya Yamagishi, Ching-hui Yang, Yuji Tanno, Yoshinori Watanabe
MPS1/Mph1 phosphorylates the kinetochore protein KNL1/Spc7 to recruit SAC components
Nature Cell Biology, 査読有, Vol. 14, 2012, pp. 746-752

[学会発表](計 3 件)

Yuji Tanno, Yoshinori Watanabe
Fine tuning of inner centromere localization of Sgo1 is crucial for chromosomal stability
The EMBO Workshop on Chromosome Segregation and Aneuploidy
2013年06月22日~2013年06月26日
Breukelen, The Netherlands

丹野悠司, 渡邊嘉典

シュゴシン Sgo1 の制御異常は染色体不安定性を引き起こす
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
福岡県福岡市

丹野悠司, 渡邊嘉典

シュゴシン Sgo1 のインナーセントロメア局在は正確な染色体分配を保障する
第24回高遠・分子細胞生物学シンポジウム
2012年08月23日~2012年08月24日
長野県伊那市

[図書](計 1 件)

丹野悠司, 渡邊嘉典
ライフサイエンス 領域融合レビュー
2012, 1巻, e004

[その他]

ホームページ
http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/watanabe-lab/watanabe_lab/Home.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

丹野 悠司 (TANNO, Yuji)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号：20583123