

がん細胞における染色体動態異常の メカニズム解明に向けた基礎的研究

[1] 組織

代表者：広田 亨

(公益財団法人がん研究会がん研究所・
実験病理部)

対応者：田中 耕三

(東北大学加齢医学研究所・分子腫瘍学
研究分野)

分担者：なし

研究費：物品費28.32万円、旅費0円

[2] 研究経過

細胞分裂に伴う遺伝情報の継承は、「染色体の構築」と、染色体の位置と分離のタイミングを決定する「微小管と動原体の相互作用」に依存している。すなわち、ゲノムを担うクロマチンは、細胞の分裂に先立って凝縮し、複製したDNAは姉妹染色分体として顕微鏡で観察できるようになり、染色体が構築される。こうして出来上がった染色体を分配するために、微小管が動原体に結合して、後期の開始とともに、同期的に分離される。これら一連のプロセスは、微小管の誤接続を解除する「修正機能」と、すべての結合を正しく修正するまでの時間を確保する「紡錘体チェックポイント」という細胞機能に依存している。従って、細胞分裂に際するゲノム情報の継承は、染色体を作る過程と、染色体を分ける過程の両輪が適正に機能することが必須である。本研究では、これらの細胞機能の制御にかかわっていることが明らかになりつつあるAurora B kinase あるいはPolo-like kinase 1 (Plk1)といった分裂期キナーゼの役割を切り口に、染色体動態制御の分子機構、ひいては、その破綻による染色体不安定性の分子背景を明らかにすることを目的とした。

染色体構築において中心的な役割を果たす因子がコンデンシン複合体である。ヒトではコンデンシン I と II のサブクラスが存在し、その構造はよく似ているものの、その動態および機能は異なり、それぞれが染色体構築において不可欠な役割を担っている。我々は先行研究で、分裂期キナーゼである Cdk1 と Plk1 によるコンデンシン II のリン酸化が、分裂期での染色体凝縮の引き金となることを見いだした(Abe et al. Genes

Dev. 2011)。しかし、Plk1のノックダウン細胞とコンデンシン II のノックダウン細胞とは異なる染色体凝縮異常を示すことから、Plk1 による染色体凝縮制御はコンデンシンIIのリン酸化に加え、他のタンパク質を基質とする系が存在することが示唆されていた。

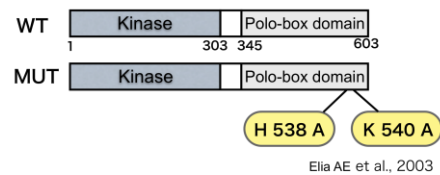
そこで、本共同研究においては、染色体の凝縮に関連する分子の中で、Plk1の基質を探索・同定することを目的とした。以下、研究活動状況の概要を記す。研究代表者、対応者はそれぞれ定期的(平均一ヶ月に一回程度)に加齢医学研究所(仙台)あるいはがん研究所(東京・有明)において、実験の方針やデータの解釈等の討議を繰り返し、研究を推進した。

[3] 成果

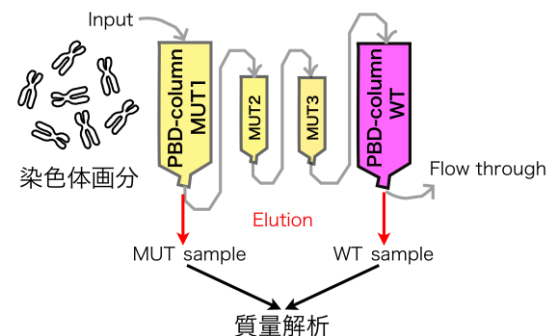
(3-1) 研究成果

(1) 新たに分裂期の染色体構築に関わる Plk1 の基質を探索するために、染色体上に存在するタンパク質の中から Plk1 の基質候補を質量分析によって解析した。Plk1のカルボキシル基末端側に Polo-box domain (PBD)があり、このドメインが基質と結合するという性質が知られている(下図参照)。したがって、PBD 結合タンパク質の中に基質が含まれていると考えられた。

Domain structure of Plk1



PBD pull down法による基質候補の探索

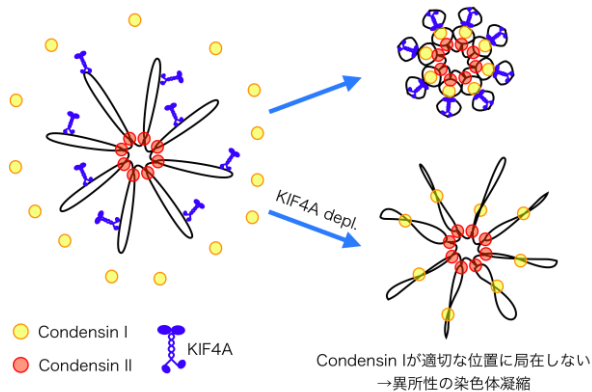


(2) 染色体画分を濃縮した細胞抽出液を調整した。そ

の中から特異的に PBD 結合タンパク質を得るために、基質と結合しない変異型の PBD (MUT) を作成し、まずは MUT のカラムにかけて、非特異的に結合するものをできるだけ除いた後、Wild-type の PBD カラムに用いた。

(3) WT カラム結合タンパク質に存在するが、MUT カラムには結合しないタンパク質のうち、モータータンパク質として知られる KIF4A に着目した。KIF4A は分裂期染色体の軸索構造に存在し、染色体凝縮に関与することが知られている。実際に KIF4A をノックダウンすると、分裂期の染色体は短軸方向に幅広くなり、anaphase bridge などの分配異常の頻度が増すが、その分子背景はよく分かっていない。

(4) 免疫沈降法で KIF4A が分裂期においてコンデンシン I と共沈することを見いだした。免疫蛍光染色を用いると、KIF4A のノックダウン細胞では、染色体軸索構造上にあるコンデンシンの I 型のみが蛍光減弱を認めた。一方で、生化学的に調べてみると、興味深いことに KIF4A をノックダウンしてもコンデンシン I の染色体との結合量には影響しないことが示めされた。



(5) これらの結果は、コンデンシン I が、染色体の軸索構造に濃縮されるためには KIF4A との相互作用が必要であることを示唆している(図参照:作業仮説)。従って、染色体構築において KIF4A は Plk1 活性の主要な基質と位置づけることができ、Plk1 がいかんにして KIF4A を制御するのか、現在、作業仮説の検証を繰り返しつつ解析を進めている。

(3-2) 波及効果と発展性など

Polo キナーゼ (Plk1) は、がん遺伝子としての特性も有している。つまり、分裂期キナーゼをマウス線維芽細胞に過剰発現すると形質転換能を有するがん遺伝子としてふるまうことが示されている。実際に、

Plk1 キナーゼは様々なヒト癌組織において過剰発現することが知られ、その発現量が予後と相関している癌腫も報告されている。従って、分裂期キナーゼは癌の発生や進展に中心的な役割を担っていると考えられ、分子標的治療薬のターゲットとしても期待されているが、このキナーゼの過剰発現がどのようにして細胞の悪性化に寄与するのか? という肝心なところは未だ分かっていない。ここで調べている染色体構築の制御機能との関連性が着目される。

本研究の最終的な狙いは、がんという疾患の本質を理解することにある。そのために、ここに得られた Plk1 による染色体の制御についての知見を基礎にして、分裂期キナーゼの関わる細胞の悪性化機構の解明、染色体不安定性と細胞がん化との関連性の解明、あるいは新たながんの分子診断法、分子標的治療法の開発に繋げたい。

[4] 成果資料

- 1) Itoh, G., Sugino, S., Mizuguchi, M., Kanno, S., Amin, MA., Iemura, K., Ikeda, M., Yasui, A., Hirota, T., Tanaka, K. (2013) The nucleoporin Nup188 is required for chromosome alignment in mitosis. **Cancer Sci.** In-press.
- 2) Shindo, N., Kumada, K., Hirota, T. (2012) Separase-sensor reveals dual roles for separase coordinating cohesin cleavage and cdk1 inhibition. **Dev. Cell** 23: 112-123.
- 3) Abe, S., Nagasaka, K., Hirayama, Y., Kozuka-Hata, H., Oyama, M., Aoyagi, Y., Obuse, C., *Hirota, T. (2011) The initial phase of chromosome condensation requires Cdk1-mediated phosphorylation of the CAP-D3 subunit of condensin II. **Genes & Dev.** 25: 863-874.
- 4) Ito, G., Kanno, S., Uchida, K.S.K, Chiba, S., Sugino, S., Watanabe, K., Mizuno, K., Yasui, A., Hirota, T., *Tanaka, K. (2011) CAMP (C13orf8, ZNF828) is a novel regulator of kinetochore-microtubule attachment. **EMBO J.** 30: 130-144