

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2017

課題番号：25711003

研究課題名(和文)セパレースパイオセンサーによる染色体分離機構の研究

研究課題名(英文)Understanding chromosome segregation using Separase biosensor

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,300,000円

研究成果の概要(和文)：セパレースの自己切断はセパレースの急激な活性化に必要なが、自己切断が積極的にセパレースを活性化するのではなく、自己切断によって抑制因子のサイクリンB1が結合しやすくなり、染色体分離直前まで厳格な抑制が維持されやすくなっていた。このセパレース活性の抑制が維持できなくなるという現象はがん細胞でひろく見られ、分裂期の長さとの関連が見出された。正常二倍体細胞において人為的に分裂期を長くすると、セパレース活性の抑制が維持できなくなり染色体分離異常が頻発することから、がん細胞で頻発する染色体分離異常も染色体分離開始の遅延とそれにとまうセパレース活性化異常が原因のひとつとなっている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Separase autocleavage was required for its sharp activation during mitosis. We found that instead of promoting separase activation, autocleavage maintained separase in inactive state until the onset of anaphase, by regulating binding of its inhibitor cyclin B1. This tight regulation of separase was widely abrogated in many cancer cell lines, which was highly correlated with longer mitosis. Treating RPE1-a widely used normal diploid cell line, with a low dose of nocodazole, prolonged mitosis and resulted in perturbed tight regulation of separase and frequent chromosome missegregation. Longer mitosis and subsequent deregulation of separase could provide explanation for the frequent chromosome missegregation in cancer cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：染色体分離 細胞分裂 セパレース がん細胞株

1. 研究開始当初の背景

正確な染色体分離は細胞の生存に必須である。染色体分離の分子基盤の理解は 1995 年頃からの 10 余年間に飛躍的に進展し、「紡錘体チェックポイント解除 セパレースの抑制因子分解 セパレース活性化 コヒーシン分解 染色体分離」という基本原理が確立された(Nasmyth, Cell, 2005)。そして出芽酵母を用いたエレガントな実験により、染色体分離の直接の引き金はセパレースによるコヒーシン分解である、ということが示されている(Uhlmann et al., Cell, 2000)。

我々は、プロテアーゼであるセパレースのバイオセンサーを開発し(特許出願中)、セパレースが染色体分離時に急激に活性化することを見いだした(Shindo et al., Dev Cell, 2012)。これにより、正確な染色体分離がセパレースの急激な活性化によって保証されていることは明らかになったが、この急激な活性化がどのようにして達成されるかについては未解明のままである。従来の説明では、セパレースの抑制因子であるセキュリンやサイクリン B1 が後期促進因子 APC/C により分解されてセパレースは活性化すると考えられてきたが、これらの抑制因子はセパレース活性化前にゆっくりと分解されている(Clute and Pines, Nat Cell Biol, 1999、Shindo et al., Dev Cell, 2012)。抑制因子がゆっくりと分解されているときに、セパレー스는どのようにして染色体分離直前まで抑制され続け、染色体分離時に突如として急激に活性化されるのだろうか？

2. 研究の目的

本研究ではセパレースのバイオセンサーを駆使してセパレースの急激な活性化機構を解明し、正確な染色体分離を保証する機構を明らかにすることを目的とする。従来、セパレースの活性化はその抑制因子が分解されることによって起きると説明されてきた。しかし抑制因子はゆっくりと分解されており、申請者らが報告したセパレースの急激な活性化を説明するには不十分であった。本研究では、より積極的な活性化機構としてセパレースの自己切断部位を介したフィードフォワード制御機構の存在を検証する。さらに自己切断は正常に起きるが、セパレースの急激な活性化が阻害されているがん細胞株の解析を行い、その要因を明らかにする。これにより染色体分離の鍵となるセパレースの活性制御機構が明らかになり、染色体分離機構の理解が深まるものと期待される。

3. 研究の方法

本研究ではセパレースのバイオセンサーを主要な解析手法として、セパレースの自己切断部位に着目して研究を展開する。セパレースの自己切断部位が切断できなくなると、「セパレース活性の上昇がゆるやかになる 染色体分離の同期性が大幅に崩れる 細

