

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640067

研究課題名(和文) 単一染色体のライブ観察による染色体不安定性の実体解明

研究課題名(英文) Elucidating chromosomal instability by chromosome tracking in live cell imaging

研究代表者

田中 耕三 (Tanaka, Kozo)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：00304452

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では大多数のがんで認められる染色体不安定性の実体解明を目指した。我々は細胞が生存できないレベルではなく、生存を許容するレベルの染色体不安定性ががんの発生・進展に重要であると考え、紡錘体中央への染色体のスムーズな整列の異常に着目した。これを解析するために1本の染色体を可視化してその動態を観察する手法を開発した。また染色体の整列にKidとCENP-Eという2つのモーター分子が関与していることを明らかにした(Nat Commun, 2015)。Kidを発現抑制した細胞では染色体の整列が遅れると共に染色体不安定性が引き起こされており、これは軽度の異常による染色体不安定性の出現の1例と考えられる。

研究成果の概要(英文)：We aimed to elucidate the mechanism of chromosomal instability commonly seen in cancer cells. We hypothesized that modest chromosomal instability that allows cell survival, not severe instability causing cell death, is involved in cancer formation and progression, and focused on the defect in efficient chromosome alignment to the spindle equator. To address the point, we developed methods to visualize single chromosome and observe its dynamics. We also found that two motor proteins, CENP-E and Kid, is involved in chromosome alignment (Nat Commun, 2015). In Kid-depleted cells, there was a delay in chromosome alignment and chromosomal instability was induced, exemplifying the occurrence of chromosomal instability by modest mitotic defects.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：癌 細胞・組織 染色体不安定性

1. 研究開始当初の背景

大多数のがん細胞では異数性が認められ、その背景には染色体不安定性が存在することから、染色体不安定性とがんの発生や進展には密接な関連が示唆される。近年染色体分配に関連する分子の探索が精力的に進められているが、染色体分配に重要な分子に異常があるとそもそも細胞が生存できない。そのため染色体不安定性の実体解明は立ち後れており、なぜ染色体分配の正確性に差があるのか、どのような場合に染色体分配の異常が起こり、なぜそれが継続的に許容されるのかといった問いへの明確な回答は得られていない。これまで我々は、高解像度のライブ観察により、分裂期初期に染色体が微小管と正しく結合し、紡錘体中央に整列する過程について研究を行ってきており (*Nature* 2005, *J Cell Biol* 2007, *Dev Cell* 2010, *EMBO J* 2011)、個々の染色体の整列の迅速性が分配の正確性を左右しているのではないかと考えている。しかし従来の観察では個々の染色体について整列の迅速さと分配の正確さとの関連を調べるのが困難であったため、特定の染色体を蛍光ラベルした種々の細胞株で、染色体の整列から分配までを継続して観察するという着想に至った。

2. 研究の目的

大部分のがん細胞では染色体数の異常(異数性)が認められ、この背景には細胞分裂時の染色体分配の異常(染色体不安定性)が存在する。しかし染色体分配に明らかかな異常があるとそもそも細胞が生存することができないため、染色体不安定性の本態については不明な点が多い。本研究では、正常細胞や染色体不安定性を示すがん細胞において、特定の染色体を蛍光ラベルしてそれが分配される過程を追跡することにより、どのような要因で染色体分配の異常が起こるのかを特定することを目的とした。また染色体の不均等分配を起こした細胞のそれ以降の挙動を追うことにより、染色体不安定性が成立する過程を解析することを目指した。これらの解析により、染色体不安定性の成立基盤が明らかになり、染色体不安定性からがん化に至る機構の理解につながることを期待された。

3. 研究の方法

本研究では、特定の染色体を蛍光ラベルし、その染色体の分裂期での挙動を追うことにより、染色体不安定性の実体を明らかにする。特定の染色体が蛍光ラベルされた細胞の樹立には CRISPR/Cas システムによるゲノム改変技術を用いる。このような細胞株を用いて、染色体整列のタイミングによる不均等分配の頻度を比較する。さらに染色体整列に関与する分子などの発現を抑制した際の不均等分配の頻度から、染色体

不安定性に関与する分子を同定する。

(1) 特定の染色体を蛍光ラベルした細胞株の樹立

まず染色体腕部の非コード領域に lacO 配列を挿入し、さらに lacO 配列に結合する LacI-GFP を細胞に発現させることにより、染色体を可視化する。用いる細胞株には H2B-mCherry や GFP-tubulin を発現させておき、染色体や紡錘体を可視化できるようにする。

(2) 蛍光ラベルされた染色体のライブ観察

1. で樹立した細胞株をライブ観察し、分裂期を通じて染色体の蛍光シグナルを追跡する。不均等分配を起こした染色体については、それ以前の過程を遡って、核膜崩壊時の位置、紡錘体中央への整列のタイミング、整列時の位置などを調べる。

(3) 染色体不安定性の分子基盤の解明

染色体不安定性を示さない細胞で、染色体整列の過程に関与する分子の発現を RNAi により抑制し、不均等分配の頻度が上昇するかどうかを検討する。このような分子としては、紡錘体や動原体上に存在するモーター分子、微小管のダイナミクスに関係する分子などがあり、これまで染色体分配に大きな影響がないとされているものが多い。これらの分子の発現を抑制した細胞をライブ観察することにより、染色体整列が個々の染色体レベルで分配の正確性に影響を与えている可能性を調べる。

4. 研究成果

(1) 特定の染色体を蛍光ラベルした細胞株の樹立

1 番染色体に lacO 配列が挿入されている U2OS 2-6-3 細胞に染色体マーカー(mCherry-H2B)、GFP-LacI、微小管マーカー(GFP-alpha-tubulin)を発現させた細胞を樹立した。また染色体腕部に 256 コピーの lacO 配列を CRISPR/Cas システムによって挿入するためのベクターを作成し、染色体上の目的の部位に挿入可能であることを PCR によって確認した。また lacO 配列が挿入された部位を可視化するための GFP-LacI を恒常発現する U2OS 細胞を樹立した。

一方単一染色体をライブ観察するための他の手法として、かずさ DNA 研究所より分与されたヒト人工染色体を導入した HeLa 細胞で、人工染色体を可視化してその分裂期における動態が観察できることを確認した。また PA-GFP-tubulin を発現する HeLa 細胞で、他の染色体より整列が遅れた染色体をレーザーにより可視化し、その後

の挙動を観察することに成功した。

(2) 蛍光ラベルされた染色体のライブ観察

U2OS 2-6-3 細胞より樹立した 1 番染色体を可視化した細胞でライブ観察を行った。その結果染色体分配の過程を通じて 1 番染色体の挙動を追跡することができた(図 1)。一方 1)細胞の同調が難しく、一度に多

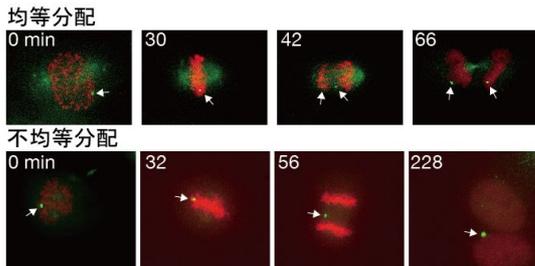


図1 単一染色体のライブ観察

1 番染色体: 矢印, 染色体: 赤, 微小管: 緑

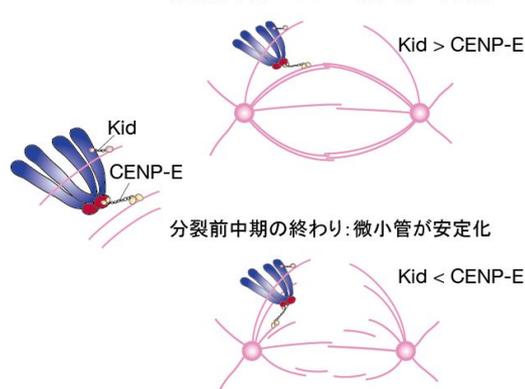
数の分裂期の細胞を観察することが困難である、2)lacO 部位を示す GFP ドットのシグナルをもつ細胞の割合が少ない、3)GFP ドットのシグナルが弱く長時間の観察が難しい、などの問題点も明らかになった。

一方 PA-GFP-tubulin を発現する HeLa 細胞で、他の染色体より整列が遅れた染色体をレーザーにより可視化する手法では、整列が遅れた染色体を特異的に追跡できるため、このような染色体のその後の挙動の解析には適していると考えられた。そこでこのような細胞株にキネトコアマーカ―や微小管マーカ―を導入することとした。

(3) 染色体不安定性の分子基盤の解明

染色体不安定性の分子基盤として紡錘体中央に染色体が整列するまでの動態が重要と考え、この過程に関与することが予想された 2 つのモーター分子 CENP-E と Kid に着目した。この過程はキネトコアが微小管の側面に結合した状態で起こると考えられ、その後キネトコアと微小管末端との安定した結合が形成される。今回この微小管末端との安定した結合をなくした状態で染色体の動態を観察することにより、Kid が染色体整列に関与することを初めて明らかにした。一方これまで染色体整列に関与することが知られている CENP-E については、微小管が不安定な場合にはむしろ染色体整列を阻害するようにはたらき、微小管が安定化してはじめて染色体整列にはたらくことが明らかになった(Nat Commun, 2016)。この結果から、微小管が不安定な分裂期の初期には Kid が、その後微小管が安定化すると CENP-E が主体となって染色体整列が行われるというモデルを提唱した(図 2)。Kid の発現を抑制した細胞では、染色体整

分裂前中期のはじめ: 微小管が不安定



分裂前中期の終わり: 微小管が安定化

図2 KidとCENP-Eによる染色体の紡錘体中央への整列のモデル

列自体は起こるものの整列にかかる時間が延長していた。このような細胞では染色体分配異常の頻度が上昇しており、また細胞間での染色体数のばらつきが大きく、染色体不安定性がひきおこされていることがわかった。これは細胞の生存に影響を及ぼさない軽度の異常によって染色体不安定性がひきおこされることを示す一例と考えられる。

また発現抑制によって染色体整列に異常を来す分子として、微小管結合因子 CLIP-170 に着目した。検討の結果 CLIP-170 の CDK1 によるリン酸化部位に分裂期キナーゼ Pik1 が結合し、これにより CLIP-170 が Pik1 のキネトコア局在に寄与していることが明らかになった(*J Cell Sci*, 2014)。さらに CLIP-170 がモーター分子ダイニンのはたらきを抑えることにより、キネトコアと微小管の結合を制御していることを見いだした(*FEBS Lett*, 2015)。これは CLIP-170 がキネトコアを微小管末端につなぎとめることにより、安定した微小管末端との結合の形成に関与していることを示唆すると考えられる。

以上の結果より、本研究において単一染色体を可視化してライブ観察する手法の開発に成功した。今後これらの手法を染色体不安定性の原因の解明に活用する予定である。また染色体不安定性の分子基盤の 1 つとして、染色体動態の異常を見いだした。今後のさらに検討を続け、がんでの染色体不安定性の原因の解明を行っていく予定である。

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7件)

1. Hasanpourghadi, M, Karthikeyan, C,

- Pandurangan, A, K, Looi, C, Y, Trivedi, P, Kobayashi, K, Tanaka, K, Wong W, F, Mustafa, M, R. Targeting of tubulin polymerization and induction of mitotic blockage by Methyl 2-(5-fluoro-2-hydroxyphenyl)-1H-benzo[d]imidazole-5-carboxylate (MBIC) in human cervical cancer HeLa cell. *J Exp Clin Cancer Res* (2016) 35, 58. 査読有
DOI: 10.1186/s13046-016-0332-0.
2. Amin, M, A, Kobayashi, K, and Tanaka, K. CLIP-170 tethers kinetochores to microtubule plus ends against poleward force by dynein for stable kinetochore-microtubule attachment. *FEBS Lett* (2015) 589, 2739-2746. 査読有
DOI: 10.1016/j.febslet.2015.07.036.
 3. Ohira, M, Iwasaki, Y, Tanaka, C, Kuroki, M, Matsuo, N, Kitamura, T, Yukuhiro, M, Morimoto, H, Pang, N, Liu, B, Kiyono, T, Amemiya, M, Tanaka, K, Yoshida, K, Sugimoto, N, Ohshima, T, Fujita, M. A novel anti-microtubule agent with carbazole and benzohydrazide structures suppresses tumor cell growth in vivo. *Biochim Biophys Acta* (2015) 1850, 1676-1684. 査読有
DOI:10.1016/j.bbagen.2015.04.013.
 4. Iemura, K, Tanaka, K. Chromokinesin Kid and kinetochore kinesin CENP-E differentially support chromosome congression without end-on attachment to microtubules. *Nat Commun* (2015) 6, 6447. 査読有.
DOI: 10.1038/ncomms7447.
 5. Tanaka, K. Mitosis. *eLS* (2015) 査読有
DOI:10.1002/9780470015902.a0001356.pu b2.
 6. 田中耕三. 特集 染色体安定性制御と疾患 総論 染色体不安定性の病態生理. *細胞* (2015) 47, 212-214. 査読無
 7. Amin, MA, Itoh, G, Iemura, K, Ikeda, M, Tanaka, K. CLIP-170 recruits PLK1 to kinetochores during early mitosis for chromosome alignment. *J Cell Sci* (2014) 127, 2818-2824. 査読有.
DOI: 10.1242/jcs. 150755.
- [学会発表](計21件)
1. 國安絹枝, 家村顕自, 田中耕三, 効率的な染色体整列の染色体安定性への関与、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-14日、松島一の坊(松島町・宮城)
 2. 池田真教, 田中耕三, M期キナーゼ Plk1による紡錘体チェックポイント制御機構の解明、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-14日、松島一の坊(松島町・宮城)
 3. 家村顕自, 田中耕三, 赤道面に整列した染色体でのキネトコア-微小管結合修正における Aurora A の役割、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-14日、松島一の坊(松島町・宮城)
 4. 田中耕三, 天然変性ハブ CAMP の機能と疾患・創薬との関連、よこはま NMR 研究会第54回ワークショップ、2016年1月8日、理化学研究所横浜事業所(横浜市・神奈川)
 5. 池田真教, 田中耕三, ゲノム安定性を司る紡錘体チェックポイントの新規分子機構の解明、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会、2015年12月1日-4日、神戸国際会議場(神戸市、兵庫)
 6. 國安絹枝, 家村顕自, 田中耕三, 効率的な染色体整列の染色体安定性への関与、第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会合同大会、2015年12月1日-4日、神戸国際会議場(神戸市、兵庫)
 7. 田中耕三, 効率的な染色体整列の異常による染色体不安定性の出現、第74回日本癌学会学術総会、2015年10月8日-10日、名古屋国際会議場(名古屋市、愛知)
 8. 小林絹枝, 家村顕自, 田中耕三, 効率的な染色体整列の染色体安定性への関与、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-5日、蓼科グランドホテル滝の湯(茅野市・長野)
 9. Iemura K, Tanaka K, Role of Kid and CENP-E on Efficient Chromosome Alignment, International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function, 2015年8月23日-26日、淡路夢舞台(淡路市・兵庫県)
 10. Iemura K, Tanaka K, Role of Kid and CENP-E on efficient chromosome alignment, 第10回研究所ネットワーク国際シンポジウム、2015年7月23日-24日、北海道大学医学部学友会館(札幌市・北海道)
 11. 家村顕自, 田中耕三, 効率的な染色体整列における Kid 及び CENP-E の機能解析、第67回日本細胞生物学会大会、2015年6月30日-7月2日、タワーホール船堀(江戸川区・東京都)
 12. 田中耕三, 染色体不安定性と発がん、第9回日本エピジェネティクス研究会、2015年5月25日-26日、学術総合センター(千代田区・東京)
 13. 家村顕自, 田中耕三, 効率的な染色体整列における Kid 及び CENP-E の役割、第81回日本生化学会東北支部例会、2015年5月9日、東北大学片平さくらホール(仙台市・宮城)
 14. Tanaka, K, Chromosomal instability: a road

to cancer and aging, Alfred Benzon Workshop, 2015年5月7日、コペンハーゲン(デンマーク)

15. 池田真教, 田中耕三, 体細胞分裂期でのM期チェックポイントを制御する新規分子機構の解明、第32回染色体ワークショップ・第13回核ダイナミクス研究会、2014年12月15日、安芸グランドホテル(廿日市市、広島)
16. 池田真教, 田中耕三, Mps1 キナーゼの局在・活性制御機構と分裂期チェックポイントにおけるその機能的役割の解明、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月26日、パシフィコ横浜(横浜市、神奈川県)
17. 家村顕自, 水野夏紀, 小林絹枝, 田中耕三, 効率的な染色体整列におけるKid及びCENP-Eの機能解析、第37回日本分子生物学会年会、2014年11月27日、パシフィコ横浜(横浜市、神奈川県)
18. 池田真教, 田中耕三, M期チェックポイントキナーゼ Mps1 の活性調節機構とその機能的役割の解明、第87回日本生化学会大会、2014年10月18日、京都国際会館(京都市、京都)
19. 家村顕自, 伊藤剛, 田中耕三, 染色体整列制御分子CAMPは分裂期停止時におけるがん細胞の生存に寄与する、第73回日本癌学会学術総会、2014年9月27日、パシフィコ横浜(横浜市、神奈川県)
20. 池田真教, 染色体恒常性の維持に必須な分裂期チェックポイント制御機構の解明、平成26年度がん若手研究者ワークショップ、2014年9月5日、蓼科グランドホテル滝の湯(茅野市・長野)
21. 田中耕三, 動原体キネシン CENP-E とクロモキネシン Kid による染色体運動の制御、理研シンポジウム第4回分子モーター討論会、2014年6月27日-28日、大阪大学(大阪市、大阪)

[その他]

ホームページ等

<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/molonc/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 耕三 (TANAKA, KOZO)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：00304452

(2)連携研究者

伊藤 剛 (ITO, GO)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：60607563

池田 真教 (IKEDA, MASANORI)

東北大学・加齢医学研究所・教育研究支援者

研究者番号：80645010