胞質分裂に失敗 細胞増殖が停止」という一連の異常が表現型として観察されている。本研究計画ではまず、自己切断がセパレースの急激な活性化に寄与する機構を明らかにする。そこで、セパレースのバイオセンサーを用いて、自己切断がセパレース活性化を促進する可能性を検証し、さらに、がん細胞で頻発する染色体分離異常とセパレース活性化の関係を調べるために、バイオセンサーを用いて正常細胞株とがん細胞株におけるセパレース活性化プロファイルを解析する。以上の生化学的、細胞生物学的知見をもとに、セパレース活性化について数理的モデリングを行い、セパレース活性化機構と染色体分離機構についての新たなモデルを提案する。

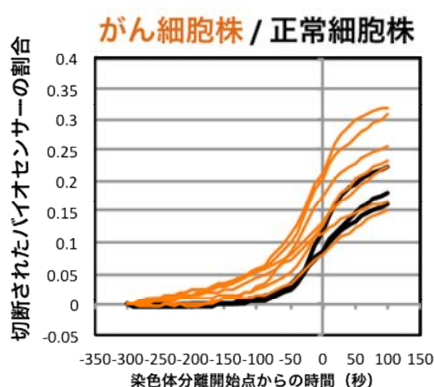
4. 研究成果

セパレースの自己切断がセパレースの活性化を促進する機構として、セキュリンと結合した状態のセパレースの自己切断部位を切断したらセキュリンがセパレースから解離することが考えられた。そこでセパレース・セキュリン複合体を精製し、自己切断部位に切断を入れたが、セキュリンの解離は見られなかった。また、セパレースが自己切断されることにより、セパレースに結合したセキュリンが分解されやすくなる可能性も考えられたが、切断の有無と分解のされやすさに相関はみられなかった。これらの結果から、自己切断によってセパレースが活性化されやすくなるのではなく、フィードフォワード制御機構は存在しないことが考えられた。

セパレースはセキュリン以外にもサイクリン B1 と結合することが知られており、我々はセパレースが染色体分離直前にサイクリン B1 と結合することを報告している(Shindo et al., Dev Cell, 2012)。セパレースがセキュリンとサイクリン B1 のいずれと結合するかについては、自己切断の有無との関連が明らかになっており、切断されていないセパレースはセキュリンと結合し、切断されたセパレースはサイクリン B1 と結合しやすいことがわかっている。自己切断されないセパレース変異体に結合するサイクリン B1 の量を調べたところ、野生型と比べて染色体分離直前の結合量が減少していることが明らかになった。サイクリン B1 はセパレースを抑制できることから、セパレースの急激な活性化というのは、活性の厳格な抑制を染色体分離の直前まで持続させることによって可能になっていると考えられた(投稿準備中)。

セパレースの厳格な抑制の維持ができなくなるという現象は一般的によく見られることなのだろうか？がん細胞では染色体分離異常が頻発し、その結果として生じる異数体はがん細胞の特徴としてよく知られている。また、セパレースの過剰発現も多く見られており、その過剰発現によって染色体分離異常がおきることが発がんの要因となるケ

ースも報告されている (Zhang et al., PNAS, 2008)。そこで、セパレーズバイオセンサーを用いて正常細胞株とがん細胞株におけるセパレーズ活性化の様子を調べた。正常細胞株として RPE1, HME1, TIG3 の解析を行い、がん細胞株としては U2OS, HeLa, MCF7, DLD1, HCT116, A549, HT1080 の解析を行った。正常細胞株はいずれの場合も染色体分離直前までセパレーズの活性化が抑えられ、急激な活性化とともに染色体分離が開始していたが、多くのがん細胞では染色体分離開始よりはるか前からセパレーズの活性が検出され、緩やかに活性化していることがわかった (下図)。



がん細胞株においてセパレーズの抑制の維持ができなくなり、活性化が緩やかになっていることが明らかになったが、これらのがん細胞株はセパレーズの自己切断部位に変異があるわけではない。がん細胞株におけるセパレーズの緩やかな活性化の原因を探るべく共通の特徴を調べてみたところ、この異常はがん細胞株の分裂期の長さ、特に核膜崩壊から染色体分離開始までの長さとの相関があることがわかった。さらに、正常二倍体細胞の RPE1 細胞を形質転換した細胞株を解析したところ、染色体分離の異常が頻発し、染色体分離開始も遅れ分裂期が長くなるとともに、セパレーズの活性化が緩やかになっていた。そこで、この正常二倍体細胞の RPE1 細胞を低濃度のノコダゾールで処理すると染色体分離の開始を遅らせることができるので、この条件でバイオセンサーを用いてセパレーズの活性化を解析したところ、活性化が緩やかになっていることが明らかになった。さらにこの時染色体分離の異常も頻発しており、正常二倍体細胞株でありながら形質転換細胞株と似たような特徴を示していた。がん細胞で頻発する染色体分離異常も、染色体分離開始の遅延と、それにとまなうセパレーズ活性化異常が主因となっていると考えられる。分裂期の以上の解析で得られた生化学的、細胞生物学的な知見を用いて、染色体分離過程におけるセパレーズ活性化機構の数理的モデリングを構築した (Konishi et al., Biomed. Res., 2018; Shindo et al., in preparation)。

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)

Makoto Konishi, Norihisa Shindo, Masataka Komiya, Kozo Tanaka, Takehiko Itoh, and Toru Hirota, Quantitative analyses of the metaphase-to-anaphase transition reveal differential kinetic regulation for securin and cyclin B1. Biomed. Res., vol. 39, no. 2, pp. 75–85, 2018. 査読有り

進藤 軌久 広田 亨
セパレーズの活性制御のしくみからひもとく染色体分離の機構
領域融合レビュー, 4, e007(2015)
DOI:10.7875/leading.author.4.e007
査読有り

高橋元子, 進藤 軌久, 広田 亨
ライブ・セル・イメージング解析を用いた細胞分裂研究法 バイオセンサーによる酵素活性の時空間的解析
Surgery Frontier, 21(2):89-93.(2014)
査読なし

進藤 軌久
癌と染色体分配機構
Surgery Frontier, 20(4):66-69.(2013)
査読なし

進藤 軌久, 広田 亨
細胞分裂の仕組みに迫る - 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 -
バイオサイエンスとインダストリー
71:229-233.(2013) 査読なし

[学会発表](計 9 件)

進藤 軌久, 小西 惇, 広田 亨
セパレーズの急激な活性化と安定した染色体分配
2017 年度 生命科学系学会合同年次大会
第 40 回 2 本分子生物学会年会 第 90 回日本生化学会大会, 2017 年 12 月 6 日~12 月 9 日, 兵庫県 神戸国際会議場

進藤 軌久, 広田 亨 (招待講演)
がん細胞におけるセパレーズ活性化の異常とその原因
第 69 回日本細胞生物学会大会, 2017 年 6 月 13 日~6 月 15 日, 宮城県 仙台国際センター

進藤 軌久, 広田 亨

がん細胞におけるセパレーズ・スイッチの異常とその原因
第34回染色体ワークショップ・第15回核ダイナミクス研究会、2017年1月11日～1月13日、千葉県 かずさアカデミアホール 0-43

進藤 軌久、広田 亨
がん細胞における染色体分離制御の時空間特性
第75回 日本癌学会学術総会、2016年10月6日～10月8日、神奈川県 パシフィコ横浜、E-3034

進藤 軌久、広田 亨
セパレーズ活性の時空間的制御
第33回染色体ワークショップ第14回核ダイナミクス研究会、2016年1月12日～1月14日、宮城県松島一の坊、0-12

松高 愛、進藤 軌久、広田 亨
染色体分離における Time-of-no-return を規定する分子機構の解明
第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8日～2015年10月10日 名古屋国際会議場

松高 愛、進藤 軌久、広田 亨
染色体分離における Time-of-no-return を規定する分子機構の解明
平成27年度 がん若手研究者ワークショップ、2015年9月2日(水)～9月5日(土) 蓼科グランドホテル滝の湯、0S-28

進藤 軌久、広田 亨
セパレーズ活性化における自己切断の意義
第37回日本分子生物学会年会、2014年11月25日～2014年11月27日、神奈川県 パシフィコ横浜 3W10-12

進藤 軌久、広田 亨 (招待講演)
セパレーズの急峻な活性化機構について
第36回日本分子生物学会年会、2013年12月03日～2013年12月06日、兵庫県神戸国際会議場

〔図書〕(計1件)

イラストで徹底理解する エピジェネティクスキーワード事典 羊土社
監修 牛島俊和、真貝 洋一

以下の部分を担当致しました。

第一部 ヒストンのリン酸化 進藤 軌久、広田 亨(pp.61-66)

第二部 その他の染色体制御 進藤 軌久、広田 亨(pp.116-122)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 細胞観察用蛍光プローブ、及びこれを使用する方法

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: 特許権

番号: PCT/JP2013/068894

出願年月日: 2013年7月10日

国内外の別: 国際

〔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

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし