

学位論文

染色体整列を制御する新たな分子機構の解析

(Analysis of a novel molecular mechanism for chromosome alignment)

平成 27 年 3 月博士（理学）申請

東京大学大学院理学系研究科
生物化学専攻

家村 顕自

Abstract

細胞分裂期における正確な染色体分配には、中期での赤道面への染色体整列が必要であり、これは、染色体の赤道面への移動や動原体と紡錘体微小管との誤った結合の修正を含む、複雑な過程によって成される。AMPK (AMP-activated protein kinase) γ は代謝調節を担うキナーゼ AMPK 複合体の一員であり、M 期キナーゼ Plk1 の基質候補分子として見出されていたが、分裂期における役割は未知であった。本研究では、HeLa 細胞を用い分裂期における AMPK γ の機能を解析した。その結果、AMPK γ は AMPK 複合体非依存的に赤道面から離れて位置する一部の染色体の赤道面への整列に寄与することが分かった。分裂期初期に赤道面から離れて位置する染色体は、誤った動原体-微小管結合（シンテリック結合）を生じやすい。シンテリック結合は極近傍で、分裂期キナーゼ Aurora B の活性依存的に動原体-微小管結合が修正され、その後赤道面へ移動する。AMPK γ 発現抑制によって生じた不整列な染色体の動原体では Aurora B 活性が維持されていたが、80%以上がシンテリック結合を示していた。以上の結果から、AMPK γ は Aurora B による動原体-微小管結合の修正経路とは異なる経路もしくはその下流で、シンテリック結合の修正に関与する分子であることが示唆された。また、AMPK γ 発現抑制分裂期細胞の紡錘体極を観察し、動原体-微小管結合修正異常が分裂期中心体の崩壊を引き起こす素因となることを見出した。一方で、AMPK γ 発現抑制細胞における分裂期異常細胞の割合は約 30%と低く、大半の分裂期細胞は動原体-微小管結合修正以前の制御過程によって染色体整列が制御されていることが考えられた。そこで、分裂期初期における染色体の赤道面への移動を詳細に解析した結果、前中期初期の染色体の移動は Kinesin-10/Kid が担っており、Kid と動原体キネシン Kinesin-7/CENP-E が分裂期進行に伴い使い分けられることによって効率よく染色体整列がなされるという新たな制御機構を明らかにした。

Abstract

Proper kinetochore-microtubule attachment is essential for faithful chromosome segregation at mitosis. Because the initial formation of improper attachments is almost unavoidable, the attachment correction process is crucial. In this study shows a novel role for AMP-activated protein kinase- γ (AMPK γ) in this process. AMPK γ is a component of AMPK complex consisting of a catalytic subunit and two regulatory subunits. The depletion of AMPK γ , but not AMPK α or AMPK β , produces misaligned chromosomes in HeLa cells, suggesting a mitotic function for AMPK γ , independent of its function as the AMP-sensing regulatory subunit of AMPK. In AMPK γ -depleted cells, several chromosomes remain unaligned near the spindle poles, while the majority of chromosomes align properly at the metaphase plate. In early mitosis, the chromosomes that failed to establish bipolar kinetochore-microtubule attachments are transported toward pole. The state of kinetochore attachment in fixed AMPK γ -depleted cells and found that more than 80% of misaligned kinetochore pair showed syntelic attachment (both sister kinetochores attached to the same spindle pole). From these results, I speculate that AMPK γ is involved in correction of syntelic attachments. In addition, this study found that correction error of kinetochore-microtubule attachment is predisposed to the centrosomes fragmentation. On the other, population of misaligned chromosomes in AMPK γ -depleted cells was low. Thus, this study focused on the molecular mechanism of chromosome alignment at early prometaphase. The motion and position analysis of chromosomes in Hec1-depleted mitotic cells revealed that Kinesin-10/Kid and Kinesin-7/CENP-E differentially supports efficient chromosome alignment during mitotic progression.

目次

	頁
Abstract	1-2
目次	3-4
略語一覧	5
第一章 序論	6-15
第二章 材料と方法	16-21
第三章 結果	
第一部 AMPKγ はシンテリック結合修正に寄与する	22-35
・ AMPK γ の発現抑制は染色体整列異常を引き起こす。	22
・ AMPK γ は AMPK 活性非依存的に染色体整列に寄与する。	22-24
・ AMPK γ 発現抑制細胞においても二極紡錘体結合は確立できる。	24-26
・ AMPK γ 発現抑制によって、染色体の赤道面への移動が抑制される。	26-27
・ AMPK γ 発現抑制細胞ではキネトコア-微小管結合修正に異常をきたす。	27-30
・ AMPK γ 発現細胞における不整列なセントロメアでは Aurora B が活性化している。	30
・ AMPK γ 発現抑制によるシンテリック結合は、姉妹キネトコアにかかる不均衡な張力によって生じる。	31-32
・ AMPK γ の 21 番目のスレオニン残基は AMPK β の染色体整列に対する機能に必須である。	32-35
第二部 キネトコア-微小管結合修正は二極性紡錘体極の維持に必須である	36-40
・ AMPK γ の発現抑制は中心体辺縁物質 (PCM) の収束異常を誘起する。	36-37
・ PCM の収束異常は染色体整列異常を引き起こさない。	37-38
・ PCM の収束異常は不整列な染色体に依存して生じる。	38
・ AMPK γ 発現抑制細胞における PCM の収束異常は紡錘体極にかかる力によって引き起こされる。	39
・ 分裂期進行遅延は多極紡錘体形成を促進する	40

第三章 結果	
第三部 側面結合染色体の赤道面への集合における Kid 及び CENP-E の役割	41-47
・ Kid は染色体整列に寄与する	41
・ Hec1 を発現抑制することで、側面結合染色体が誘導される	42
・ Kid は側面結合染色体の赤道面への移動に寄与するが CENP-E は抑制的に働く	43-45
・ Kid による背臆面結合染色体の運搬はモーター活性に依存する	45-46
・ 側面結合染色体の移動における CENP-E の寄与は微小管の安定性に依存する	46-49
第四章 考察と展望	
第一部	50-53
第二部	54-56
第三部	57-61
引用文献	62-74
図及び表	75-99
謝辞	100-100

略語一覧

- Spindle assembly checkpoint, **SAC**
- Anaphase-promoting complex/cyclosome, **APC/C**
- Chromosome passenger complex, **CPC**
- Polo-like kinase 1, **Plk1**
- AMP-activated protein kinase, **AMPK**
- Cystationine β -synthase, **CBS**
- Auto-inhibitory sequence, **AIS**
- Pericentriolar material, **PCM**
- γ -Tubulin ring complex, **γ TuRC**
- Microtubule organizing center, **MTOC**
- Kizuna, **Kiz**
- Anti-centromere antigen, **ACA**

第一章 序論

分裂期は DNA 複製期 (S 期) において複製された染色体を娘細胞に均等に分配する時期である。分裂期進行の異常は染色体不均等分配を促し、染色体の不安定性や異数性を引き起こす。染色体数の異常や不安定化は、多くの癌細胞で観察されている他、クラインフェルター症候群、ダウン症候群など数多くの先天性疾患の原因として報告されている。これらのことから明らかに、分裂期進行と共に染色体を娘細胞に均等分配する機構は、細胞の恒常性維持に必須な機構である (Saunders *et al.*, 2000; Bakhoum *et al.*, 2009)。

染色体分配は、二極の紡錘体極 (中心体) とそこから伸長する微小管の束からなる紡錘体、染色体中央部のセントロメア領域に位置するキネトコアなどから成る分裂装置に局在する分子が、リン酸化などの翻訳後修飾を受けることにより時空間的に制御され進行する。動物細胞における分裂期は大別して、中心体分離・染色体凝集が始まる前期、核膜崩壊・紡錘体形成・染色体移動が起きる前中期、赤道面への染色体整列とスピンドルチェックポイント (Spindle assembly checkpoint : SAC) が解除される中期、染色体分離が起きる後期、核膜形成と細胞質分裂が始まる終期の 5 段階からなる。なかでも、分裂期中期に存在する SAC は分裂期進行を規制する要とされている。分裂期後期に起こる染色体の分配には、SAC が解除されることが必須条件である。酵母や昆虫の精母細胞における減数分裂過程の研究から、SAC は全ての染色体が赤道面に整列し、二極から伸びる微小管が姉妹キネトコアそれぞれを捉え二極紡錘体結合を確立した際に姉妹キネトコア間に生じる張力に応答して解除されると考えられている (Nicklas and Ward, 1994; Biggins and Murray, 2001)。SAC の解除は、SAC 因子である Mad2, Bub1, BubR1 などが dynein/dynactin 複合体によってキネトコアから紡錘体極に運ばれることでキネトコアから遊離し、後期促進複合体 (anaphase-promoting complex/cyclosome : APC/C) が活性化することで引き起こされる (Howell *et al.*, 2001; Musacchio and Salmon, 2007)。SAC が解除されない場合、分裂

期は後期に移行せず、多くの細胞は細胞死に至る。一方、動物細胞株を用いた研究では、赤道面に並ばない染色体が僅かに残っている場合でも、全てのキネトコアが微小管と結合する条件下では染色体不均等分配を伴いながら分裂期後期へ進行する様子が観察されており (Hauf *et al.*, 2003; Lončarek *et al.*, 2007)、SAC の解除がキネトコア間に生じる張力によるものなのか、キネトコアと微小管が結合することによるものなのかについては依然として議論が継続している (Tanaka and Hirota, 2009)。いずれにせよ、染色体整列は、染色体の均等分配における重要な制御機構の一つであることは疑いない。

染色体整列は核膜崩壊後、分裂装置の動的な制御によって速やかに進行する。核膜崩壊後、キネトコアは微小管側面に結合 (側面結合) し (図 1A)、染色体は紡錘体表面を滑るように赤道面へ向けて移動する (図 1B, Magidson *et al.*, 2011)。大部分の染色体が赤道面上まで移動すると、側面結合は微小管末端とキネトコアの結合 (末端結合) に変換され二極紡錘体結合を確立する (図 1C, Magidson *et al.*, 2011)。このとき、二極間に位置する一部の染色体は、速やかに赤道面へ移動できる (図 1A, B, Hayden *et al.*, 1990; Itoh *et al.*, 2010; Magidson *et al.*, 2011)。一方、どちらか片方の極に近い場所に位置するもしくは最終的に二極紡錘体結合を確立できなかった染色体は、一極から伸びる微小管にキネトコアが結合し (単極紡錘体結合)、微小管が伸びている極へと移動する (図 1B, Walczak *et al.*, 2010)。単極紡錘体結合には、姉妹キネトコア双方が一極から伸びる微小管に捕捉されているシンテリック結合と姉妹キネトコアの片方が捕捉されているモノテリック結合の2種類が存在する (図 1D, Hayden *et al.*, 1990; Rieder and Alexander, 1990; Nicklas and Ward, 1994; Tanaka *et al.*, 2005)。極へと移動した染色体はその後、微小管依存性キネトコアモータータンパク質 Kinesin-7/CENP-E によって赤道面に運ばれる (図 1E)。この際、CENP-E は既に形成している紡錘体微小管の側面に結合し、紡錘体微小管をレールにして染色体を運ぶ (Kim *et al.*, 2010)。キネトコア-微小管結合を確立しているキネトコアは、微小管側面への結合

能が著しく低下するため、極近傍でシンテリック結合を引き起こした染色体は、一旦キネトコア-微小管結合を解離（キネトコア-微小管結合修正）する必要がある（図 1D, Wood *et al.*, 1997; Lampson *et al.*, 2004; Kapoor *et al.*, 2006; Cai *et al.*, 2009）。キネトコア-微小管結合を修正し、モノテリック結合となった染色体が CENP-E によって赤道面へ運ばれ、二極から伸びる微小管にキネトコアが捕捉されることで二極紡錘体結合を確立し赤道面へ整列する（図 1E, F, Nicklas and Ward, 1994）。赤道面に整列した染色体には、姉妹キネトコア双方がそれぞれの極から伸びる微小管と結合しているアンフィテリック結合と、双方の姉妹キネトコアはそれぞれの極から伸びる微小管と結合しているが、そのうちの少なくとも片側のキネトコアは両方の極から伸びる微小管と結合しているメロテリック結合が存在する（図 2, Tanaka and Hirota, 2009）。メロテリック結合を引き起こした姉妹キネトコアのうち、両極から伸びる微小管に結合している側のキネトコアは両極から引っ張られる状態になっているため、染色体分配の際に娘細胞への分配が遅れ（ラギング染色体）、不均等な染色体分配を引き起こす（Cimini *et al.*, 2006）。このためメロテリック結合は分裂期後期へ進行する前にアンフィテリック結合に修正されなければならない。このように染色体を赤道面へ運搬し整列させるためにはキネトコアが微小管と正しく結合することが必要であり、シンテリック結合やメロテリック結合のような染色体の運搬や分配に支障をきたすような異常な結合は正確に修正されなければならない（Nicklas and Ward, 1994）。

キネトコア-微小管結合修正は分裂期キナーゼ Aurora B によって制御されている。Aurora B は INCENP、Borealin、Survivin と結合することで、染色体パッセンジャー複合体（Chromosome passenger complex : CPC）を形成しセントロメア領域に局在する（Ruchaud *et al.*, 2007）。Aurora B はキネトコア-微小管結合の要としてキネトコアに局在している KNL1、Mis12 複合体、Ndc80 複合体（総称して KMN ネットワーク）をリン酸化することでキネトコアの微小管に対する結合能を抑制している（図 2A, Cheeseman *et al.*, 2002; Hauf *et al.*, 2003; Cimini *et al.*, 2006）。

Aurora B のキネトコア分子に対するリン酸化活性は CPC とキネトコアの物理的な距離によって定義されている (Andrews *et al.*, 2004; Kline-smith *et al.*, 2004, Liu *et al.*, 2009)。二極紡錘体結合の確立によりキネトコアが両極から引っ張られると、姉妹キネトコアはそれぞれセントロメア領域の外側に逆方向に配向する (back-to-back)。その結果、CPC とキネトコアの距離が離れることで、Aurora B のキネトコア分子へ対するリン酸化活性が低下し、キネトコア-微小管結合は安定化する (図 2B, Liu *et al.*, 2009)。メロテリック結合の場合、両極から伸びる微小管に結合しているキネトコアは逆方向から伸びる微小管にも引かれることとなる。その結果、両極から伸びる微小管に結合しているキネトコア部位が CPC 局在域に近づき、異常な結合を引き起こしたキネトコアに対する Aurora B のリン酸化活性が選択的に高まる。そして、異常な結合が選択的に不安定化し、メロテリック結合は修正される (図 2C, Cimini *et al.*, 2006; Sakuno *et al.*, 2009)。単極紡錘体結合であるシンテリック結合は、一方向から引っ張られるため、キネトコアの配向はセントロメア領域から見て同方向に配向する (side-by-side, Lončarek *et al.*, 2007)。この場合、キネトコアは CPC の局在領域に常に近い位置に存在すると考えられており、シンテリック結合のキネトコア-微小管結合は常に不安定に保たれているのではないかと考えられている (図 2D)。セントロメアに局在し、微小管脱重合活性を持つ Kinesin-13/MCAK を発現抑制すると、メロテリック結合やシンテリック結合が増加することが報告されている (Kline-smith *et al.*, 2004)。このことから、異常なキネトコア-微小管修正には MCAK の微小管脱重合活性が必要であると考えられているが、*in vitro* において MCAK の微小管脱重合活性は Aurora B のリン酸化によって不活性化されることが報告されており (Andrews *et al.*, 2004)、Aurora B 活性依存的に異常なキネトコア-微小管結合が修正されるモデルとは食い違う。このため、実際どのようにシンテリック結合が修正されているのかという点については関連する分子を含め不明な点が多い。

当研究室では以前に固相リン酸化法を用いて分裂期キナーゼ Polo-like kinase 1 (Plk1) の基質

候補分子を網羅的に同定した (Oshimori *et al.*, 2006)。Plk1 は分裂期特異的に発現、活性化するキナーゼで、中心体、紡錘体、キネトコア、中央紡錘体領域 (mid-zone)、中央体 (mid-body) に局在し、様々な分子をリン酸化する。中心体の分離、染色体整列、キネトコア-微小管結合、分裂溝形成の制御に関わっていることが報告されており、分裂期進行に必須なキナーゼの一つとして知られている (Lane and Nigg, 1996; Hanisch *et al.*, 2006; Matsumura *et al.*, 2007; Neef *et al.*, 2007)。本研究のターゲットである AMP-activated protein kinase (AMPK) γ も Plk1 基質候補分子の網羅的な同定によって新たに基質候補分子として見出された。

AMPK は主に代謝調節を担うセリン/スレオニンキナーゼとして多くの真核生物で存在が確認されている。哺乳動物における AMPK は α , β , γ の三種類のサブユニットからなり、 α サブユニットにキナーゼ活性を持ち、 β , γ サブユニットはキナーゼ活性を調節する調節サブユニットとして機能する (図 3A, Carling *et al.*, 2011)。AMPK β サブユニットは中央部にグリコーゲン結合領域を、カルボキシ末端に α , γ サブユニット結合サイトを持ち、AMPK α , β , γ は β サブユニットを足場にして AMPK ヘテロ三量体 (AMPK 複合体) を形成し細胞内に存在している (図 3A, B, Woods *et al.*, 1996)。AMPK γ サブユニットはアミノ末端に β サブユニットとの結合サイトを持ち、その他の領域は cystathionine β -synthase (CBS) モチーフが 4 つタンデムに連なった構造をしている (図 3A)。それぞれの CBS モチーフはアミノ末端側から 1 から 4 の番号付けがされており、CBS1, 3 には AMP/ADP/ATP が結合し、CBS4 は AMP が結合する。AMPK α サブユニットはアミノ末端から中央部にかけてキナーゼドメインを持っており、中央部には auto-inhibitory sequence (AIS)、カルボキシ末端側には AMPK β サブユニットとの結合サイトが存在する (図 3A)。キナーゼドメイン内には LKB1 や CAMKK β などの AMPKK によってリン酸化されるアクティベーションループと呼ばれる構造が存在する (Carling *et al.*, 2008)。

普段、AMPK 複合体はアクティベーションループのリン酸化がフォスファターゼによって低

く保たれているが、飢餓等の環境変化により細胞内の ATP 濃度が減少し、AMP 濃度が高まると、AMPK γ サブユニットに AMP が結合し、AMPK α の構造変化が引き起こされることで AMPK α と γ が近接する。その結果、アクティベーションループの脱リン酸化が阻害され、リン酸化状態が保たれるようになる (Stein *et al.*, 2000)。アクティベーションループのリン酸化と、AMP によるアロステリック効果によって AMPK 活性は不活性時と比較して 10 倍以上増大する (Cheung *et al.*, 2000)。一方、AMPK γ に ATP が結合すると、AMPK γ に対して AMP が結合できず、AMPK α と γ は近接できないため、AMPK は不活化する (Stein *et al.*, 2000)。AMPK γ に ADP が結合した場合はアクティベーションループのリン酸化は引き起こされるものの、アロステリック効果が引き起こされず、AMPK は活性化しない (Xiao *et al.*, 2011)。このように AMPK は細胞内 ATP/ADP/AMP 濃度を γ サブユニットが認識することで活性が変化する。

これまでの知見では AMPK は糖代謝、脂質代謝、オートファジー、サーカディアンリズム、細胞老化など代謝調節と密接に関連する機構を調節しているキナーゼであることが報告されている (Hardie *et al.*, 1989; Young *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2003; Lamia *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2011)。一方で近年、AMPK α のノックアウトショウジョウバエやその細胞で細胞極性が異常になることや、染色体整列異常、ラギング染色体が観察され、その中でも細胞極性は AMPK がミオシン調節軽鎖をリン酸化することで制御していることが明らかにされた (Lee *et al.*, 2007)。また、株化細胞において AMPK 活性を亢進させた場合、多核や微小核が引き起こされることや、活性化型 AMPK α が紡錘体極及び細胞質分裂部に局在することが示され、分裂期においても AMPK が何らかの機能を有している可能性が示唆されている (Vazquez-martin *et al.*, 2009)。しかしながら、AMPK による分裂期の調節機構は未だ不明な点が多く、特に AMPK γ の分裂期への関与は未知である。

従って、本研究は Pik1 基質候補分子として同定した AMPK γ の分裂期における機能を明らか

にすることを目的とした。AMPK γ を HeLa 細胞株において発現抑制すると、染色体の一部が赤道面に整列できない染色体整列異常の表現型が観察された。詳細な細胞観察の結果、AMPK γ がシンテリック結合修正に関わる新たな分子であることを見出した（第一部）。

一方、染色体の均等分配は、染色体を赤道面へ整列させる機構だけでなく、紡錘体極である中心体の制御によっても調節されている。AMPK γ 発現抑制分裂期細胞を詳細に観察してみると、染色体整列異常と共に紡錘体極の異常が観察された。

中心体は動物細胞特有の細胞内小器官で、細胞あたり 1 個ないしは 2 個存在する。直径約 300 nm の極小構造体で、3 連微小管 9 組からなる円筒状の中心小体が 2 本直行するように配置しており、中心小体の周りを電子密度の濃いタンパク質性のマトリックス構造からなる中心体辺縁物質（pericentriolar material : PCM）が取り囲んでいる。細胞内における中心体の役割は多岐にわたっており、細胞周期全般では PCM に存在する γ -tubulin ring complex (γ TuRC) が微小管重合核となることで微小管形成中心（microtubule organizing center : MTOC）として機能する。静止細胞では中心小体が繊毛の基底となり繊毛形成に関与し、また、分裂期細胞では紡錘体極として紡錘体形成や分裂極性の決定に関与する。中心体は DNA 複製とリンクするように一細胞周期につき一度のみ複製される。中心体の複製は分裂期後期に直行する中心小体間の結合が解離することから始まり（Tsou and Stearns, 2006）、S 期から G2 期にかけて既に存在する 2 本の中心小体の根元から直行するように新たな中心小体が形成される（Brenner, 1971）。G2 期から分裂期前期にはそれぞれの中心小体ペアにコイルドコイル領域に富む pericentrin と CG-NAP、 γ TuRC などの PCM タンパク質が中心体に局在する分裂期キナーゼ Aurora A や Plk1 の活性に依存して集積し、PCM が肥大化することで中心体が成熟、紡錘体を形成するために必要な微小管重合活性を備えることで紡錘体極として機能する（Hannak *et al.*, 2001; Haren *et al.*, 2009）。分裂期への進行と共に、成熟した中心体は自身から延びる微小管とモータータンパク質が生み出す力に依存して細

胞内を移動する。分裂期前期、中心体から伸びる微小管のうち、中心体間方向に伸びる微小管は、もう片方の中心体から伸びる微小管と中心体間で交差する。交差したそれぞれの微小管上をモータータンパク質 Kinesin-5/Eg5 及び Kinesin-12/Kif15 が+端方向に移動することで、微小管をスライディングさせ、2つの中心体間を押し広げる (Kapitein *et al.*, 2005; Tanenbaum *et al.*, 2009)。一方、細胞膜や核膜方向に伸びる微小管では、細胞膜や核膜に結合している dynein が近傍の微小管上を-端方向に進み微小管を手繰り寄せることで中心体を引き寄せ 2つの中心体間を広げる (Gönczy *et al.*, 1999)。また近年、キネトコア-微小管結合によって生じる微小管の張力が中心体を押し、中心体間を広げている報告もある (Toso *et al.*, 2009)。これらの力によって2個の中心体は2極に分離し二極性の紡錘体を形成する。

多くのがん組織では細胞あたり3個以上の中心体 (中心体数異常) が観察されている (Lingle *et al.*, 1998; Gustafson *et al.*, 2000; Kuo *et al.*, 2000)。中心体数異常はS期で細胞周期が停止することで引き起こされる中心小体の過剰複製、Plk4の活性異常による中心小体の *de novo* 合成、細胞質分裂異常や細胞融合による中心小体の再複製などが原因となり引き起こされることが知られている (Shekhar *et al.*, 2002; Habedanck *et al.*, 2005; Kuriyama *et al.*, 2007)。中心体数の異常な増加は、分裂期において多極紡錘体を形成し (図 4A 中段右)、分裂期進行遅延による細胞死や染色体不均等分配を引き起こす (Basto *et al.*, 2008)。即ち、中心体数を2個に保ち、分裂期において二極性の紡錘体を形成することは、染色体を均等に分配するために必要な条件の一つである。

当研究室では二極性の紡錘体形成が中心体の数だけでなく、他の機構によっても制御されていることを見出した。Plk1基質として当研究室が同定した中心体局在分子 Kizuna (Kiz) を発現抑制すると、分裂期細胞は中心体の増加を伴わずに多極紡錘体を形成する (Oshimori *et al.*, 2006)。分裂期の中心体からは赤道面方向に伸び紡錘体を形成する紡錘体微小管や、間期と同様に放射線状に伸びる星状微小管が伸長している。細胞膜に向かって伸びる星状微小管は細胞膜に結合

し、細胞膜と微小管の接点に局在する dynein 複合体や微小管自身の伸長によって、細胞膜から中心体を引くもしくは押す力を生み出す。分裂期の間、紡錘体極は様々な方向の細胞膜から力を受けることにより、細胞膜と紡錘体極の距離を一定保ち、紡錘体のサイズと位置を制御している (O'Connell and Wang, 2000)。キネトコアに結合する紡錘体微小管は染色体運動や二極紡錘体結合の確立に伴う微小管の張力によって、中心体を引くもしくは押す力を生み出す (図 4B 上段, Inoué and Salmon, 1995)。特に染色体整列における染色体運動によって中心体にかかる力はキネトコア-微小管結合から発せられる力だけでなく、Kinesin-10/Kid の活性によって染色体腕部を中心体から遠ざける力によっても発生し (Levesque and Compton, 2001)、染色体整列過程において中心体は常に微小管を介した力がかかっていることが予想される。Kiz の詳細な機能解析の結果、Kiz は分裂期中心体構造の絆となり、染色体運動によって生じる紡錘体極にかかる力に対抗して PCM 構造を安定化させる機能を担っていることが明らかとなった (図 4B, Oshimori *et al.*, 2006)。即ち、紡錘体極の二極性は、中心体の”数”の調節だけでなく、中心体にかかる力に対抗し構造を安定化する中心体の”質”による調整によっても制御されている。

本研究では、AMPK γ 発現抑制細胞における紡錘体極異常の原因を明らかにしようと試みた。その結果、不整列な染色体を多く持つ紡錘体極が、Kiz が局在しているにも関わらず崩壊することを明らかにし、キネトコア-微小管結合修正が中心体の質の制御に依存しない紡錘体極制御機構として存在する新たな知見を得た (第二部)。

一方で、AMPK γ 発現抑制により染色体整列異常を引き起こした細胞の割合は全体の 30%と低かった。即ち、染色体整列を遂行するために必要な調節機構の本質はキネトコア-微小管結合修正機構以前に存在する可能性が考えられる。前述したが、キネトコア-微小管結合の修正は主に側面結合染色体が赤道面へ移動した後に引き起こされる (図 1B-D)。末端結合はキネトコア上の KNL1、Mis12 複合体、Hec1/ndc80 複合体からなる KMN ネットワークが担っていることが知ら

れているが (図 1C, Tanaka and Hirota, 2009)、側面結合を担う分子は明らかにされておらず、側面結合染色体の運搬機構についての多くは不明である。そこで、核膜崩壊後に引き起こされる側面結合染色体の赤道面への運搬機構に着目し、染色体運搬能を有する CENP-E とクロモキネシンである Kid の関与を検証した。

CENP-E は側面結合染色体の運搬を担う分子である。これまでの研究で、CENP-E は高いプロセスシビリティをもつ移動速度の遅いモーター分子で、キネトコアに局在し、既に形成されているキネトコア微小管上において染色体を運搬する機能を担っている (Kim *et al.*, 2010; Kapoor *et al.*, 2006)。しかし、側面結合染色体の赤道面への移動が引き起こされる前中期初期は、末端結合が形成される以前であるため、キネトコア微小管が少なく、不安定な微小管で紡錘体が構成されていると予測できる。即ち、前中期初期の側面結合染色体の運搬に CENP-E が積極的に関与しているかという点については疑問が残る。

Kid は CENP-E とは対照的に、プロセスシビリティが低く移動速度が速いモーター分子で、染色体腕部に局在し、染色体腕部を紡錘体極から赤道面に向かって押す力 (polar ejection force) を生み出す (Yajima *et al.*, 2003; Ke and Hunt, 2009)。アフリカツメガエルの卵細胞でのみ発現抑制による染色体整列異常の表現型が観察されている (Antonio *et al.*, 2000; Perez *et al.*, 2002)。しかし、動物細胞における体細胞分裂では発現抑制による染色体整列異常が生じない (Tokai-Nisizumi *et al.*, 2005)。このことから、Kid の染色体整列における本質的な役割は不明な点が多い。

本研究では、末端結合に必須の分子である Hec1 を発現抑制し、人為的に側面結合を増加させた分裂期細胞における染色体動態を詳細に解析した。その結果、Kid が側面結合染色体の赤道面への移動を担っており、CENP-E は微小管の安定性に依存して染色体整列に寄与することを明らかにした (第三部)。

第二章 材料と方法

プラスミド及び抗体

ヒト AMPK γ cDNA は、HeLa 細胞株より調整した cDNA ライブラリーより PCR を用いて増幅し、pEGFP C2 ベクターに導入した。siRNA に対して抵抗性を持たせるため、378-387 間の塩基 5'-TAAACCGCTT-3' を 5'-GAAACCACTG-3' になるように変異を導入した (AMPK γ r)。AMPK γ アミノ酸断片 (1-46, 47-103, 104-154, 155-197, 198-274, 275-332, 1-23, 24-46) 及びアミノ酸変異導入 AMPK γ (T3A, T21A, 5A, 6A) は EGFP-AMPK γ r を鋳型に PCR によって増幅し、pGEX 6P-3 ベクター及び pEGFP C2 ベクターに導入した。尚、PCR 増幅後はシーケンス解析によって配列を確認している。野生型 Plk1 (Wt) 及び 82 番目のリジンをアルギニンに変異させたキナーゼ不活性型 Plk1 (KR) や、野生型 Kiz (Wt) 及び 379 番目のスレオニンをアラニンもしくはグルタミン酸に変位させた非リン酸化型 Kiz (TA)、リン酸化模倣型 Kiz (TE) プラスミドは当研究室が保有しているプラスミドを用いた。抗体は以下の抗体を使用した。抗マウス及び抗ラビットモノクローナル抗体 : anti-CENP-E (mAb177, Santa Cruz Biotechnologies)、anti-p150^{Glued} (12/P150GLUED, BD Transduction Laboratories)、anti-Aurora B (AIM-1, BD Transduction Laboratories)、anti-BubR1 (8G1, MBL)、anti- α -tubulin (DM1A, Sigma)、anti- γ -tubulin (GTU88, Sigma)、anti-Nup98 (C39A3, Cell Signaling Technology)、anti-Cyclin B (V152, MBL)、anti-AMPK α (23A3, Cell Signaling)、anti-AMPK β (57C12, Cell Signaling)、anti-phosphorylated AMPK α (40H9, Cell Signaling)、anti-AMPK γ (Y307, Abcam)。抗ラビットポリクローナル抗体 : anti-phosphorylated Aurora B (Aurora B pT232, Rockland)、anti-MCAK (MBL)、anti-phosphorylated CENP-A (Kunitoku *et al.*, 2003) 、anti-centrin (Sigma)、anti-pericentrin (Covance)、anti-CG-NAP、anti-Kizuna (Oshimori *et al.*, 2006)。ヒト抗血清 : anti-centromeric antigen (ACA)。尚、anti-phosphorylated CENP-A は広田亨博士 (癌研究所) より (Kunitoku *et al.*, 2003)、ACA は高崎芳成教授 (順天堂大学) より分与していただいた。以下の

抗体は第三章第三部でのみ用いた。抗マウスモノクローナル抗体：anti-Hec1 (9G3, Abcam)、anti- α -tubulin (B-5-1-2, Sigma)、anti-myc (9E10)、anti-CENP-E (1H12, Abcam)。抗ラビットポリクローナル抗体：anti-Kid (Cytoskeleton Inc.)、anti-CENP-E (Sigma)、anti-KIF2C (anti-MCAK, Abnova)、anti-KIFC1 (anti-HSET, Sigma)、anti- α -tubulin (Abcam)、anti-GFP (anti-EGFP, Life Technologies)。抗ゴートポリクローナル抗体：anti-Actin (I-19, Santa Cruz)。

siRNA 配列

本研究で使用した二本鎖 RNA は、以下の cDNA 配列に基づき受託化学合成 (JbioS) した一本鎖センス RNA とアンチセンス RNA をアニーリングし作製した。

Control siRNA : 5'-TTCTCCGAACGTGTCACGTTT-3'

AMPK α siRNA : 5'-GGTTGGCAAACATGAATTGTT-3'

AMPK β siRNA : 5'-GCACCAGAGAAGGAGGAATTT-3'

AMPK γ siRNA : 5'-GCGTGTATACTTCCTTCATTT-3'

Kizuna siRNA : 5'-GCGATTTGAGCGTGCCAATT-3'

Kid siRNA : 5'-AAGATTGGAGCTACTCGTCGTTT-3'

HSET siRNA : 5'-TCAGAAGCAGCCCTGTCAATT-3'

CENP-E siRNA (3' UTR) : 5'-CCACTAGAGTTGAAAGATATT-3'

以下の cDNA 配列は、Invitrogen 社の Stealth RNAi にて受託化学合成した。

Hec1 siRNA : 5'-TTAATTTCTGGTCAAGAATGGCTGA-3'

MCAK siRNA : 5'-AATTGGGTTGGCAAATGTCTGCC-3'

第三章第三部における Control siRNA は Invitrogen 社の Stealth RNAi siRNA negative control med GC duplex #2 を用いた。

細胞の培養と細胞周期の同調

本研究で用いた HeLa 細胞株は 10% のウシ胎児血清 (FBS) を含む DMEM (ニッスイ) を用いて培養した。各種恒常発現 HeLa 細胞株及び EGFP- α -tubulin と EGFP-CENP-A 恒常発現 HeLa 細胞株は 10% のウシ胎児血清 (FBS) を含む高グルコース DMEM (SIGMA) を用いて培養した。第三章第三部に用いた全ての細胞株は、10% のウシ胎児血清 (FBS) を含む DMEM (Life Technologies) にて培養した。尚、恒常発現 HeLa 細胞株は広田亨博士 (癌研究所) より分与していただいた。全ての細胞株は 5% CO₂ 存在下、37°C の条件で培養した。M 期への細胞同調は、2 mM thymidine を含む培地で 24 h 培養し S 期に同調した (single thymidine block) 後、DMEM にて 3 回洗浄し S 期よりリリースした。M 期細胞の割合が増加する 12 h 後 (第三章第三部においては 10 時間後) に各々の実験に用いた。siRNA による発現抑制実験の場合は、thymidine 添加 12 h 前に二本鎖 RNA (終濃度 200 nm) を siRNA MAX (Invitrogen) を用いて導入した。また、レスキュー実験の場合は、siRNA 添加 12 h 前に各々のプラスミド 1 μ g を FuGENE6 (Roche) によって導入した (第三章第三部では FuGENE HD を用いた)。

間接免疫蛍光染色

カバーガラス上に培養し処理を施した細胞を -20°C Methanol で -20°C 5 min 固定した。図 11A は 37°C 4% paraformaldehyde (PFA) で 37°C 10 min 固定し、1% Triton X-100 含有 PBS で 5 min 処理した。図 9A は固定前に 37°C Ca²⁺-containing buffer (100 mM PIPES at pH 6.8, 1 mM magnesium chloride, 0.1 mM calcium chloride and 0.1% Triton X-100) で 37°C 1 min 処理し、不安定な微小管を崩壊させた (Lampson *et al.*, 2004)。その後、予め 37°C に温めた 1% glutaraldehyde 含有 PHEM (60 mM piperazine-N,N'-bis[2-ethanesulfonic acid], 25 mM HEPES, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂, pH 6.9) で 37°C 10 min 固定し、0.1 mg/ml NaBH₄ で 10 min 抗原の賦活化を行った (Savoian *et al.*, 1999)。

尚、図 18B は Ca^{2+} -containing buffer 処理を行わずに、glutaraldehyde 固定を行った。これら処理の後、0.02% Triton X-100 含有 PBS (PBS-T) で希釈した一次抗体を室温 1 h 反応させた。PBS-T で 3 回洗浄後、PBS-T に希釈した二次抗体、Alexa 488、Alexa 555、Alexa 568 (Invitrogen)、Cy3 (West Grove, PA) 結合 IgG 抗体を室温 1 h 反応させた。DNA は Hoechst33342 もしくは DAPI を用いて二次抗体と同時に DNA を染色した。PBS-T で 3 回洗浄後、包埋剤 (1% 3,4,5-trihydroxybenzoic acid n-propyl ester, 80% glycerol、第三章第三部では ProLong Gold (Life Technologies) を用いてスライドガラスに包埋した。観察は DeltaVision SoftWorx (Applied Precision, LLC) によって制御された Olympus IX-70 inverted microscope (Olympus) で行い、レンズは 100x 1.35 NA Plan Apochromat oil objective lens (Olympus) を用いた (第三章第三部では IX-71、100x 1.40 NA Plan Apochromat oil objective lens を用いた)。画像の取得は Z 軸方向に 0.2 μm 間隔で撮影した。全ての撮影画像は SoftWorx の deconvolution ツールによってノイズを除去し、SoftWorx の quick projection ツール若しくは ImageJ version 1.43 (National Institute of Mental Health) によって maximum intensity projection を行なった。図 6D の BubR1 の蛍光輝度は ImageJ を用いて ACA シグナルに対して閾値を設定した後、ACA シグナル領域内の BubR1 蛍光輝度を測定した。図 6E、12A のキネトコア間距離は ACA によって染色し、撮影した 3D 画像に対して SoftWorx の measure distance ツールを用いて計測した。紡錘体極の体積は pericentrin 抗体で染色し、撮影した 3D 画像に対して image J plug-in の Sync Measure 3D によって計測した。第三章第三部におけるキネトコア-赤道面距離の赤道目は、 α -tubulin シグナルの収束点を紡錘体極として赤道面を算出した。キネトコアの位置は CENP-A シグナルを二値化した後 image J 内で watershed 処理し Analyze particles コマンドによって測定した。尚、図 23 における EB1 ドットの測定も同様の手順で行った。

生細胞観察

全ての観察は DeltaVision SoftWorx によって制御された Olympus IX-70 inverted microscope で行い、レンズは 60x 1.35 NA Plan Apochromat oil objective lens (Olympus) を用いた (第三章第三部では IX-71、100x 1.40 NA Plan Apochromat oil objective lens もしくは 20x 0.75 NA UPlan SApochromat oil objective lens を用いた)。取得した画像は SoftWorx の deconvolution ツールによってノイズを除去した。図 6A は EGFP-histoneH2B HeLa 細胞株をガラスボトムディッシュ (IWAKI) に培養し、5% CO₂ 存在下 37°C の環境の下で観察した。Control siRNA 処理細胞は 3 min、AMPK γ siRNA 処理細胞は 5 min 間隔で撮影し、各時間 Z 軸方向に 1.0 μ m 間隔で 25 枚画像を取得した。ImageJ を用いて maximum intensity projection を行なった後、ImageJ plug-in の StackReg (Thévenaz *et al.*, 1998) で各時間の画像の傾きを一定にした。染色体動態は ImageJ plug-in の SpotTracker (Sage *et al.*, 2005) を用いて EGFP-histoneH2B シグナルを追跡し、各時間画像における座標を算出した。図 10 は EGFP-CENP-A, EGFP- α -tubulin HeLa 細胞株をガラスボトムディッシュ (IWAKI) に培養し、観察 1 h 前に 10% FBS 含有 F12 培地 (GIBCO) に培地交換した。観察直前、2% agar を用いて固化した F12 培地を細胞上に置き、細胞厚が約 10 μ m になるまで培地を除去した。観察は 5% CO₂ 存在下 37°C の環境の下で行った。12 sec 間隔で撮影し、各時間 Z 軸方向に 2 μ m の Optical axis integration mode で画像を取得した。ImageJ plug-in の StackReg で各時間の画像の傾きを一定にした後、SpotTracker を用いて EGFP-CENP-A と EGFP- α -tubulin の収束点のシグナルを追跡し、各時間画像における座標を算出した。図 17D, E、図 18A 及び図 19B は、histoneH2B-mCherry HeLa 細胞株を 2 well チャンバー (Thermo) に培養し、37°C の環境の下で観察した。図 17D, E は 2 min 間隔で、図 18A は 10 min 間隔で撮影し、各時間 Z 軸方向に 3.0 μ m 間隔で 5 枚画像を取得した。図 19B は 5 sec 間隔で撮影し、各時間 Z 軸方向に 15 μ m の Optical axis integration mode で画像を取得した。キネトコアの追跡は ImageJ plug-in の StackReg (Thévenaz *et al.*, 1998) で各時間の画

像の傾きを一定にし、同 plug-in の Manual Tracking (<http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/track/track.html>, F.P. Cordelières) で追跡した。

大腸菌発現系による GST 融合タンパク質の精製

各々のプラスミドを形質転換した大腸菌 BL21 を 50 µg/ml ampicillin 含有 2x YT 培地 (2x YT-amp) にて 37°C, 16 h 以上振盪培養し、前培養液とした。前培養液を 2x YT-amp 培地にて 100 倍希釈し、37°C, 1 h 培養後、0.5 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) 存在下で 30°C, 3 h 培養することでタンパク質を発現誘導した。培養後の大腸菌を TNE バッファー (40 mM Tris-HCl pH 7.5, 200 mM NaCl, 5 mM EDTA) で懸濁し、超音波破碎後、1% Triton X-100 を添加した。4°C, 30 min 混和した後、上清に対して TNE バッファーに溶媒を置換した Glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare) を添加し、4°C, 3 h 混和した。その後、Glutathione Sepharose を TNE バッファーで 5 回洗浄し、PreScission Protease (GE Healthcare) 及び 10 mM glutathione を用いて溶出した。得られた精製タンパク質は PBS を溶媒に透析を行い、50% glycerol を添加した。

In vitro キナーゼアッセイ

大腸菌発現系によって精製した各 GST-Plk1 (約 0.2 µg) と各基質 (約 0.5 µg) をキナーゼバッファー (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.1 mM EDTA, 5 mM DTT, 50 µM ATP, 10 µCi [γ -³²P]ATP) 中で混和し、30°C, 15 min 反応させた。SDS サンプルバッファーを添加し、反応を停止させた後、100°C, 5 min 加熱した。SDS-PAGE 後、ゲルを乾燥させオートラジオグラフィーによりリン酸化タンパク質を検出した。

第三章 結果

第一部 AMPK γ はシンテリック結合修正に寄与する

AMPK γ の発現抑制は染色体整列異常を引き起こす。

AMPK γ の分裂期への関与を検討するため、AMPK γ 発現抑制 HeLa 細胞を分裂期に同調培養し、分裂期の表現型を観察すると共に、ウェスタンブロッティングによって siRNA の発現抑制効果を検証した。ウェスタンブロッティングの結果から、分裂期への同調処理を細胞に施した場合、本研究で用いた siRNA は十分な発現抑制効果が得られることが分かった (図 5A)。

AMPK γ 発現抑制 HeLa 細胞の顕微鏡観察の結果、分裂期において一部の染色体が極周辺に位置したままである染色体整列異常の表現型が見られた (図 5B)。染色体整列異常を引き起こした細胞の割合を測定したところ、分裂期細胞のうちコントロール細胞が平均 2.4% に対して AMPK γ 発現抑制細胞では平均 33.1% の細胞が染色体整列異常を引き起こすことが分かった (図 5C)。また、分裂期後期及び終期の細胞割合が減少しており、分裂期中期以前で分裂期が停止していることが示唆された (表 1)。加えて、AMPK γ 発現抑制細胞において染色体整列異常を示した細胞の割合は、siRNA 抵抗性 AMPK γ の過剰発現によって減少した (図 5A, C, 表 1)。

以上の結果から、AMPK γ は分裂期において染色体の赤道面への整列に関与し、正常な分裂期進行に必要な新たな分子であることが示唆された。

AMPK γ は AMPK 活性非依存的に染色体整列に寄与する。

AMPK γ は AMPK α , β サブユニットと複合体を形成し、AMPK 活性を調節している。そこで、AMPK γ 以外のサブユニットの染色体整列への関与を検討するため、AMPK γ 発現抑制によって引き起こされた染色体整列異常が AMPK の他サブユニットを発現抑制した場合でも引き起こされるかどうかを検討した。

AMPK α 、AMPK β を発現抑制した分裂期 HeLa 細胞を観察したところ、AMPK γ 発現抑制細胞のような染色体整列異常や、分裂期遅延などの表現型は見られなかった (図 5C, 表 1)。尚、AMPK サブユニットそれぞれの siRNA による発現抑制効果はウェスタンブロッティングによって確認しており、それぞれのサブユニットを発現抑制しても他のサブユニットのタンパク質量に変動はなかった (図 5D)。一方、AMPK サブユニット二種を同時に発現抑制すると、 γ サブユニットとのダブルノックダウン細胞でのみ染色体整列異常が引き起こされた (表 1)。この結果から、AMPK α , β は染色体整列や分裂期進行には関与していないことが考えられた。

間期及び分裂期に同調した HeLa 細胞より細胞可溶化液を調整し、AMPK サブユニットのタンパク質量をウェスタンブロッティングで定量したところ、分裂期における α サブユニット及び β サブユニットのタンパク質量は間期と比べ有意に減少していることが分かった (図 5E, F)。また、微小管重合阻害剤であるノコダゾールを用いて細胞周期を分裂期前期で停止させ、その後ノコダゾールを除き細胞周期を進ませることで、分裂期進行における AMPK サブユニットのタンパク質量変化を検討した。その結果、 γ サブユニットのタンパク質量は分裂期を通して一定であるのに対して、 α 、 β サブユニットのタンパク質量は分裂期の間は低く保たれているが、分裂期後期に分解される Cyclin B タンパク質量の減少と共に増加した (図 5G)。AMPK β は AMPK 複合体形成における足場サブユニットとなることから、分裂期で AMPK β のタンパク質量が低く保たれているという結果は、間期と比べ分裂期では AMPK 複合体が形成されにくく、AMPK 複合体として機能している AMPK γ の割合は間期に比べ減少していることが考えられた。

AMPK γ は AMPK α の活性化を促す働きを担っており、分裂期において、活性化型 AMPK α は中心体に局在することが報告されている (Vazquez-martin *et al.*, 2009)。そこで、AMPK γ 発現抑制によって AMPK α の中心体における活性化に異常が見られるかどうかを AMPK 活性化の指標となる AMPK α スレオニン 172 番目のリン酸化抗体を用いて確認した。その結果、AMPK γ 発現

抑制 HeLa 細胞における活性化型 AMPK α の局在は、コントロール HeLa 細胞の局在と変わらず中心体に局在していた (図 5H)。即ち、AMPK γ 発現抑制によって染色体整列異常が引き起こされた場合においても AMPK 活性とその局在に変化はなく、染色体整列は AMPK 活性及び AMPK 活性化に伴って調節されている何らかの機構とは非依存的に引き起こされることが考えられた。

以上の結果から、分裂期における AMPK γ サブユニットは AMPK 複合体としてではなく、AMPK 複合体とは独立して機能し、AMPK 活性調節とは異なる機能を有して染色体整列を制御していることが示唆された。

AMPK γ 発現抑制細胞においても二極紡錘体結合は確立できる。

次に、AMPK γ が染色体整列過程のどの過程に関与しているのかを明らかにしようと試みた。染色体整列はキネトコア-微小管結合の修正や紡錘体の動態制御など時空間的な分裂装置の制御が重要である。染色体整列に関与する既知の分子の多くは、主にセントロメア、キネトコア、紡錘体、紡錘体極、染色体に局在しており、局在している分裂装置の制御を介して染色体整列過程を調節している。AMPK γ も染色体整列に関与していることが示唆されたため、既知の調節分子と同様に分裂装置に局在していることが考える。そこで、局在から染色体整列における機能を推測できるのではないかと考えた。

AMPK γ 抗体を用いた免疫染色及び EGFP タグ付 AMPK γ を過剰発現し、AMPK γ の分裂期における局在を観察したが、染色体領域や分裂装置の特定の部位への AMPK γ の集積は見られず、細胞質全体に局在していた (図 5I)。即ち、AMPK γ の局在から染色体整列における AMPK γ の機能を推定することは困難であった。

次に、AMPK γ 発現抑制細胞の分裂期進行とそれに伴う染色体の動態を観察することで、分裂期における AMPK γ の機能を明らかにできるのではないかと考えた。EGFP-HistoneH2B を恒常的

に発現する HeLa 細胞株において AMPK γ を発現抑制し生細胞観察を行ったところ、コントロール細胞では核膜崩壊から平均 32 分で分裂期後期に進行した一方で、AMPK γ 発現抑制細胞では、分裂期前中期/中期に一部の染色体が赤道面へ整列しきれない細胞が観察され、このような細胞のうち 48%の細胞は分裂期後期へ進行したものの、核膜崩壊から分裂期後期への進行までに平均 223 分の時間を要した (図 6A, B)。残りの細胞は、観察時間中に分裂期後期へ進行せず、細胞死を引き起こす細胞も見られた。

興味深いことに、AMPK γ 発現抑制細胞の大半の染色体は速やかに赤道面に整列しているように見えた。そこで、AMPK γ 発現抑制分裂期細胞において赤道面に整列しているように見えた染色体は二極紡錘体結合を確立し、赤道面にて整列できているのかを検討した。二極紡錘体結合確立の指標にキネトコアタンパク質 BubR1 を染色し、その局在を観察した。BubR1 は赤道面において姉妹キネトコアが二極紡錘体結合を確立した際、両極から伸びる微小管にキネトコアが引かれることで生じるキネトコアへの張力に応答して、キネトコアから遊離する (Logarinho *et al.*, 2004; Uchida *et al.*, 2009)。実際、分裂前中期のコントロール細胞では全ての姉妹キネトコアに BubR1 シグナルが見られるが、分裂中期に赤道面に整列したキネトコアでは二極紡錘体結合が確立されるため、BubR1 のシグナルが減弱している (図 6C 上中段, D)。

AMPK γ 発現抑制細胞における BubR1 のシグナルを観察してみると、赤道面に位置しているキネトコアではコントロールの分裂期中期細胞と同様に BubR1 シグナルが減弱していた (図 6C 下段, D)。また、キネトコア間の張力の指標となる姉妹キネトコア間距離を測定すると、AMPK γ 発現抑制細胞における赤道面の姉妹キネトコア間距離はコントロール細胞で分裂中期に赤道面に整列した姉妹キネトコア間距離と同程度離れていた (図 6E)。これらの結果から、AMPK γ を発現抑制した場合においても、赤道面に位置した染色体は二極紡錘体結合を確立できていることが明らかとなった。

加えて、AMPK γ 発現抑制細胞の不整列なキネトコアには BubR1 シグナルが見られた (図 6C 下段, D)。キネトコアに局在する BubR1 は、Cdc20 と複合体を形成している。Cdc20 は APC/C の活性化を担っており、BubR1 がキネトコアから遊離することで、APC/C と Cdc20 が複合体を形成する。その結果、APC/C が活性化し、SAC が解除され分裂期は後期へと進行する (Sudakin *et al.*, 2001; Kulukian *et al.*, 2009)。BubR1 が AMPK γ 発現抑制細胞の不整列な染色体に局在していたことから、AMPK γ 発現抑制による分裂期後期への進行遅延は、SAC が解除されないことによって引き起こされていることが示唆された。

AMPK γ 発現抑制によって、染色体の赤道面への移動が抑制される。

AMPK γ 発現抑制細胞の大半の染色体が赤道面で整列する中、それではどのような染色体が極周辺で不整列な染色体となるのだろうか。次に、AMPK γ 発現抑制細胞における染色体の動態を解析した。

図 7A のように観察各時間における座標を計測し、各々の時間において赤道面から染色体までの距離を算出した。AMPK γ 発現抑制細胞は、分裂期前中期において不整列な染色体と整列した染色体をそれぞれ選び、分裂期中期から核膜崩壊に向けて遡って染色体動態を追跡した (図 7B)。コントロール細胞は分裂期前中期における染色体をランダムに選択し、分裂期中期に染色体が整列するまでの染色体動態を追跡した (図 7C)。その結果、コントロール細胞では、全ての染色体が速やかに、またほぼ同時期に赤道面へ移動した (図 7C)。一方で、AMPK γ 抑制細胞では、分裂前中期に将来的な赤道面近辺に位置した染色体は速やかに赤道面へ整列していたが、不整列な染色体の多くは将来的な赤道面から離れた箇所に位置していた。即ち、核膜崩壊時に染色体領域の端に位置していた一部の染色体が赤道面へ移動できず、極周辺で停滞することが分かった (図 7B)。以上の結果から、AMPK γ は一部の染色体の極から赤道面への移動に関与してい

る可能性が考えられた。

AMPK γ 発現抑制細胞における不整列な染色体は極周辺の染色体が赤道面へ移動しないことに起因することが示唆されたため、次に、発現抑制によって AMPK γ 発現抑制細胞と同様に、一部の染色体が極周辺に取り残される表現型を示すことが報告されているキネトコア分子、MCAK, p150^{Glued} (dynactin), CENP-E, Aurora B の局在を観察した (Hauf *et al.*, 2003; Kline-smith *et al.*, 2004; Kapoor *et al.*, 2006; Ozaki *et al.*, 2011)。その結果、AMPK γ 発現抑制細胞における不整列な染色体のキネトコアにおいても各々の分子は局在しており (図 8)、これら分子の局在調節に AMPK γ は関与していないことが分かった。

AMPK γ 発現抑制細胞ではキネトコア-微小管結合修正に異常をきたす。

極周辺に位置する染色体ではシンテリック結合とモノテリック結合の二種類のキネトコア-微小管結合様式が引き起こされやすい。極から赤道面へ染色体が運ばれるためには、シンテリック結合を引き起こしている姉妹キネトコアの少なくともどちらか一方のキネトコア-微小管結合を解離し、シンテリック結合を修正する必要がある (Kapoor *et al.*, 2006)。そこで、AMPK γ 発現抑制細胞において極周辺に取り残された不整列な染色体のキネトコア-微小管結合様式を確認した。

Ca²⁺バッファーで細胞を処理し、不安定な微小管を脱重合させることで、キネトコア-微小管結合を確立している安定的な微小管のみを染色し観察した。その結果、AMPK γ 発現抑制細胞における不整列な染色体の姉妹キネトコアのうち 80%以上がシンテリック結合を示していた (図 9A, B)。このことから、AMPK γ 発現抑制細胞ではシンテリック結合の修正過程に異常が生じている可能性が考えられた。

次に、AMPK γ がシンテリック結合修正に関与しているかどうかを、人為的にシンテリック結

合を増加させた後、シンテリック結合修正を経て正常に分裂期を進行させた際に生じる染色体整列異常細胞の割合を測定することで検討した。細胞をモータータンパク質 Kinesin-5/Eg-5 の阻害剤 (Eg5 inhibitor) で処理すると、分裂期前期で中心体が二極へ離れることができず、単極紡錘体を形成する。このとき、キネトコア-微小管結合は高頻度でシンテリック結合を引き起こすことが報告されている (Kapoor *et al.*, 2000; Lončarek *et al.*, 2007)。Eg5 阻害剤から細胞をリリースすると、中心体は二極に分かれ、細胞は二極性紡錘体を形成すると共に、シンテリック結合は修正され、染色体は赤道面へ整列する。実際、Eg-5 阻害剤リリースコントロール細胞では、シンテリック結合が修正され、染色体は赤道面へ整列した (図 9C, D)。一方、AMPK γ 発現抑制細胞では、Eg5 阻害剤からのリリースによって、染色体整列異常細胞の割合が増加し (図 9C)、一細胞における不整列な染色体の本数も増加した (図 9D)。

ショウジョウバエにおいて、染色体の極吐出力に関わるモータ分子 Kid のホモログである Nod を過剰発現すると、キネトコア-微小管結合が安定化することが報告されている (Cane *et al.*, 2013)。また、哺乳動物細胞においても、ダイニンによる極付近の染色体の極方向の移動を抑制すると、Kid のようなクロモキネシンによる染色体の極吐出力に依存してキネトコア微小管が安定化することが近年報告された (Barisic *et al.*, 2014)。これらの報告から、AMPK γ 発現抑制細胞に Kid を共発現抑制すると、AMPK γ 発現抑制細胞の極付近の染色体のシンテリック結合に関わる微小管が不安定化され、AMPK γ 発現抑制細胞の染色体整列異常が回復するのではないかと考えた。実際、AMPK γ と Kid を共発現抑制すると、AMPK γ 発現抑制細胞でみられた染色体整列異常の表現型をレスキューできた。また、染色体の赤道面への移動が抑制される CENP-E 発現抑制細胞でみられた染色体整列異常は Kid 共発現抑制ではレスキューできなかった。Kid の siRNA による発現抑制効果はウェスタンブロッティングによって検証しており、AMPK γ もしくは CENP-E との共発現抑制においても十分な発現抑制効果を有していた (図 9E)。これらの結果は、

AMPK γ の発現抑制により、キネトコア-微小管結合が安定化していることが考えられ、AMPK γ 発現抑制細胞では、シンテリック結合修正に異常が生じていることを強く支持する。

キネトコアを EGFP-CENP-A、微小管を EGFP- α -tubulin で可視化した HeLa 細胞を用いてキネトコア-微小管結合の動的変化の生細胞観察を行った。極周辺のキネトコアは分裂期進行に際して、XY 軸方向のみならず、Z 軸方向にも非常に動きやすいため、細胞の上に寒天を重層する寒天重層法によって細胞を扁平にし、細胞の厚みを抑えることで観察した (Itoh *et al.*, 2010)。その結果、AMPK γ 発現抑制細胞における不整列な染色体の姉妹キネトコアは双方とも微小管と結合した状態で安定しており、シンテリック結合の状態で維持されていた (図 10A)。以上の結果をまとめると、AMPK γ 発現抑制細胞ではシンテリック結合修正が引き起こされず、染色体が赤道面に運ばれないため、極周辺に取り残されることが考えられた。

また、EGFP-CENP-A シグナル (sister-KT1, 2) と EGFP- α -tubulin の収束点 (極, pole) をトラッキングし、各時間における極からキネトコアまでの距離を算出した (図 10B-D)。コントロール細胞では、分裂期前中期から中期にかけて姉妹キネトコアそれぞれの位置関係は極からみて一定のまま、最終的に極から離れる (赤道面へ整列する) 動態を示した (図 10C)。一方で、AMPK γ 発現抑制細胞のシンテリック結合を維持していた姉妹キネトコアは、極に対して姉妹キネトコアそれぞれの位置関係が頻繁に入れ替わっていることが分かった (図 10B)。次に、Aurora B 阻害剤 (ZM447439) を添加し、キネトコア-微小管結合修正を阻害することでシンテリック結合を引き起こしている細胞を同様に観察したところ、AMPK γ 発現抑制細胞の不整列な姉妹キネトコアの動態と同様に、極に対して姉妹キネトコアそれぞれの位置関係が何度も入れ替わっていた (図 10D)。姉妹キネトコアそれぞれの位置関係の動的な変動は、双方のキネトコアが一極から伸びる微小管によって常に引っ張られている状態、即ち、一方が極へ向かって引かれれば、もう一方も極へ向かって引かれるため位置関係が変動することが考えられた。

以上の結果から、AMPK γ 発現抑制細胞では Aurora B 活性を阻害した細胞と同様に、シンテリック結合修正過程に異常をきたしていることが示唆された。

AMPK γ 発現抑制細胞における不整列なセントロメアでは Aurora B が活性化している。

異常なキネトコア-微小管結合は、セントロメア領域に局在する Aurora B の活性によって、キネトコア-微小管結合が不安定化し修正される。そこで、AMPK γ 発現抑制細胞におけるセントロメア領域の Aurora B 活性を確認した。尚、AMPK γ 発現抑制細胞の不整列な染色体における Aurora B 局在は図 8 に示したように、コントロール細胞と同様にセントロメア領域に局在していた。

Aurora B は 232 番目のスレオニン残基を自己リン酸化することで活性化する (Yasui *et al.*, 2004)。Aurora B pT232 抗体を用いて細胞を免疫染色してみると、分裂期前中期から中期にかけて、染色体腕部、セントロメア領域、中心体でのシグナルが見られ、AMPK γ 発現抑制細胞の不整列な染色体においても同様の局在が見られた (図 11A, B)。また、セントロメア領域における Aurora B の基質である CENP-A (Zeitlin *et al.*, 2001) のリン酸化抗体を用いて免疫染色した場合においても、AMPK γ 抑制細胞の不整列な染色体のセントロメアにリン酸化 CENP-A のシグナルが確認できた (図 11C, D)。コントロール細胞におけるリン酸化 Aurora B 及びリン酸化 CENP-A のセントロメアにおけるシグナルは Aurora B 阻害剤の添加によって消失したことから、AMPK γ 発現抑制細胞の不整列な染色体においても Aurora B はセントロメア領域で活性を維持していることが分かった。

以上のことから、AMPK γ 発現抑制細胞では、Aurora B が活性化しているにも関わらず、シンテリック結合の修正が行われないことが示唆された。

AMPK γ 発現抑制によるシンテリック結合は、姉妹キネトコアにかかる不均衡な張力によって生じる。

Aurora B によるキネトコア-微小管結合の不安定化はキネトコア-微小管結合部と Aurora B の距離によって規定されている (Liu *et al*, 2009)。キネトコアと Aurora B の距離が近い場合、キネトコア-微小管結合は不安定化し、キネトコアと Aurora B 距離が離れるとキネトコア-微小管結合は安定化する (Cheeseman *et al.*, 2002)。シンテリック結合の姉妹キネトコアは一方向に引かれるため、姉妹キネトコアの配向は side-by-side となり、Aurora B との距離はリン酸化活性を回避できるほど離れることはない (Lončarek *et al*, 2007)。即ち、シンテリック結合は常に Aurora B 活性下で不安定化していると考えられている。しかしながら、AMPK γ 発現抑制細胞では Aurora B が活性化しているにも関わらずシンテリック結合が修正されていなかった。この原因を検証するため、AMPK γ 発現抑制細胞における不整列な染色体の姉妹キネトコアを詳細に観察した。

まず、姉妹キネトコア間を計測し、キネトコアに結合している微小管にキネトコアが引かれる際に生じる張力の有無を調べた。その結果、AMPK γ 発現抑制細胞の不整列な姉妹キネトコア間距離は、ノコダゾールによって微小管を脱重合させた分裂期細胞や、コントロール細胞の分裂期前中期における姉妹キネトコア間距離より有意に離れていた (図 12A)。Eg-5 阻害剤を処理し単極紡錘体形成を促した細胞では、シンテリック結合が増加することで、多くの染色体の姉妹キネトコアの配向性が side-by-side となる。このとき、姉妹キネトコア間距離はノコダゾール処理分裂期細胞や、分裂期前中期細胞の姉妹キネトコア間距離と比べて同程度か短くなる。Eg-5 阻害剤処理時における姉妹キネトコア間距離を測定したところ、AMPK γ 発現抑制細胞の姉妹キネトコア間距離は、コントロール細胞の姉妹キネトコア間距離より有意に離れていた (図 12A)。以上の結果から、AMPK γ を発現抑制によるシンテリック結合の姉妹キネトコア間にはコントロール細胞のシンテリック結合より過剰に張力が生じていることが示唆された。

更に、AMPK γ 発現抑制細胞の不整列な染色体における BubR1 のキネトコア局在を詳細に観察したところ、分裂期前中期の細胞と比較して、BubR1 の局在が消失している姉妹キネトコアや、片方の姉妹キネトコアにのみ BubR1 が局在している姉妹キネトコアペアが増加した(図 12B, C)。BubR1 のキネトコア局在はキネトコアが微小管に引かれ、キネトコアが伸びる(キネトコアストレッチング) ことにより消失することから(Uchida *et al.*, 2009)、AMPK γ 発現抑制によって引き起こされたシンテリック結合では、姉妹キネトコアのうち片側のキネトコアが微小管によって引かれている状態であることが考えられた。実際、AMPK γ 発現抑制細胞の不整列なキネトコアのキネトコア間距離を BubR1 の局在によって分類(姉妹キネトコア双方に BubR1 が局在: complete, 姉妹キネトコア片方に BubR1 が局在: one-side) してみると、姉妹キネトコアの片側に BubR1 が局在するキネトコア間距離が有意に離れていた(図 12A)。

以上の結果から、AMPK γ 発現抑制によって生じたシンテリック結合の姉妹キネトコアペアでは、片側キネトコアのみが引っ張られるようなアンバランスな張力が発生し、キネトコア間距離が離れていることから、Aurora B によって不安定化されるべきはずのキネトコア-微小管結合部が Aurora B 局在域から離れキネトコア-微小管結合が安定化している可能性が考えられた。

AMPK γ の 21 番目のスレオニン残基は AMPK γ の染色体整列に対する機能に必須である。

AMPK γ 発現抑制細胞では Aurora B が活性化しているにも関わらず、シンテリック結合が修正されないことから、AMPK γ が関与するシンテリック結合修正経路は Aurora B による結合修正経路とは異なる経路もしくは Aurora B による結合修正経路を助長する経路であることが予想される。AMPK γ が Pik1 の基質候補分子として同定された経緯から、AMPK γ が分裂期において Pik1 によるリン酸化の制御下で機能している可能性があり、Pik1 が AMPK γ の上流でシンテリック結合修正を介した染色体整列に関与しているのではないかと考えた。

近年、Plk1 基質として BubR1 や Survivin が同定され、Plk1 によるリン酸化模倣型 BubR1 や非リン酸化型 Survivin の過剰発現細胞では染色体整列異常を引き起こすことが報告されている (Matsumura *et al.*, 2007; Colnaghi and Wheatley, 2010)。このことから、Plk1 が染色体整列にも関与している可能性が示唆されているが、染色体整列のどの過程を制御しているのかは明らかにされていない。そこで、Plk1 がシンテリック結合修正を伴う染色体の極から赤道面の移動過程に関与しているのかどうかを検討するため、数種類の阻害剤を用いた染色体整列アッセイを行った (図 13A)。

まず細胞を Eg-5 阻害剤で処理し、単極紡錘体を形成させる。次に Aurora B 阻害剤存在下で Eg-5 阻害剤から細胞をリリースする。この結果、二極紡錘体結合を引き起こした染色体は赤道面へ整列するが、Eg-5 阻害剤でシンテリック結合を引き起こした染色体は Aurora B の活性が阻害されているため、シンテリック結合を修正できずに極に取り残される。Aurora B 阻害剤から細胞をリリースすると、極染色体のシンテリック結合が修正され、染色体は赤道面に整列する。このとき、Plk1 阻害剤 (BI2536) を添加し、極に染色体が取り残されるかどうかを観察することで、Plk1 活性がシンテリック結合修正を介する染色体整列に寄与するかどうかを検証した。

コントロール細胞を Eg-5 阻害剤、Aurora B 阻害剤と処理し、リリースする際に Plk1 阻害剤を添加 (EgZMBI) すると、Plk1 阻害剤未添加の細胞 (EgZM) と比較して、多くの染色体が極に取り残されたままであった (図 13B)。この結果から、Plk1 活性が染色体の極から赤道面への移動過程に必須であることが示唆された。次に、AMPK γ 発現抑制細胞で同様の処理を行ったところ、AMPK γ 発現抑制 EgZM 細胞においてもコントロール EgZMBI 細胞と同程度の本数の染色体が極に取り残されており、AMPK γ 発現抑制 EgZMBI 細胞でも極に取り残される染色体の本数に変化はなかった (図 13B)。以上の結果から、AMPK γ が Plk1 の下流に位置して染色体整列を制御している可能性が考えられた。

そこで次に、Plk1 による AMPK γ のリン酸化部位の同定を試みた。まず、AMPK γ を約 50 アミノ酸ずつ 6 つに断片化し、GST 融合型 AMPK γ 断片 (1-46, 47-103, 104-154, 155-197, 198-274, 275-332) を用いて Plk1 による *in vitro* kinase assay を行った。その結果、N 末端側 1-46 アミノ酸断片が Plk1 によって最もリン酸化される断片であることが分かった (図 13C)。次に、1-46 アミノ酸断片を更に二等分 (1-23, 24-46) し、GST 融合アミノ酸断片として精製後、*in vitro* kinase assay を行った。その結果、最も N 末端側の 1-23 アミノ酸が Plk1 によってリン酸化された (図 13C)。1-23 アミノ酸内には 6 箇所セリン/スレオニン残基 (6S/T) があるため、これらの残基を全てアラニンに変異させた全長 AMPK γ (6A) を用いて *in vitro* kinase assay を行ったところ、Plk1 によるリン酸化シグナルが減弱した。このことから、この 6S/T に Plk1 による *in vitro* におけるリン酸化サイトが存在することが示唆された (図 13C, D)。更に、6S/T のうち、3 番目と 21 番目のスレオニン残基をアラニンに置換したアミノ酸変異タンパク質 (T3A, T21A) を用いてリン酸化サイトの絞込みを行ったところ、*in vitro* においては、T3 が Plk1 によるリン酸化サイトであることが示唆された (図 13C)。

3 番目のスレオニン残基のアラニン変異体 siRNA 抵抗性 AMPK γ が、AMPK γ 発現抑制による染色体整列異常の表現型をレスキューできるかどうか検討した。その結果、6A 変異体は染色体整列異常の表現型をレスキューできなかったが、*in vitro* でのリン酸化をうけない T3 のアラニン変異体 (T3A) はレスキューできた (図 13E)。一方、T3 以外の S/T をアラニンに変異した変異体 (5A) ではレスキューできなかった (図 13E)。また、6S/T のうち哺乳動物におけるアミノ酸保存性が高かった T21 のアラニン変異体 (T21A) でもレスキューできないことが分かった (図 13E)。以上の結果から、*in vitro* におけるリン酸化サイトは T3 であったが、T3 のリン酸化は AMPK γ による染色体整列制御には必須ではないことが示唆された。その一方で、T21 が AMPK γ による染色体整列制御における機能性アミノ酸であることが示唆された。

本研究によって、AMPK γ は AMPK 複合体での機能とは異なる機能を有し、Aurora B によるシンテリック結合修正とは異なる経路もしくは Aurora B によるシンテリック結合修正を助長する経路を介してシンテリック結合修正に携わる新たな分子であることが明らかとなった(図 13G)。

第二部 キネトコア-微小管結合修正は二極性紡錘体極の維持に必須である

AMPK γ の発現抑制は中心体辺縁物質 (PCM) の収束異常を誘起する。

第一部において AMPK γ の発現抑制は染色体整列異常を引き起こすことを見出したが、この表現型に付随し、PCM タンパク質である γ -tubulin の紡錘体極におけるシグナルが一箇所に収束せず極近傍に散在する表現型を見出していた。そこで、AMPK γ 発現抑制細胞における中心体構成タンパク質を免疫染色し、 γ -tubulin の紡錘体極シグナルが収束しない表現型の詳細を観察した。

まず、PCM を構成する pericentrin と γ -tubulin を共染色したところ、分裂期中期のコントロール細胞では、pericentrin, γ -tubulin シグナル共に紡錘体極である二点に収束し、共局在していた。

一方、AMPK γ 発現抑制細胞の pericentrin も γ -tubulin と共局在していたが、その局在は紡錘体極周辺に拡散していた (図 14A)。また、pericentrin と共に PCM 構造を担っている CG-NAP の極シグナルは AMPK γ 発現抑制によって減弱していた (図 14A)。

PCM の構造安定化に寄与する Kizuna (Kiz) を発現抑制すると、分裂期における pericentrin シグナルの体積が増加することから、pericentrin シグナル体積が PCM 構造不安定化の指標になる。

そこで、AMPK γ 抑制細胞における紡錘体極の pericentrin シグナル体積を測定したところ、コントロール細胞より有意に増加していた (図 14B)。一方で、細胞内の pericentrin foci のシグナル蛍光強度はコントロール細胞、AMPK γ 発現抑制細胞共に一定であった (図 14C)。

次に、中心体数の指標となる中心小体タンパク質 centrin の局在を観察してみると、コントロール細胞、AMPK γ 発現抑制細胞共に局在や数に変化はなく、極あたり 1 つないしは 2 つ局在しており、また、PCM 構造の安定化に関わるタンパク質 Kiz の極局在にも変化はなかった (図 14C, D)。

これらの結果から、AMPK γ 発現抑制細胞で観察された γ -tubulin の点状の局在は中心体数の異常によって引き起こされたものではなく、極に集積した PCM タンパク質がなんらかの要因によっ

て一点に収束できず PCM が膨化していることが示唆された。

PCM の収束異常は染色体整列異常を引き起こさない。

中心体構成タンパク質の局在観察から、AMPK γ 発現抑制細胞では染色体整列異常と共に PCM の収束異常を引き起こすことが明らかとなった。AMPK γ 発現抑制細胞を pericentrin と ACA で免疫染色し、1 細胞におけるそれぞれの極の染色体数の多寡と pericentrin シグナル体積を比較したところ、不整列な染色体が紡錘体極周辺に多く取り残されている側の極 PCM が顕著に膨化していることが分かった (図 15A)。この結果から、AMPK γ 発現抑制細胞における PCM の収束異常と染色体整列異常は相関があることが示唆された。

そこで、AMPK γ 発現抑制細胞で見られた染色体整列異常が PCM の収束異常に起因するものなのか、それとも、PCM の収束異常が染色体整列異常に伴う不整列な染色体に起因するものなのかを明らかにしようと試みた。まず始めに、Kiz を発現抑制し PCM 構造を破壊させた際に AMPK γ 発現抑制細胞の表現型である染色体が極に取り残されるような染色体整列異常が引き起こされるかどうかを検証した。Kiz 発現抑制細胞を観察すると、二極性の紡錘体が形成されるものの、PCM の極への収束異常が引き起こされるタイプ (図 15B, 上段) や、PCM が断片化し散在するタイプ (図 15B, 中段)、また、多極紡錘体を形成するタイプ (図 15B, 下段) の三種類の分裂期細胞像が観察できた。これらの細胞における染色体像を観察してみると、二極性紡錘体を形成しつつ PCM 構造が崩壊している細胞では全ての染色体が赤道面に整列しており、また、多極紡錘体を形成している細胞においても紡錘体極間に染色体が整列していた (図 15B)。即ち、Kiz 発現抑制細胞では、AMPK γ 発現抑制細胞と同じような染色体整列異常の表現型は引き起こされないことが明らかとなった。

以上の結果から、AMPK γ 発現抑制細胞における PCM の収束異常が染色体整列異常を引き起

こす原因ではないことが示唆された。

PCM の収束異常は不整列な染色体に依存して生じる。

PCM の収束異常は染色体整列異常を引き起こさないことが示唆されたため、次に染色体整列異常が PCM の収束異常を引き起こしうるかどうかを検証するため、Aurora B 阻害剤を細胞に添加した際の紡錘体極の形態を観察した。Aurora B の活性を阻害すると、ほぼ全ての染色体でキネトコア-微小管結合修正異常が生じる。このため、AMPK γ 発現抑制細胞と比べより多くの染色体が不整列な染色体となる。PCM の収束異常が不整列な染色体に依存して引き起こされるのならば、Aurora B 阻害剤の添加によって不整列な染色体数が増加した細胞では、より顕著な PCM の収束異常を引き起こすことが期待できる。

Aurora B 阻害剤処理分裂期細胞を pericentrin 抗体で染色し PCM の形態を観察したところ、AMPK γ 発現抑制細胞比較して多極紡錘体を形成した細胞割合が増加した (図 15C, D)。また、一細胞あたりの pericentrin foci の数も増加した (図 15E)。このことから、Aurora B 阻害剤によって PCM の収束異常が亢進し、PCM が断片化することが考えられた。

以上の結果から、キネトコア-微小管修正異常による不整列な染色体の増加は PCM の収束異常を引き起こす原因となり、また、多極紡錘体の形成を促進する要因にもなりうることが示唆された。

AMPK γ 発現抑制細胞における PCM の収束異常は紡錘体極にかかる力によって引き起こされる。

当研究室で行われた Kiz の機能解析から、分裂期中心体には染色体運動によって生じる紡錘体微小管を介した中心体にかかる力から PCM 構造を安定に保つ機構が存在することが明らかとなった (Oshimori *et al.*, 2006)。不整列な染色体を多くもつ紡錘体極には、通常の染色体整列に伴う染色体運動とは異なる方向から大きな力がかかっていると予想される。実際、低濃度のノコダゾールを細胞に添加し、微小管にかかる張力を抑制すると、PCM の収束異常に伴う多極紡錘体形成が抑制できた。そこで、AMPK γ 発現抑制細胞の PCM 収束異常に不整列な染色体が生み出す紡錘体極への力が関与しているかどうかを検討した。もし関与している場合、紡錘体極にかかる力に対抗して PCM 構造を安定化する Kiz を AMPK γ 発現抑制細胞に過剰発現すると、AMPK γ 発現抑制による PCM の収束異常が抑制できることが期待できる。

Kiz は Plk1 にリン酸化されることで、中心体構造安定化に寄与するため、野生型 Kiz (Wt)、非リン酸化型 Kiz (TA)、リン酸化模倣型 Kiz (TE) を AMPK γ 発現抑制細胞に過剰発現した。その結果、Kiz Wt 及び Kiz TE の過剰発現によって AMPK γ 発現抑制細胞における多極紡錘体形成と PCM の収束異常が抑制された (図 16A)。一方、Kiz TA の過剰発現では PCM の収束異常や多極紡錘体形成を抑制できなかった (図 16A)。このことは、Kiz の微小管張力抵抗性が AMPK γ 発現抑制細胞における PCM の崩壊を抑制することを示している。

以上の結果から、AMPK γ 発現抑制細胞では、不整列な染色体によって生じた紡錘体極にかかる力に対して PCM 構造が耐え切れず PCM が膨化してしまい紡錘体極収束異常を引き起こすことが示唆された。

分裂期進行遅延は多極紡錘体形成を促進する。

次に、PCM の収束異常の原因となる極にかかる力がキネトコア-微小管結合や染色体腕部を押すことによって生じる微小管の張力によるものと仮定し、MG132 を用いて分裂期遅延を引き起こした際の PCM を観察した。プロテアソーム阻害剤である MG132 を細胞に処理すると、分裂期後期に引き起こされる姉妹染色分体の対合の解離が阻害され分裂期は中期で停止する。このとき、染色体整列に伴うキネトコア-微小管結合は二極紡錘体結合を確立したまま維持され、姉妹染色分体対合によって姉妹染色分体に内向きにかかる力とキネトコア-微小管結合に伴いキネトコアを引く力が拮抗することで、微小管には常に張力が生じたまま維持される。また、同時に、染色体腕部も微小管によって常に極から赤道面へ向けて押される状態が維持される。即ち、MG132 処理細胞の紡錘体極はキネトコア-微小管結合や染色体腕部-微小管結合によって生じる微小管の張力を常に受け続けることになる。

MG132 処理によって分裂期中期で細胞周期を停止させたところ、二極以外の箇所新たな極 (extra-pole) が形成されることが分かった (図 16B)。この結果から、染色体-微小管結合に伴う微小管の張力は二極性紡錘体極構造を破綻させ、多極紡錘体を誘導する一因となることが示唆された。またこの現象は、PCM 収束異常を促進する AMPK γ の発現抑制によって亢進した (図 16B)。

本研究結果から、キネトコア-微小管結合修正異常によって生じる不整列な染色体の増加は、キネトコア-微小管結合に伴って生じる微小管の張力によって紡錘体極に過度の力もしくは想定外の方向への力を生み出し、更に分裂期中期を遅延させることにより PCM の紡錘体極における収束異常及び多極紡錘体形成を促進することが明らかとなった (図 16C)。

第三部 側面結合染色体の赤道面への集合における Kid 及び CENP-E の役割

Kid は染色体整列に寄与する。

Kid 及び CENP-E の分裂期における機能を検討するため、Kid 及び/もしくは CENP-E 発現抑制 HeLa 細胞を分裂期に同調培養し、分裂期の表現型を観察すると共に、ウェスタンブロッティングによって siRNA の発現抑制効果を検証した。ウェスタンブロッティングの結果から、分裂期への同調処理を細胞に施した場合においても、本研究で用いた siRNA は十分な発現抑制効果が得られることが確認できた (図 17A)。

これまでに、体細胞分裂において Kid を発現抑制しても染色体整列における異常がみられないことが報告されている (Tokai *et al.*, 2005)。実際に、Kid 発現抑制 HeLa 細胞の分裂期を観察したところ、染色体整列の異常はみられなかった (図 17B, C)。一方、CENP-E 発現抑制細胞では、これまでに報告されているように極付近に染色体が取り残される染色体整列異常の表現型がみられた (図 17B, C, Schaar *et al.*, 1997)。興味深いことに、Kid と CENP-E を共発現抑制した細胞では、不整列な染色体の本数が CENP-E 単独発現抑制時と比べて有意に増加した (図 17B, C)。次に、それぞれの発現抑制細胞について生細胞観察を行い、分裂期の時間を測定したところ、Kid 発現抑制細胞では、分裂期前中期の僅かな遅延がみられた (図 17D, E)。CENP-E を発現抑制した細胞では分裂期での細胞周期停止が引き起こされており、Kid を共発現抑制しても変化はなかった (図 17D)。

以上の結果から、Kid は必須ではないものの、染色体を赤道面へ整列させる過程に関与していることが示唆された。

Hec1 を発現抑制することで、側面結合染色体が誘導される。

Kid が染色体整列に関与していることが示唆されたが、その寄与は染色体整列に必須なものではない。このことから、**Kid** は染色体整列過程で一過的に必要とされるのではないかと考えられる。キネトコアの微小管側面への結合は染色体整列過程のごく初期に一過的に引き起こされる。そこで、側面結合染色体に対する **Kid** の寄与について検討した。解析に際して、末端結合が分裂期細胞内に存在していると、側面結合染色体に由来する正確な解析結果が得られないことが予想される。そこでまず初めに、末端結合に必須な **Ndc80** 複合体の一員である **Hec1** を発現抑制することで末端結合を抑制し、側面結合染色体を増加させようと試みた。

Hec1 は末端結合に必須の分子であるが、**Hec1** を完全に発現抑制すると、**SAC** 分子はキネトコアへ局在できず、細胞は **SAC** 活性を維持できない (DeLuca *et al.*, 2003; Martin-Lluesma *et al.*, 2003)。即ち、**Hec1** 発現抑制細胞は分裂期進行後、細胞質分裂を経ずに速やかに次の細胞周期へ移行する。実際、**Hec1** 発現抑制細胞を生細胞観察すると、分裂期進行後、速やかに次の細胞周期へ移行した (図 18A)。この結果から、本研究で用いた **Hec1** siRNA によって、**Hec1** が十分に発現抑制されていることが示唆された。

次に、チミジンブロックにより **S** 期に同調した細胞をリリースし、リリース 10 時間後の **Hec1** 発現抑制分裂期細胞について、姉妹キネトコアとキネトコア近傍に位置する微小管を観察した (図 18B 左上)。得られた染色像より、キネトコア-微小管結合の状態を (i) 姉妹キネトコア双方が微小管側面に接している、(ii) 姉妹キネトコアの片方が微小管側面に接しておりもう一方は解離している、(iii) 姉妹キネトコアの片方もしくは双方が微小管末端と結合している、(iv) 姉妹キネトコア双方とも解離している、の 4 種に分類し、(i, ii) を側面結合染色体と定義した (図 18B 下)。その結果、**Hec1** 発現抑制細胞で観察できた姉妹キネトコアの 80%以上が側面結合染色体であった (図 18B 右上)。

以上のことから、Hec1 を発現抑制することで分裂期細胞内の側面結合染色体を増加させることが可能となった。

Kid は側面結合染色体の赤道面への移動に寄与するが CENP-E は抑制的に働く。

側面結合染色体における Kid と CENP-E の機能を明らかにするため、Hec1 を発現抑制した末端結合非存在下の分裂期細胞において Kid と CENP-E を発現抑制し、染色体の動態及びキネトコアの分布を検証した。

HeLa 細胞に各種 siRNA を処理し、分裂期に同調培養した細胞可溶化液についてウェスタンブロッティングにより siRNA の発現抑制効果を検証した。ウェスタンブロッティングの結果から、本研究で用いた siRNA は共発現抑制に用いた場合においても十分な発現抑制効果を得られることが確認できた (図 19A)。

EGFP-CENP-A, EGFP- α -tubulin, H2B-mCherry を恒常的に発現する HeLa 細胞を用いて、Hec1 及び Kid, CENP-E もしくはその両者を発現抑制し、生細胞観察を行った。Hec1 発現抑制細胞では、末端結合が阻害されているため最終的に染色体は細胞内に散在した (図 19B 二段目 35:00)。一方で、核膜崩壊直後においては、染色体が赤道面へ移動する様子がみられ、その割合は Control 細胞と比べて同程度であった (図 19B, C 二段目, D)。このことは、末端結合非存在下においても染色体は側面結合状態で赤道面へ向かって移動することを示唆している。Hec1/Kid 共発現抑制細胞では、核膜崩壊直後の染色体の赤道面への移動が減少し、明瞭な赤道面への染色体集合はみられなかった (図 19B, C 三段目, D)。Hec1/CENP-E 共発現抑制細胞では、赤道面へ移動する染色体の割合はやや減少したものの、染色体が赤道面へ集合する様子がみられた (図 19B, C 四段目, D)。Hec1/Kid/CENP-E 共発現抑制細胞では、Hec1/Kid 経発現抑制細胞と同程度の染色体移動の異常がみられた (図 19B, C 五段目, D)。

生細胞観察でみられた各抑制細胞の表現型を定量的に解析するため、EGFP-CENP-A を恒常的に発現する固定細胞を用いてキネトコアと微小管を免疫染色し、キネトコア-赤道面距離を測定することで、紡錘体上におけるキネトコアの分布を評価した (図 20A, B)。評価に際して、二極間の中点を通る二極を結んだ線の垂線を将来的な赤道面と定義し、免疫染色像における EGFP-CENP-A のドット (キネトコア) から将来的な赤道面までの垂直距離を、将来的な赤道面から極までの距離を 10 とした値の相対値として計測した (図 20B 左)。その結果、Hec1 発現抑制細胞のキネトコア-赤道面距離は、Control 細胞と比べて有意に長かった (図 20B, Hec1 si : 3.07 vs. Control si : 1.33)。また、Hec1/Kid 共発現抑制細胞のキネトコア-赤道面距離は Hec1 発現抑制と比べて有意に長かった (図 20B, Hec1/Kid si : 3.65)。一方、Hec1/CENP-E 発現抑制細胞のキネトコア-赤道面距離は Hec1 発現抑制と比べて有意に短かった (図 20B, Hec1/CENP-E si : 2.33)。Hec1/Kid/CENP-E 共発現抑制細胞のキネトコア-赤道面距離は Hec1/Kid 発現抑制と同等であった (図 20B, Hec1/Kid/CENP-E si : 3.86)。即ち、Hec1/Kid 共発現抑制細胞では、染色体が赤道面に集合せず、Hec1/CENP-E 発現抑制細胞では染色体の赤道面への集合が更新していることが明らかとなった。この結果は、生細胞観察でみられた染色体動態の結果と一致しており、これらの結果を踏まえると、Kid は側面結合染色体の赤道面への集合に寄与しており、CENP-E は Kid による赤道面への集合を抑制している可能性が示唆された。

これまでの結果では、二極性の紡錘体における染色体の移動及びキネトコアの分布を検証したが、二極性の紡錘体には両極から伸びる微小管が混在しており、特に、赤道面付近では逆並行の配向性を示す微小管が増加すると考えられる。このような紡錘体内部では、Kid 及び CENP-E のような微小管プラス端指向性キネシンの寄与を正確に判定できない。そこで、紡錘体の二極性形成に関与するモーター分子 Kinesin-5/Eg5 を阻害し、単極紡錘体を形成させた。単極紡錘体の微小管は一極から伸長するため、微小管の配向は一方向性を示す。このような状態の細胞に

おける極からキネトコアの距離を測定し、キネトコアの分布を比較した (図 20C)。Hec1/Kid 共発現抑制細胞では Hec1 発現抑制細胞と比べてより極近傍にキネトコアが分布した (図 20D, Hec1 si : 5.94 μm vs. Hec1/Kid si : 4.52 μm)。また、Hec1/CENP-E 発現抑制細胞では、Hec1 発現抑制細胞と比べてより極から遠方にキネトコアが分布し、Kid を共発現抑制することでその距離は縮まった (図 20D, Hec1/CENP-E si : 10.78 μm , Hec1/CENP-E si : 7.68 μm)。これらの結果は、Kid が側面結合染色体の微小管プラス端への移動 (二極紡錘体時の赤道面への移動) に関与し、CENP-E がその移動を抑制しているという二極性の紡錘体での解析結果と一致している。

Kid による側面結合染色体の運搬はモーター活性に依存する。

次に、側面結合染色体の赤道面への移動に Kid 及び CENP-E のモーター活性が必要かどうかを検証するため、siRNA 抵抗性の野生型 Kid もしくは CENP-E、*rigor* 変異体 Kid もしくは CENP-E を各 siRNA 処理細胞に発現し、キネトコアの分布を解析した。尚、*rigor* 変異体はモータードメイン内の ATP ポケットにアミノ酸変異を導入することで、モータータンパク質が有する ATPase 活性を阻害し、モータードメインを微小管より解離できないようにした変異体である (Nakata *et al.*, 1995; Klumpp *et al.*, 2003)。各タンパク質の発現及び siRNA 処理の効果については、ウェスタンブロッティングで確認した (図 21A)。また、各タンパク質を発現させ、siRNA 処理した細胞においても、過剰発現した Kid と CENP-E の局在に異常がないことを免疫染色で確認した (図 21B)。

Hec1/Kid 共発現抑制細胞に野生型 Kid を発現させたところ、キネトコア-赤道面距離が Hec1 発現抑制細胞と同程度に有意に短くなった (図 21C, 4.36 から 3.29, Hec1 si : 3.15)。一方、Kid *rigor* 変異体を発現させたところ、キネトコア-赤道面距離の短縮効果がみられなかった (図 21C, 5.21)。この結果から、側面結合染色体は Kid のモーター活性に依存して赤道面へ集合することが示唆

された。次に、Hec1/CENP-E 共発現抑制細胞に野生型 CENP-E を発現させたところ、Hec1/CENP-E 共発現抑制細胞でみられたキネトコア-赤道面距離の短縮が抑制され（図 21C, 2.77 から 4.21）、*rigor* 変異体ではキネトコア-赤道面距離が更に長くなった（図 21C, 5.66）。この結果は、CENP-E 発現細胞や CENP-E *rigor* 変異体発現細胞でみられた赤道面への染色体の集合抑制は CENP-E の微小管結合能に依存する可能性を示唆している。この仮説を更に検証するため、CENP-E の ATP/ADP ポケットから ADP の解離を抑制し、CENP-E の微小管結合能を亢進させる阻害剤 GSK923295（Wood *et al.*, 2010）を用いて同様の解析を行った。GSK923295 処理細胞では、整列した染色体において CENP-E のキネトコア局在が消失するが、Hec1 発現抑制下においては CENP-E のキネトコアへの局在異常はみられなかった（図 21D）。キネトコア-赤道面距離を測定すると、GSK923295 処理細胞では、Hec1 発現抑制及び Hec1/Kid 共発現抑制細胞双方においてキネトコア-赤道面距離が長かった（図 21E）。この結果は、CENP-E の微小管結合能が側面結合染色体の赤道面への移動を抑制している可能性を支持している。

側面結合染色体の移動における CENP-E の寄与は紡錘体微小管の安定性に依存する。

これまでの実験において、CENP-E が側面結合染色体の赤道面への移動に抑制的に働くことが明らかとなったが、この結果は CENP-E が染色体の赤道面への運搬に必須の分子であるという既知の結果と相反する。この相違が生じる原因として紡錘体微小管の安定性を考えた。分裂期において紡錘体微小管は分裂期進行と共に安定化し、赤道面で末端結合が形成されることでより安定化する（DeLuca *et al.*, 2006; Kabeche *et al.*, 2013）。これまでの実験では、側面結合染色体の移動を解析するため、末端結合を阻害しており、また、Hec1 発現抑制によって分裂期チェックポイントが不活性化される以前の細胞において解析を行っている。このため、分裂期進行直後の分裂期初期の染色体動態を観察していることになる。即ち、観察過程において紡錘体微小

管は常に不安定であることが予想される。そこで、分裂期微小管の脱重合を担うモーター分子 **Kinesin-13/MCAK** を **Hec1** 及び **Kid** もしくは **CENP-E** と共発現抑制し、微小管の安定性を増した細胞における側面結合染色体のキネトコア分布を解析した。

MCAK に対する **siRNA** 処理効果について、各々の分子に対する **siRNA** と共発現抑制し、同調培養を行っても単独発現抑制と同程度の発現抑制効果が得られることをウェスタンブロッティングで確認した (図 22A)。分裂期に同調した各発現抑制細胞を免疫染色し、キネトコア-赤道面距離を測定したところ、**Hec1/MCAK** 共発現抑制細胞は **Hec1** 発現抑制細胞と比べてキネトコア-赤道面距離が短くなった (図 22B, C, **Hec1/MCAK si** : 3.09 から 2.24)。また、紡錘体微小管安定性を、**cold-treatment** (細胞固定前に氷上に培養皿を静置し、細胞内の不安定な微小管を脱重合させる操作) した分裂期細胞における紡錘体中央部における微小管の蛍光輝度で評価した。その結果、**MCAK** を共発現抑制した細胞では、紡錘体中央部における微小管の蛍光輝度が増強しており、微小管が安定化していることが明らかとなった (図 22D, E)。これらの結果から、側面結合染色体は紡錘体微小管を安定化することで、より赤道面へ運搬されることが示唆された。次に、**Hec1/Kid** もしくは **CENP-E** 共発現抑制細胞に **MCAK** を更に発現抑制したところ、**Hec1/Kid** 共発現抑制細胞のキネトコア-赤道面距離が **MCAK** を発現抑制し微小管を安定化させることで有意に短くなった (図 22C, 3.56 から 2.68)。一方で、**Hec1/CENP-E** 共発現抑制細胞では、**MCAK** を発現抑制し微小管を安定化してもキネトコア-赤道面距離に有意な差はなかった (図 22C)。これらの結果を踏まえると、紡錘体微小管を安定化させることにより、**Hec1/Kid** 共発現抑制細胞における **CENP-E** の染色体運搬に対する寄与が高まる可能性が示唆された。

既存の研究結果では、**Hec1** と同じく **Ndc80** 複合体構成因子である **Nuf2** と微小管の束化に必要な微小管マイナス端指向性キネシン **Kinesin-14/HSET** を共発現抑制すると、**Nuf2** 発現抑制による表現型が回復することが報告されている (Cai *et al.*, 2009)。この報告から、**HSET** 発現抑制

細胞では側面結合染色体の運搬能が高いことが予想される。そこで次に、MCAK に代わり HSET を共発現抑制した際のキネトコア-微小管距離を測定した (図 22B, C)。Cold-treatment によって微小管の安定性を検証したところ、Hec1/HSET 共発現抑制においても Hec1/MCAK 共発現抑制細胞と同様に紡錘体中央部の微小管が安定化していることが明らかとなった (図 22D, E)。また、キネトコア-微小管距離においても Hec1/MCAK 発現抑制細胞と同様に、その距離が短くなった (図 22C)。この結果は、CENP-E の側面結合微小管の運搬に対する寄与が微小管の安定性によって高まる可能性を強く支持している。

一方、Hec1/CENP-E/HSET 共発現抑制細胞においては、キネトコア-赤道面距離が Hec1/CENP-E 共発現抑制細胞と比べて長くなった (図 22B, C)。この結果は、Hec1/CENP-E/MCAK 共発現抑制細胞における結果と異なる。この原因の一つに、MCAK 発現抑制細胞と HSET 発現抑制細胞では紡錘体微小管の形態が異なるのではないかと考えた。この仮説を検証するため、微小管プラス端に局在する EB1 と微小管を免疫染色し、Hec1 発現抑制、Hec1/MCAK 共発現抑制、Hec1/HSET 共発現抑制細胞における紡錘体微小管の形態を観察した (図 23A)。得られた免疫染色像の EB1 ドット数を測定すると、MCAK、HSET を共発現抑制することで Hec1 発現抑制細胞の EB1 ドットが増加した (図 23B)。一方、相対的な微小管の蛍光輝度は Hec1 発現抑制細胞に対して、Hec1/MCAK 共発現抑制細胞では増加したが、Hec1/HSET 共発現抑制細胞では変化しなかった (図 22C)。EB1 ドットを微小管の輝度で標準化し、真の EB1 ドット数を算出すると、Hec1/HSET 共発現抑制細胞は Hec1 発現抑制細胞と比べて EB1 ドットが増加していた (図 22D)。一方、EB1 蛍光輝度を微小管の輝度で標準化し、微小管当たりの EB1 量を算出すると、Hec1/HSET 共発現抑制細胞では微小管当たりの EB1 量が減少していた (図 22E)。これらの結果から、Hec1/MCAK 共発現抑制細胞の紡錘体は、Hec1 発現抑制と比べて、長い微小管が多く存在し、Hec1/HSET 共発現抑制細胞の紡錘体は、束化していない微小管が多く存在する可能性が示唆さ

れた (図 23F)。これらの結果を踏まえると、Kid は赤道面付近の微小管密度によって側面結合染色体の赤道面への運搬を調節しており、CENP-E は微小管の長さ及び微小管密度に依存して側面結合染色体の運搬に寄与することが示唆された。

第四章 考察と展望

第一部

本研究では、当研究室で新規 *Pik1* 基質候補分子として同定されていた *AMPK γ* の分裂期における機能について解析した。第一部では、分裂期における機能が未知であった *AMPK γ* を発現抑制し、分裂期表現型を免疫染色及び生細胞観察によって詳細に解析した。その結果、*AMPK γ* がシンテリック結合修正を担う新たな分子であることを明らかにした (図 13F)。

染色体不均等分配を引き起こすキネトコア-微小管結合は、メロテリック結合とシンテリック結合が報告されている。メロテリック結合は二極紡錘体結合の確立に伴いキネトコア間にテンションが生じ、セントロメア領域に局在する *Aurora B* からキネトコアが離れることでキネトコアに対する *Aurora B* 活性が低下し正しいキネトコア-微小管結合は安定化する一方で、間違った結合を引き起こした結合部のみが *Aurora B* 局在域に引かれ、選択的な結合修正がなされるというモデルが報告されている (図 2C, Cimini *et al.*, 2006; Sakuno *et al.*, 2009)。*Aurora B* 活性阻害によってシンテリック結合が引き起こされることから (Hauf *et al.*, 2003)、メロテリック結合修正と同様にシンテリック結合修正においても *Aurora B* 活性による修正機構が考えられているがシンテリック結合を選択的に修正する分子機構や修正過程におけるキネトコアの動態は不明なままである。このことから、シンテリック結合修正分子として新たに *AMPK γ* を見いだせた本研究成実は、シンテリック結合修正に関わる分子機構解明の足がかりとなることが期待できる。

AMPK γ 発現抑制細胞において引き起こされたシンテリック結合の染色体には、*Aurora B* 活性が維持されていた (図 11)。この結果から、*AMPK γ* によるシンテリック結合修正経路は *Aurora B* の下流か異なる経路上に存在する可能性が考えられる。*AMPK γ* が *Pik1* の基質候補分子であり、*in vitro* において *Pik1* によってリン酸化されることから、*Pik1* によるシンテリック結合修正経路への関与を考えたが、*in vitro* における *Pik1* のリン酸化サイトの同定及び *AMPK γ* のアミノ酸変

異体を用いたレスキュー実験の結果から、*in vitro*における Plk1 のリン酸化サイト変異体 (T3A) でも染色体整列異常の表現型はレスキューできたため、 $\text{AMPK}\gamma$ が Plk1 によるリン酸化によって染色体整列を調節している可能性については不明のままである。

一方、リン酸化部位近傍のスレオニン残基の変異体 (T21A) では染色体整列異常の表現型がレスキューできなかつた (図 13E)。このことから、T21 が $\text{AMPK}\gamma$ の染色体整列調節における機能性アミノ酸であることは明らかである。 $\text{AMPK}\gamma$ は AMP/ADP/ATP が結合する CBS ドメインを4つタンデムに持つ構造をしており、CBS ドメインに含まれないN末端領域 (1-46番目のアミノ酸) は、 $\text{AMPK}\beta$ との結合部位として機能する (図 3A)。このことから、T21 に変異を導入することによって $\text{AMPK}\beta$ との親和性が変化する可能性を考えたが、免疫沈降実験を行ったところ野生型 $\text{AMPK}\gamma$ 及び T21A 変異体共に $\text{AMPK}\beta$ との結合能に変化はなかつた。 $\text{AMPK}\gamma$ のN末端領域は生物種によって長さや配列が異なっているが、T21 は哺乳動物において保存されており、 Plk1 のコンセンサス配列 (-E/D-任意のアミノ酸-S/T-疎水性アミノ酸) に近い配列である (図 13D)。T21 と同じような配列 (-E/D- S/T-疎水性アミノ酸) に囲まれている T3 が *in vitro* による Plk1 のリン酸化サイトであること、また、*in vivo* では基質に対する Plk1 のリン酸化活性にまず他のキナーゼによる基質のリン酸化が必要であることから、他のキナーゼによってリン酸化された $\text{AMPK}\gamma$ の T21 が *in vivo* においてリン酸化される可能性も考えられる。

$\text{AMPK}\gamma$ のN末端領域は $\text{AMPK}\beta$ の結合部位としての機能しか報告されておらず、今後、T21 の変異体や、N末端断片を用いて *in vivo* におけるリン酸化の有無や分裂期機能解析を進めることで、 AMP/ADP/ATP 結合以外の新たな $\text{AMPK}\gamma$ の機能ドメインや分裂期における $\text{AMPK}\gamma$ の機能調節機構が明らかにできる可能性がある。

本研究において $\text{AMPK}\alpha$ 及び β のタンパク質量は分裂期において低く保たれており、分裂期 $\text{AMPK}\gamma$ が $\text{AMPK}\alpha$ や β とは異なる新たな分子と結合している可能性が高い。既存の報告では、

AMPK γ の結合分子は AMPK α 及び β サブユニットしか報告がない。そこで、AMPK γ がどのようにしてシンテリック結合修正を行なっているのかという問題については質量分析器を用い、分裂期 AMPK γ の結合タンパク質を網羅的に解析することを試みた。しかし、質量分析で得られた分裂期における結合分子の大部分は AMPK サブユニットであり、染色体運動や、キネトコア-微小管結合調節に関与する可能性が高いモーター分子や、キネトコア構成分子は得られなかった。キネトコア-微小管結合修正は分裂期の間において非常に短時間に、局所的に引き起こされる現象である。AMPK γ の細胞内局在は細胞周期を通じて細胞質全体に広がっていたことから、AMPK γ のキネトコア-微小管結合修正に対する活性を時空間的に制御する機構（例えばリン酸化などの翻訳後修飾）が存在する可能性がある。AMPK γ の染色体整列における機能性アミノ酸（T21）の変異体や、分裂期においてより限定した時期に同調した細胞可溶化液を用いることによって、キネトコア-微小管結合修正が行われる僅かな時間に AMPK γ と結合する分子を同定できるかもしれない。

分裂期進行において、キネトコア構成分子の一部はダイニンによって細胞質の AMP 濃度依存的に紡錘体極へ運ばれている。特に、SAC 因子が二極紡錘体結合に伴ってキネトコア局在を消失する現象はダイニンによってキネトコアから遊離した SAC 因子が極へ運ばれることが必要とされている (Howell *et al.*, 2001)。また、キネシンは ATP 濃度に依存して活性を変動し、紡錘体を形成する微小管の安定性や染色体運動を制御している (Hunter *et al.*, 2003; Mayr *et al.*, 2007)。AMPK γ が AMPK 複合体において細胞内 AMP/ADP/ATP 濃度を感知する機能を有していることから、分裂期においても AMPK γ が何らかの分子と結合して AMP/ADP/ATP 濃度の感知を司り、モーター分子のようなエネルギー濃度に依存して活性が変化する分子やその周りの環境を時空間的に制御している可能性が考えられる。今後分裂期における AMPK γ の結合タンパク質が同定されることで、分裂期における AMPK γ の詳細な機能が解明されると共に、AMPK γ による分裂

期細胞内のエネルギー濃度調節機構のような分裂期進行に伴う細胞内環境調節機構の存在が明らかになるかもしれない。

第二部

第二部では、AMPK γ 発現抑制細胞で染色体整列異常と共に見られた紡錘体極における PCM の収束異常に着目し、PCM 収束異常を引き起こす原因について解析した。その結果、不整列な染色体に依存して PCM の収束異常が生じることを明らかにした (図 15)。AMPK γ 発現抑制細胞のように一部の染色体が不整列な染色体となる場合、PCM 収束異常は引き起こされたが、多極紡錘体は形成されなかった。一方で、Aurora B 阻害剤を用い、より多くの染色体でキネトコア-微小管結合修正異常を誘導すると、PCM の収束異常だけでは留まらず PCM が細胞内に散在し多極紡錘体が形成された (図 15C-E)。また、AMPK γ 発現抑制による PCM の収束異常は、野生型及びリン酸化模倣型 Kiz の過剰発現で抑制できた (図 16A)。これらの結果から、キネトコア-微小管結合異常に伴って増加する不整列な染色体のキネトコア-微小管結合で生じる張力が、紡錘体極に過剰な力もしくは想定外の方向からの力を生み出し、力に耐え切れなくなった PCM が膨化してしまい収束異常となるモデルが考えられる (図 16C)。

分裂期中心体には細胞膜-微小管結合によって生じる力、両極から伸びる微小管同士が逆平行に結合することによって生じる力などの微小管に依存した力を常に受けることで、紡錘体極の位置や紡錘体極の安定性が制御されている。キネトコア-微小管結合は分裂期進行において微小管が関与する重要な事象の一つであり、染色体運動の要であると共に微小管には常に張力が生じる。しかし、キネトコア-微小管結合が生み出す微小管の張力が紡錘体極に与える影響については不明な点が多い。近年、中心体数が増加した癌細胞において増加した中心体が分裂期に二極に収束し擬似二極紡錘体を形成する機構 (中心体クラスタリング) の存在が報告された (図 4A 下段, Quintyne *et al.*, 2005)。正常細胞において中心体数が増加すると、多極紡錘体を形成し、分裂期遅延や極度な染色体染色体不均等分配が引き起こされ最終的に細胞死に至る。中心体クラスタリングは二極紡錘体を模倣するため分裂期遅延を引き起こさず細胞は増殖し続けること

ができる (Ganem *et al.*, 2009)。このことから、中心体クラスタリングは癌細胞において中心数が増加した場合でも正常に細胞増殖を遂行するために必要な機構と考えられている。近年、中心体クラスタリングに関与する分子が網羅的に同定され、その中には中心体構成分子の他に、CPC や Hec1 をはじめとしたキネトコア-微小管結合に関わる分子、コヒーシサブユニットや Shugosin などの姉妹染色分体接着の維持に関わる分子が多く含まれていた。これらの分子を一つでも発現抑制すると、中心体クラスタリングが引き起こされないことから、姉妹染色分体間の接着によって姉妹染色体間に内向きに生じる力とキネトコア-微小管結合によってキネトコアを引っ張る力のバランスが微小管に一定の張力を生み出し、増加した中心体を二極に収束させ、二極性の紡錘体形成を促進するモデルが考えられている (Leber *et al.*, 2010)。即ち、中心体数異常を引き起こした癌細胞においては、キネトコア-微小管結合を適時修正し、微小管の張力を一定に保つことが二極性紡錘体の形成に必要であることが示唆されている。本研究の成果は、中心体数の増加が見られなかった細胞においても、キネトコア-微小管結合を適切に修正することが紡錘体極における PCM 構造の安定化に必要であることを示しており、本研究の成果をもって、二極性の紡錘体構造を維持するために適切なキネトコア-微小管結合修正が重要であるという二極性紡錘体の維持における新たな経路を提唱したい。

AMPK は細胞内のエネルギー濃度に応答して機能し、代謝調節を担う代表的なキナーゼとして広く知られている。このため、AMPK のサブユニットである AMPK γ が分裂期でも機能を有しているということは一見想像し難く、実際これまで分裂期における機能解析は全くなされていなかった。しかし、本研究によって AMPK γ が分裂期で染色体を均等に分配するために必要な分子であることが明らかになった。この成果は、分裂期への関与が想像し難い多くの既知分子においても分裂期進行に重要な機能を有している可能性を示唆しており、このような分子の分裂期への関与を明らかにすることは、新たな分裂期進行制御機構の解明につながるだけでなく、

分裂期をターゲットにした新たな創薬開発や、既存の創薬の分裂期に対する新たな追加効果の
発見につながり、基礎研究のみならず応用研究の面でも重要な位置付けを示す。

第三部

AMPK γ 発現抑制細胞において大部分の染色体が赤道面に整列していたことから、大部分の染色体における染色体整列は動原体-微小管結合修正以前の制御によってなされるのではないかと考え、第三部では染色体整列過程の初期における染色体整列制御機構に着目した。

分裂期において染色体は、まず微小管の側面にキネトコアが結合し赤道面へ運ばれた後に二極紡錘体結合を確立し赤道面に整列することが示唆されているが、微小管側面にキネトコアが結合した側面結合染色体の移動に関する分子基盤は明らかにされていなかった。本研究では、Hec1 を発現抑制しキネトコア-微小管末端結合を阻害することによって側面結合染色体を増加させ、側面結合染色体の動態を詳細に観察することで、Kid が側面結合染色体の赤道面への運搬に寄与していることを見出した。

Kid はアフリカツメガエルの卵及び卵抽出液を用いた実験から、減数分裂期において染色体整列に必要とされており、培養細胞を用いた実験から、染色体を極から遠ざける機構を担っていることが報告されている (Ke and Hunt, 2009; Antonio *et al.*, 2000; Perez *et al.*, 2002)。しかし、体細胞分裂における染色体整列への寄与は Kid を発現抑制しても目立った染色体整列異常の表現型を呈しないことから不明であった。紡錘体を形成する微小管は、分裂期への進行による Cyclin A の分解と、キネトコア-微小管末端結合の形成によって、分裂期進行に伴い徐々に安定化する (DeLuca *et al.*, 2006; Kabeche *et al.*, 2013)。Hec1 発現抑制細胞では、末端結合が抑制されるため、紡錘体微小管は不安定化する (DeLuca *et al.*, 2006)。Hec1 発現抑制細胞の生細胞観察では、紡錘体中央部の微小管シグナルが時間を経るごとに減弱する様子がみられる (図 19B)。Kid 発現抑制による染色体の赤道面への移動に対する異常が、Hec1/Kid 共発現抑制細胞で観察できたことから、Kid は紡錘体微小管が不安定な分裂期初期における染色体の移動にのみ寄与していると考えられる。キネトコアと微小管側面の結合は核膜崩壊後間もなく、一過的に形成される結合で

あることから、生理的条件下における **Kid** の染色体整列に対する寄与も一過的であると考えられ、これまで **Kid** 発現抑制細胞で目立った染色体整列異常の表現型がみられなかったことを説明できる。

加えて、本研究では赤道面への染色体運搬における寄与が既知の分子、**CENP-E** の染色体整列への寄与度が微小管の安定性に依存して変化する新たな知見を得た。**CENP-E** は、既に末端結合が形成された動原体微小管に沿って染色体を運搬する他、自身の C 末端に存在する微小管結合ドメインを利用して動的な微小管プラス端を追従する機能も報告されている (*Gudimchuk et al.*, 2013)。**Hec1** 発現抑制細胞では紡錘体微小管が不安定化し、不安定化した微小管は時間の経過と共に徐々に短くなることが考えられる。そのため、**Hec1** 発現抑制下での **CENP-E** は短縮する微小管プラス端を追従するように染色体を極報告へ運搬し、その結果、**Kid** による染色体の赤道面への移動を抑制している可能性が考えられる。生理的条件下では、前述したように分裂期進行に伴い微小管が安定化するため、**CENP-E** による微小管末端の追従機構を介した染色体の極方向への移動が抑制され、これまで報告されているように **CENP-E** が染色体整列に寄与することが考えられる。即ち本研究結果を以って、染色体を効率よく整列させるために、分裂期初期では **Kid** が染色体を赤道面へ積極的に押し、分裂期進行に伴い **CENP-E** が安定化した微小管を利用して染色体を赤道面へ運搬するという 2 種類のキネシンの時差的な使い分け機構が存在することが予想できる (図 24 右)。

Kid と **CENP-E** の染色体整列における使い分けは、**Kid** と **CENP-E** のモーター活性の特性からも考察することができる。**Kid** のプロセッシビティは低く、ショウジョウバエにおける **Kid** のホモログ **Nod** はノンプロセッシブモーターとして知られている (*Matthies et al.*, 2001; *Yajima et al.*, 2003)。一方、**CENP-E** のプロセッシビティは $1.5 \mu\text{m}$ と高い (*Kim et al.*, 2008)。モータードメインが発揮する微小管プラス端方向への移動速度は **Kid** が每秒約 600 nm に対して、**CENP-E** は毎

秒約 8 nm である (Yajima *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2008)。即ち、Kid は短い距離を CENP-E より速い速度で移動するのに対し、CENP-E はゆっくりと長距離を確実に移動するモーター分子と考えられる。互いの局在が Kid は染色体腕部全体に、CENP-E はキネトコア一箇所であることを考慮すると、Kid は CENP-E に比し圧倒的な分子数を以って染色体腕部を常に微小管プラス方向へ押し進めており、CENP-E は動原体一箇所で染色体を確実に微小管プラス方向へ輸送している姿が想像される。動物細胞の体細胞分裂において、特に分裂期初期の紡錘体が未熟な細胞においては、微小管は紡錘体を形成する赤道面へ向かう微小管のみならず、極から放射状に伸びている。このため、分裂期初期に Kid による染色体を押し力が赤道面方向にのみ働いているとは考えにくい。様々な方向に向かう微小管を利用した Kid による染色体を押し力に対して、CENP-E は動原体を介して染色体をより安定的な紡錘体微小管上に留める働きを担っているのかもしれない (図 24 左)。

CENP-E は紡錘体極に局在する分裂期キナーゼ Aurora A によるリン酸化によって微小管への結合能が制御されている。染色体が極に近付くと、Aurora A により CENP-E がリン酸化され、ATPase 活性が上昇する。その結果、モータードメインの微小管結合能が低下する。この、極付近における CENP-E の微小管結合能の低下は、CENP-E が染色体を運搬する上で微小管濃度の高い紡錘体微小管を選択するために寄与しているのではないかと考えられている (Kim *et al.*, 2010)。紡錘体極から赤道面へ染色体が運ばれると、Aurora A の活性領域から遠ざかるため、CENP-E はリン酸化を受けにくくなる。リン酸化されていない CENP-E は protein phosphatase 1 (PP1) と結合し、PP1 の動原体局在に寄与するとともに、PP1 を介して自身のリン酸化を阻害する負のフィードバックによって微小管結合能を高め、この微小管結合能を獲得することによって二極紡錘体結合に寄与することが示唆されている (Kim *et al.*, 2010)。しかし、極付近において CENP-E の微小管結合能が減弱している染色体が、如何にして CENP-E の微小管結合能が

回復する空間まで移動できるのかという点については不明であるが、この点についても、Kid が染色体を運搬しているということを考慮することで説明できる。

Kid は染色体腕部に局在するため、染色体腕部と接する微小管の密度に応じて染色体を押し力量が変化すると予想される。微小管の密度は極付近が最も高く、赤道面に近づくにつれて減少する。染色体にかかる力のシミュレーション解析によって、クロモキネシンによる染色体を押し力は極に近づくほど強くなることが示されている (Joglekar *et al.*, 2002; Ke *et al.*, 2009)。この点を考慮すると、極付近の染色体は Kid 依存的な力が最大限に掛かり、素早く染色体を赤道面方向へ押し出し、赤道面に近づくにつれて Kid 依存的な力が弱まり、CENP-E が一方向に安定した力をもって染色体を運搬することで赤道面における染色体の位置を決定づけているような、2種類のキネシンの空間的な使い分けが存在するのかもしれない。今後、Kid や CENP-E の非リン酸化型変異体もしくはリン酸化模倣型変異体を用いた解析や、モータードメインを含む各ドメインの相互置換えもしくは他のキネシンのものに置換した変異体を用いた解析を行うことで、染色体をより効率よくより正確に赤道面へ運搬するための時空間的な制御機構が明らかにできることが期待される。

近年、染色体の異数化をもたらす染色体不均等分配が、分裂期微小管の安定化に起因することが示唆されはじめている (Bakhoun *et al.*, 2009, 2014; Thompson *et al.*, 2011)。これは、微小管が安定化することで、動原体-微小管結合修正に異常をきたす結果であると考えられているが、微小管の安定性によって CENP-E の染色体整列への寄与度が変わる本研究の成果は、微小管の安定化によるモーター分子の動作異常がもたらす染色体不均等分配という新しい概念を生み出す可能性を秘めている。加えて、本研究にて染色体の赤道面への移動に寄与することが明らかとなった Kid は染色体腕部にて機能するモーター分子である。染色体の長さは染色体ごとに大きく異なることから、染色体運搬における Kid の寄与度も染色体ごとに異なる可能性がある。

即ち、これまで分裂期染色体は無差別に赤道面まで運搬されると思われているが、実際は染色体ごとに運ばれ易さや運ばれるタイミングが異なるのかもしれない。がん細胞やがん組織において染色体異数性を示す染色体に偏りがあることが知られている (Thompson *et al.*, 2008; Mengelbier *et al.*, 2015)。この偏りは、生存に不利な染色体数異常細胞が淘汰された結果と解釈できる。しかし、染色体整列において個々の染色体間の動態に差異が生じるようなことがあるならば、速やかに赤道面まで移動しキネトコア-微小管結合修正を行える染色体や、赤道面まで移動するまで時間がかかりキネトコア-微小管修正を行う時間が限られている染色体のように、染色体分配において不均等分配されやすい（もしくはされにくい）染色体選択性のような概念を考えることも可能であり、本研究を更に発展させることで、染色体異数性細胞を生み出す本質的な原因を解明するかもしれない。

参考文献

- Andrews, P.D., Y. Ovechkina, N. Morrice, M. Wagenbach, K. Duncan, L. Wordeman, and J.R. Swedlow. 2004. Aurora B Regulates MCAK at the Mitotic Centromere. *Dev. Cell.* **6**: 253-268
- Antonio, C., I. Ferby, H. Wilhelm, M. Jones, E. Karsenti, A.R. Nebreda, and I. Vernos. 2000. Xkid, a chromokinesin required for chromosome alignment on the metaphase plate. *Cell.* **102**: 425-435
- Bakhoun, S.F., S.L. Thompson, A.L. Manning, and D.A. Compton. 2009. Genome stability is ensured by temporal control of kinetochore-microtubule dynamics. *Nat. Cell Biol.* **11**: 27-35
- Bakhoun, S. F., L. Kabeche, J.P. Murnene, B.I. Zaki, and D.A. Compton. 2014. DNA-Damage Response during Mitosis Induces Whole-Chromosome Missegregation. *Cancer Discovery.* **4**; 1281-1289
- Barisic, M., P. Aguiar, S. Geley, and H. Maiato. 2014. Kinetochore motors drive congression of peripheral polar chromosomes by overcoming random arm-ejection forces. *Nat. Cell Biol.* **16**; 1249-1256
- Basto, R., K. Brunk, T. Vinadogrova, N. Peel, A. Franz, A. Khodjakov, and J.W. Raff. 2008. Centrosome amplification can initiate tumorigenesis in flies. *Cell.* **133**: 1032-1042
- Biggins, S., and A.W. Murray. 2001. The budding yeast protein kinase Ipl1/Aurora allows the absence of tension to activate the spindle checkpoint. *Genes Dev.* **15**: 3118-3129.
- Brenner, M. 1971. Centrioles in the rhesus monkey. *Cell.* **50**: 10-34
- Cai, S., C.B. O'Connell, A. Khodjakov, and C.E. Walczak. 2009. Chromosome congression in the absence of kinetochore fibres. *Nat Cell Biol.* **11**: 832-838
- Carling, D., M.J. Sanders, and a Woods. 2008. The regulation of AMP-activated protein kinase by upstream kinases. *Int. J. Obesity.* **32**: 55-59

- Carling, D., F.V. Mayer, M.J. Sanders, and S.J. Gamblin. 2011. AMP-activated protein kinase: nature's energy sensor. *Nat Chem. Biol.* **7**: 512-518
- Cheeseman, I.M., S. Anderson, M. Jwa, E.M. Green, J.S. Kang, J.R. Yates, C.S.M Chan, D.G. Drubin, and G. Barnes. 2002. Phospho-regulation of kinetochore-microtubule attachments by the Aurora kinase Ipl1p. *Cell.* **111**: 163-172
- Cheung, P.C.F., I.P. Salt, S.P. Davies, D.G. Hardie, and D. Carling. 2000. Characterization of AMP-activated protein kinase γ -subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem. J.* **346**: 659-669
- Cimini, D., X. Wan, C.B. Hirel, and E.D. Salmon. 2006. Aurora kinase promotes turnover of kinetochore microtubules to reduce chromosome segregation errors. *Curr. Biol.* **16**: 1711-1718
- Cane, S., A.A. Ye, S.J. Luks-Morgan, and T.J. Maresca. 2013. Elevated polar ejection forces stabilize kinetochore-microtubule attachment. *J. Cell Biol.* **2**: 203-218
- Colnaghi, R., and S.P. Wheatley. 2010. Liaisons between survivin and Plk1 during cell division and cell death. *J. Biochem.* **285**: 22592-22604
- DeLuca, J.G., B.J. Howell, J.C. Canman, J.M. Hickey, G. Fang, and E.D. Salmon. 2003. Nuf2 and Hec1 Are Required for Retention of the Checkpoint Proteins Mad1 and Mad2 to Kinetochores. *Curr. Biol.* **13**: 2103-2109
- DeLuca, J.G., W.E. Gall, C. Ciferri, D. Cimini, A. Musacchio, and E.D. Salmon. 2006. Kinetochore microtubule dynamics and attachment stability are regulated by Hec1. *Cell.* **127**: 969-982
- Dewar, H., K. Tanaka, K. Nasmyth, and T.U. Tanaka. 2004. Tension between two kinetochores suffices for their bi-orientation on the mitotic spindle. *Nature.* **428**: 93-97

- Ganem, N.J., S. A. Godinho, and D. Pellman. 2009. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature*. **460**: 278-282
- Gudimchuk, N., B. Vitre, Y. Kim, A. Kiyatkin, D.W. Cleveland, F.I. Ataullakhanov, and E.L. Grishchuk. 2013. Kinetochore kinesin CENP-E is a processive bi-directional tracker of dynamic microtubule tips. *Nature Cell Biol.* **15**; 1-13
- Gustafson, L.M., L.L. Gleich, K. Fukasawa, J. Chadwell, M.A. Miller, P.J. Stambrook, and J.L. Gluckman. 2000. Centrosome hyperamplification in head and neck squamous cell carcinoma: a potential phenotypic marker of tumor aggressiveness. *The Laryngoscope*. **110**: 1798-1801
- Gönczy, P., S. Pichler, M. Kirkham, and A.A. Hyman. 1999. Cytoplasmic dynein is required for distinct aspects of MTOC positioning, including centrosome separation, in the one cell stage *Caenorhabditis elegans* embryo. *J. Biochem.* **147**: 135-150
- Habedanck, R., Y.D. Stierhof, C.J. Wilkinson, and E.A. Nigg. 2005. The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication. *Nat Cell Biol.* **7**: 1140-1146
- Hannak, E., M. Kirkham, A.A. Hyman, and K. Oegema. 2001. Aurora-A kinase is required for centrosome maturation in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Biol.* **155**: 1109-1116
- Hanisch, A., A. Wehner, E.A. Nigg, and H.H.W. Sillje. 2006. Different Plk1 Functions Show Distinct Dependencies on Polo-Box Domain-mediated Targeting. *Mol. Biol. Cell.* **17**: 448-459
- Hardie, D.G., D. Carling, and A.T.R. Sim. 1989. The AMP-activated protein kinase: a multisubstrate regulator of lipid metabolism. *TIBS* **14**: 20-23
- Hardie, D.G., J.W. Scott, D.A. Pan, and E.R. Hudson. 2003. Management of cellular energy by the AMP-activated protein kinase system. *FEBS Lett.* **546**: 113-120

- Haren, L., T. Stearns, and J. Lüders. 2009. Plk1-dependent recruitment of gamma-tubulin complexes to mitotic centrosomes involves multiple PCM components. *PloS one*. **4**: e5976
- Hauf, S., R.W. Cole, S. LaTerra, C. Zimmer, G. Schnapp, R. Walter, A. Heckel, J. van Meel, C.L. Rieder, and J.M. Peters. 2003. The small molecule Hesperadin reveals a role for Aurora B in correcting kinetochore-microtubule attachment and in maintaining the spindle assembly checkpoint. *J. Cell Biol.* **161**: 281-294
- Hayden, J.H., S.S. Bowser, and C.L. Rieder. 1990. Kinetochores capture astral microtubules during chromosome attachment to the mitotic spindle: direct visualization in live newt lung cells. *J. Cell Biol.* **111**: 1039-1045
- Howell, B.J., J.M. McEwenx, J.C. Canman, D.B. Hoffman, E.M. Farrar, C.L. Rieder, and E.D. Salmon. 2001. Cytoplasmic dynein/dynactin drives kinetochore protein transport to the spindle poles and has a role in mitotic spindle checkpoint inactivation. *J. Cell Biol.* **155**: 1159-1172
- Hunter, A.W., M. Caplow, D.L. Coy, W.O. Hancock, S. Diez, L. Wordeman, and J. Howard. 2003. The kinesin-related protein MCAK is a microtubule depolymerase that forms an ATP-hydrolyzing complex at microtubule ends. *Mol. Cell.* **11**: 445-457
- Inoué, S., and E.D. Salmon. 1995. Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements. *Mol. Biol. Cell.* **6**: 1619-1640
- Itoh, G., S. Kanno, K.S.K Uchida, S. Chiba, S. Sugino, K. Watanabe, K. Mizuno, A. Yasui, T. Hirota, and K. Tanaka. 2010. CAMP (C13orf8, ZNF828) is a novel regulator of kinetochore-microtubule attachment. *EMBO J.* **30**: 130-144
- Joglekar, A.P., and A.J. Hunt. 2002. A simple, mechanistic model for directional instability during mitotic chromosome movements. *Biophysical J.* **83**: 42-58

- Kabeche, L., and D.A. Compton. 2013. Cyclin A regulates kinetochore microtubules to promote faithful chromosome segregation. *Nature*. **502**; 110-113
- Kapitein, L.C., E.J.G. Peterman, and B.H. Kwok. 2005. The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks. *Nature*. **435**: 114-118
- Kapoor, T.M., T.U. Mayer, M.L. Coughlin, and T.J. Mitchison. 2000. Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5. *J. Cell Biol.* **150**: 975-988
- Kapoor, T.M., M.A. Lampson, P. Hergert, P. Cameron, D. Cimini, E.D. Salmon, B.F. McEwen, and A. Khodjakov. 2006. Chromosomes can congress to the metaphase plate before biorientation. *Science* **311**: 388-391
- Ke, K., and A.J. Hunt. 2009. The distribution of polar ejection forces determines the amplitude of chromosome directional instability. *Curr. Biol.* **19**: 807-815
- Kim, J., M. Kundu, B. Viollet, and K.L. Guan. 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol.* **13**: 132-141.
- Kim, Y., A.J. Holland, W. Lan, and D.W. Cleveland. 2010. Aurora Kinases and Protein Phosphatase 1 Mediate Chromosome Congression through Regulation of CENP-E. *Cell*. **142**: 444-455
- Kline-Smith, S.L., A. Khodjakov, P. Hergert, and C.E. Walczak. 2004. Depletion of centromeric MCAK leads to chromosome congression and segregation defects due to improper kinetochore attachments. *Mol. Biol. Cell.* **15**: 1146 -1159
- Klumpp, L.M., K.M. Brendza, J.M. Rosenberg, A. Hoenger, and S.P. Gilbert. 2003. Motor domain mutation traps kinesin as a microtubule rigor complex. *Biochem.* **42**; 2595-2606

- Kulukian, A., J.S. Han and D.W. Cleveland. 2009. Unattached kinetochores catalyze production of an anaphase inhibitor that requires a Mad2 template to prime Cdc20 for BubR1 binding. *Dev. Cell.* **16**: 105-117
- Kunitoku, N, T. Sasayama, T. Marumoto, D. Zhang, S. Honda, O. Kobayashi, K. Hatakeyama, Y. Ushio, H. Saya, and T. Hirota. 2003. CENP-A phosphorylation by Aurora-A in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function. *Dev. Cell.* **5**: 853-864
- Kuo, K.K., N. Sato, K. Mizumoto, N. Maehara, H. Yonemasu, C.G. Ker, P.C. Sheen, and M. Tanaka. 2000. Centrosome abnormalities in human carcinomas of the gallbladder and intrahepatic and extrahepatic bile ducts. *Hepatology.* **31**: 59-64
- Kuriyama, R., Y. Terada, K.S. Lee, and C.L.C. Wang. 2007. Centrosome replication in hydroxyurea-arrested CHO cells expressing GFP-tagged centrin2. *J. Cell Sci.* **120**: 2444-2453
- Lamia, K.A., U.M. Sachdeva, L. DiTacchio, E.C. Williams, J.G. Alvarez, D.F. Egan, D.S. Vasquez, H. Juguilon, S. Panda, R.J. Shaw, C.B. Thompson and R.M. Evans. 2009. AMPK regulates the circadian clock by cryptochrome phosphorylation and degradation. *Science.* 326: 437-440
- Lampson, M.A., K. Renduchitala, A. Khodjakov, and T.M. Kapoor. 2004. Correcting improper chromosome-spindle attachments during cell division. *Nat. Cell Biol.* **6**: 232-237
- Lane, H.A, and E.A. Nigg. 1996. Antibody microinjection reveals an essential role for human polo-like kinase 1 (Plk1) in the functional maturation of mitotic centrosomes. *J. Biol. Cell.* **135**: 1701-1713
- Laurell, E., K. Beck, K. Krupina, G. Theerthagiri, B. Bodenmiller, P. Horvath, R. Aebersold, W. Antonin, and U. Kutay. 2011. Phosphorylation of Nup98 by multiple kinases is crucial for NPC disassembly during mitotic entry. *Cell.* **144**: 539-550

- Leber, B., B. Maier, F. Fuchs, J. Chi, P. Riffel, S. Anderhub, L. Wagner, A.D. Ho, J.L. Salisbury, M. Boutros, and A. Krämer. 2010. Proteins required for centrosome clustering in cancer cells. *Sci. Trans. Med.* **2**: 33-38
- Lee, J.H., H. Koh, M. Kim, Y. Kim, S.Y. Lee, R.E. Karess, S.H. Lee, M. Shong, J.M. Kim, J. Kim, and J. Chung. 2007. Energy-dependent regulation of cell structure by AMP-activated protein kinase. *Nature*. **447**: 1017-1020
- Levesque, A A, and D.A. Compton. 2001. The chromokinesin Kid is necessary for chromosome arm orientation and oscillation, but not congression, on mitotic spindles. *J. Cell Biol.* **154**: 1135-1146
- Lingle, W.L., W.H. Lutz, J.N. Ingle, N.J. Maihle, and J.L. Salisbury. 1998. Centrosome hypertrophy in human breast tumors: implications for genomic stability and cell polarity. *PNAS*. **95**: 2950-2955
- Liu, D., G. Vader, M.J.M Vromans, M.A. Lampson, and S.M.A Lens. 2009. Sensing chromosome bi-orientation by spatial separation of Aurora B kinase from kinetochore substrates. *Science*. **323**: 1350-1353
- Logarinho, E., H. Bousbaa, J.M. Dias, C. Lopes, I. Amorim, A. Antunes-Martins, and C.E. Sunkel. 2004. Different spindle checkpoint proteins monitor microtubule attachment and tension at kinetochores in *Drosophila* cells. *J. Cell Sci.* **117**: 1757-1771
- Lončarek, J., O. Kisurina-Evgenieva, T. Vinogradova, P. Hergert, S. La Terra, T.M. Kapoor, and A. Khodjakov. 2007. The centromere geometry essential for keeping mitosis error free is controlled by spindle forces. *Nature*. **450**: 745-749
- Magidson, V., C.B. O'Connell, J. Lončarek, R. Paul, A. Mogilner, and A. Khodjakov. 2011. The spatial arrangement of chromosomes during prometaphase facilitates spindle assembly. *Cell* **146**: 555-567

- Martin-Lluesma, S., V.M. Stucke, and E.A. Nigg. 2003. Role of Hec1 in spindle checkpoint signaling and kinetochore recruitment of Mad1/Mad2. *Science*. **297**; 2267-2270
- Matsumura, S., F. Toyoshima, and E. Nishida. 2007. Polo-like kinase 1 facilitates chromosome alignment during prometaphase through BubR1. *J. Biochem*. **282**: 15217-15227
- Matthies, H.J.G., R.J. Baskin, and R.S. Hawley. 2001. Orphan kinesin NOD lacks motile properties but does possess a microtubule-stimulated ATPase activity. *Mol. Biol. Cell*. **12**; 4000-4012
- Mayr, M.I., S. Hümmer, J. Bormann, T. Grüner, S. Adio, G. Woehlke, and T.U. Mayer. 2007. The human kinesin Kif18A is a motile microtubule depolymerase essential for chromosome congression. *Curr. Biol*. **17**: 488-498
- Mengelbier, L.H. *et al.* 2015. Intratumoral genome diversity parallels progression and predicts outcome in pediatric cancer. *Nature communications*. **6**; 6125-6135
- Musacchio, A., and E.D. Salmon. 2007. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature reviews. Mol. Cell Biol*. **8**: 379-393
- Nakata, T., and N. Hirokawa. 1995. Point mutation of adenosine triphosphate-binding motif generated rigor kinesin that selectively blocks anterograde lysosome membrane transport. *J. Cell Biol*. **131**; 1039-1053
- Neef, R., U. Gruneberg, R. Kopajtich, X. Li, E.A. Nigg, H. Sillje, and F. a Barr. 2007. Choice of Plk1 docking partners during mitosis and cytokinesis is controlled by the activation state of Cdk1. *Nat Cell Biol*. **9**: 436-444
- Nezi, L., and A. Musacchio. 2009. Sister chromatid tension and the spindle assembly checkpoint. *Curr. Opinion Cell Biol*. **21**: 785-795.

- Nicklas, R.B., and S.C. Ward. 1994. Elements of error correction in mitosis: microtubule capture, release, and tension. *J. Cell Biol.* **126**: 1241-1253
- O'Connell, C.B., and Y.L. Wang. 2000. Mammalian spindle orientation and position respond to changes in cell shape in a dynein-dependent fashion. *Mol. Biol. Cell.* **11**: 1765-1774
- Oshimori, N., M. Ohsugi, and T. Yamamoto. 2006. The Plk1 target Kizuna stabilizes mitotic centrosomes to ensure spindle bipolarity. *Nat. Cell Biol.* **8**: 1095-1101
- Ozaki, Y., H. Matsui, A. Nagamachi, H. Asou, D. Aki, and T. Inaba. 2011. The dynactin complex maintains the integrity of metaphasic centrosomes to ensure transition to anaphase. *J. Biochem.* **286**: 5589-5598
- Perez, L.H., C. Antonio, S. Flament, I. Vernos, and A.R. Nebreda. 2002. Xkid chromokinesin is required for the meiosis I to meiosis II transition in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature Cell Biol.* **4**: 737-742
- Porter, I.M., S.E. McClelland, G.A. Khoudoli, C.J. Hunter, J.S. Andersen, A.D. McAinsh, J.J. Blow, and J.R. Swedlow. 2007. Bod1, a novel kinetochore protein required for chromosome biorientation. *J. Cell Biol.* **179**: 187-197
- Quintyne, N.J., J.E. Reing, D.R. Hoffelder, S.M. Gollin, and W.S. Saunders. 2005. Spindle multipolarity is prevented by centrosomal clustering. *Science.* **307**: 127-129
- Rieder, C.L., and S.P. Alexander. 1990. Kinetochores are transported poleward along a single astral microtubule during chromosome attachment to the spindle in newt lung cells. *J. Cell Biol.* **110**: 81-95
- Ruchaud, S., M. Carmana, and C. Earnshaw. 2007. Chromosomal passengers: conducting cell division. *Nat Rev.* **8**: 798-812

- Sage, D., S.P. Neumannx, F. Hediger, S.M. Gasser, and M. Unser. 2005. Automatic tracking of individual fluorescence particles: application to the study of chromosome dynamics. *IEEE Trans. Image Proces.* **14**: 1372-1383
- Sakuno, T., K. Tada, and Y. Watanabe. 2009. Kinetochore geometry defined by cohesion within the centromere. *Nature.* **458**: 852-858
- Saunders, W.S., M. Shuster, X. Huang, B. Gharaibeh, A.H. Enyenihi, I. Petersen, and S.M. Gollin. 2000. Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. *PNAS* **97**: 303-308
- Savoian, M.S., W.C. Earnshaw, A. Khodjakov, and C.L. Rieder. 1999. Cleavage furrows formed between centrosomes lacking an intervening spindle and chromosomes contain microtubule bundles, INCENP, and CHO1 but not CENP-E. *Mol. Biol. Cell.* **10**: 297-311
- Schaar, B.T., G.K.T. Chan, P. Maddox, E.D. Salmon and T.J. Yen. 1997. CENP-E function at kinetochores is essential for chromosome alignment. *J. Cell Biol.* **139**: 1373-1382
- Shekhar, M.P.V., A. Lyakhovich, D.W. Visscher, H. Heng, and N. Kondrat. 2002. Rad6 overexpression induces multinucleation, centrosome amplification, abnormal mitosis, aneuploidy, and transformation. *Cancer Res.* **62**: 2115-2124
- Stein, S.C., A. Woods, N.A. Jones, M.D. Davison, and D. Carling. 2000. The regulation of AMP-activated protein kinase by phosphorylation. *Biochem. J.* **345**: 437-443
- Sudakin, V., G.K. Chan, and T.J. Yen. 2001. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J. Cell Biol.* **154**: 925-936.
- Tanaka, K., and T. Hirota. 2009. Chromosome segregation machinery and cancer. *Cancer Sci.* **100**: 1158-1165.

- Tanaka, T.U., M.J.R. Stark, and K. Tanaka. 2005. Kinetochores capture and bi-orientation on the mitotic spindle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**: 929-942
- Tanenbaum, M.E., L. Macůrek, A. Janssen, E.F. Geers, M. Alvarez-Fernández, and R.H. Medema. 2009. Kif15 cooperates with eg5 to promote bipolar spindle assembly. *Curr. Biol.* **19**: 1703-1711
- Thévenaz, P., U.E. Ruttimann, and M. Unser. 1998. A pyramid approach to subpixel registration based on intensity. *IEEE Trans. Image Proces.* **7**: 27-41
- Thompson, S.L., and D.A. Compton. 2008. Examining the link between chromosomal instability and aneuploidy in human cells. *J. Cell Biol.* **108**: 665-672
- Thompson, S.L., and D.A. Compton. 2011. Chromosome missegregation in human cells arises through specific types of kinetochore-microtubule attachment errors. *PNAS.* **108**: 17974-17978
- Tokai-Nishizumi, N., M. Ohsugi, E. Suzuki, and T. Yamamoto. 2005. The Chromokinesin Kid Is Required for Maintenance of Proper Metaphase Spindle Size. *Mol. Biol. Cell.* **16**: 5455-5463
- Toso, A., J.R. Winter, A.J. Garrod, A.C. Amaro, P. Meraldi, and A.D. McAinsh. 2009. Kinetochore-generated pushing forces separate centrosomes during bipolar spindle assembly. *J. Cell Biol.* **184**: 365-372
- Tsou, M. F.B., and T. Stearns. 2006. Mechanism limiting centrosome duplication to once per cell cycle. *Nature.* **442**: 947-951
- Uchida, K.S.K., K. Takagaki, K. Kumada, Y. Hirayama, T. Noda, and T. Hirota. 2009. Kinetochore stretching inactivates the spindle assembly checkpoint. *J. Cell Biol.* **184**: 383-390
- Vazquez-martin, A., C. Oliveras-ferreros, and J. A. Menendez. 2009. The active form of the metabolic sensor. *Cell Cycle*: 2385-2398

Walczak, C.E., S. Cai, and A. Khodjakov. 2010. Mechanisms of chromosome behaviour during mitosis.

Nat Rev. Mol. Cell Biol. **11**: 91-102.

Wang, W., Y. Xiaoling., L.I. de Silanes, C. David and G. Myriam. 2003. Increased AMP:ATP ratio and

AMP-activated protein kinase activity during cellular senescence linked to reduced HuR function. *J.*

Biochem. **278**: 27016-27023

Wojtaszewski, J.F.P., S.B. Jørgensen, Y. Hellsten, D.G. Hardie, and E.A. Richter. 2002.

Glycogen-dependent effects of 5-aminoimidazole-4-carboxamide (AICA)-riboside on

AMP-activated protein kinase and glycogen synthase activities in rat skeletal muscle. *Diabetes.* **51**:

284-292

Wood, K.W., R. Sakowicz, L.S.B. Goldstein, and D.W. Cleveland. 1997. CENP-E is a plus end –

directed kinetochore motor required for metaphase chromosome alignment. *Cell.* **91**: 357-366

Wood, K.W. *et al.* 2010. Antitumor activity of an allosteric inhibitor of centromere-associated protein-E.

PNAS. **107**: 5839-5844

Woods, A., P.C.F. Cheung, F.C. Smith, M.D. Davison, J. Scott, R.K. Beri, and D. Carling. 1996.

Characterization of AMP-activated Protein Kinase β and γ Subunits. *J. Biochem.* **271**: 10282-10290

Xiao, B., M.J. Sanders, E. Underwood, R. Heath, F.V. Mayer, D. Carmena, C. Jing, P.A. Walker, J.F.

Eccleston, L.F. Haire, P. Saiu, S.A. Howell, R. Aasland, S.R. Martin, D. Carling, S.J. Gamblin.

2011. Structure of mammalian AMPK and its regulation by ADP. *Nature.* **472**: 230-233

Yajima, J., M. Edamatsu, J. Watai-Nishii, N. Tokai-Nishizumi, T. Yamamoto, and Y.Y. Toyoshima. 2003.

The human chromokinesin Kid is a plus end-directed microtubule-based motor. *EMBO J.* **22**:

1067-1074

- Yasui, Y., T. Urano, A. Kawajiri, K. Nagata, M. Tatsuka, H. Saya, K. Furukawa, T. Takahashi, I. Izawa, M. Inagaki. 2004. Autophosphorylation of a newly identified site of Aurora-B is indispensable for cytokinesis. *J. Biochem.* **279**: 12997-3003
- Young, M.E., G.K. Radda, and B. Leighton. 1996. Activation of glycogen phosphorylase and glycogenolysis in rat skeletal muscle by AICAR - an activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS lett.* **382**: 43-47
- Zeitlin, S.G., R.D. Shelby, and K.F. Sullivan. 2001. CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis. *J. Cell Biol.* **24**: 1147-1157

表1. AMPKサブユニット発現抑制における分裂期各時期の割合

	Prophase	Prometaphase	Metaphase	Anaphase	Telophase	Abnormal prometa/metaphase
Control si	7.4 ±1.2	18.6 ±3.0	42.3 ±3.3	16.4 ±0.1	11.1 ±2.5	4.2 ±2.1
AMPK γ si	9.4 ±3.0	22.6 ±3.3	24.2 ±3.5	2.2 ±1.6	2.3 ±1.2	39.3 ±1.8
AMPK γ si + GFP-AMPK γ r	5.2 ±1.2	19.3 ±2.3	49.4 ±7.9	11.9 ±4.9	4.9 ±2.8	9.2 ±6.5
AMPK α si	9.1 ±1.0	27.3 ±2.4	36.1 ±3.2	13.8 ±0.9	8.6 ±1.3	5.2 ±3.3
AMPK β si	9.1 ±4.7	26.1 ±3.4	40.1 ±8.6	10.4 ±5.9	7.6 ±4.6	6.7 ±1.6
AMPK $\alpha\beta$ si	8.3 ±2.1	26.0 ±1.6	34.5 ±5.2	12.0 ±4.3	9.8 ±2.8	9.3 ±2.3
AMPK $\alpha\gamma$ si	6.2 ±1.0	24.0 ±2.4	37.0 ±5.0	7.6 ±1.2	5.1 ±1.5	20.2 ±1.4
AMPK $\beta\gamma$ si	6.3 ±2.2	23.4 ±2.6	31.7 ±4.9	4.6 ±2.3	4.4 ±1.0	29.6 ±4.3

Data are presented as percentage and mean value ± S. D.

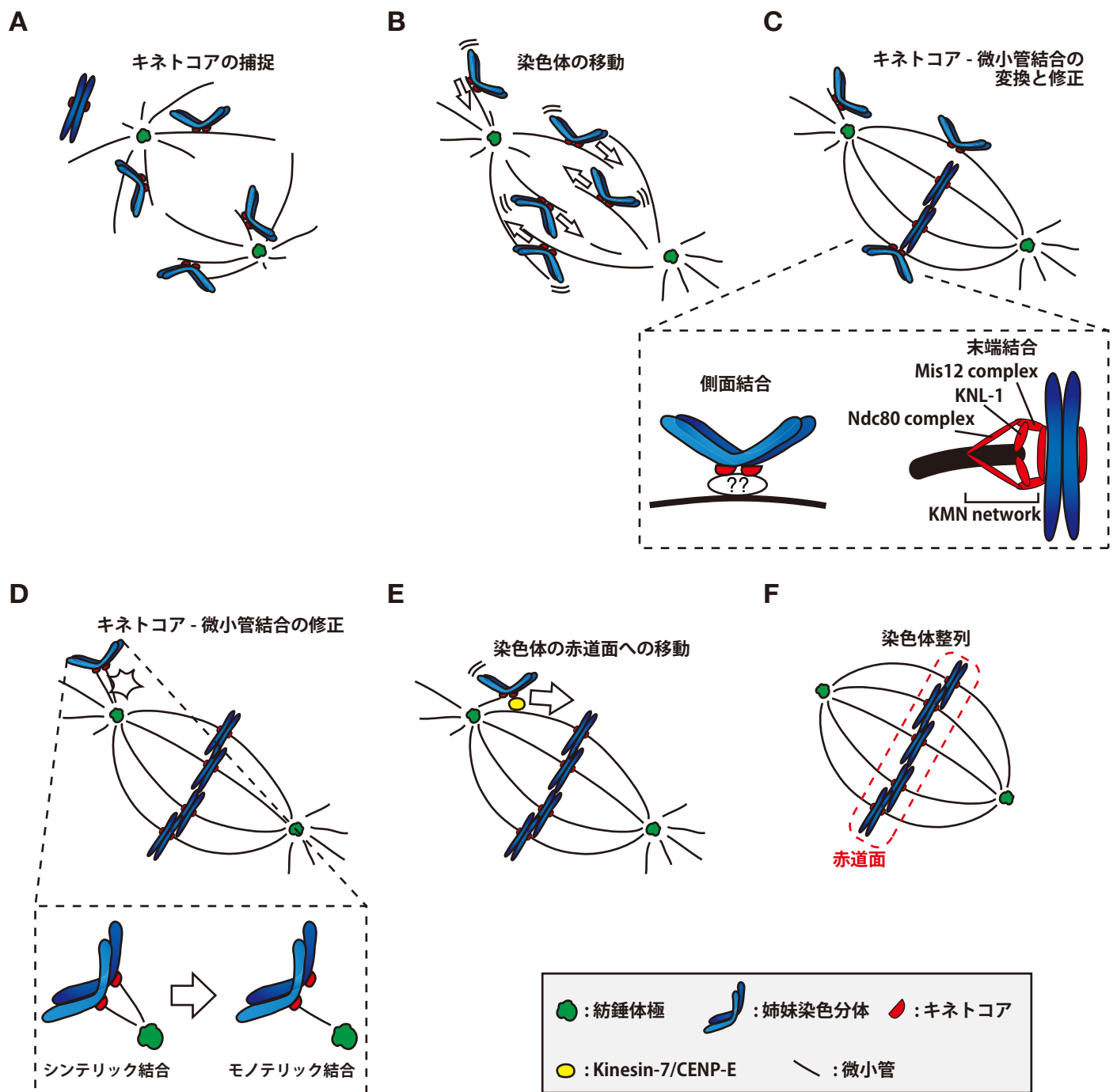


図 1. 分裂期進行における染色体整列機構の模式図

(A) 凝集した染色体のキネトコアは微小管側面に結合する。(B) 二極管に位置する染色体は赤道面へ、どちらかの極に近い位置にある染色体はより近い極に移動する。(C) 赤道面に集合した染色体は側面結合から末端結合に変換される。(D) 極近傍にてシンテリック結合が生じるとモノテリック結合へ修正される。(E) モノテリック結合に修正された染色体は Kinesin-7/CENP-E によって既に形成している紡錘体上を赤道面へ移動する。(F) 赤道面で二極紡錘体結合を確立し、染色体は整列する。

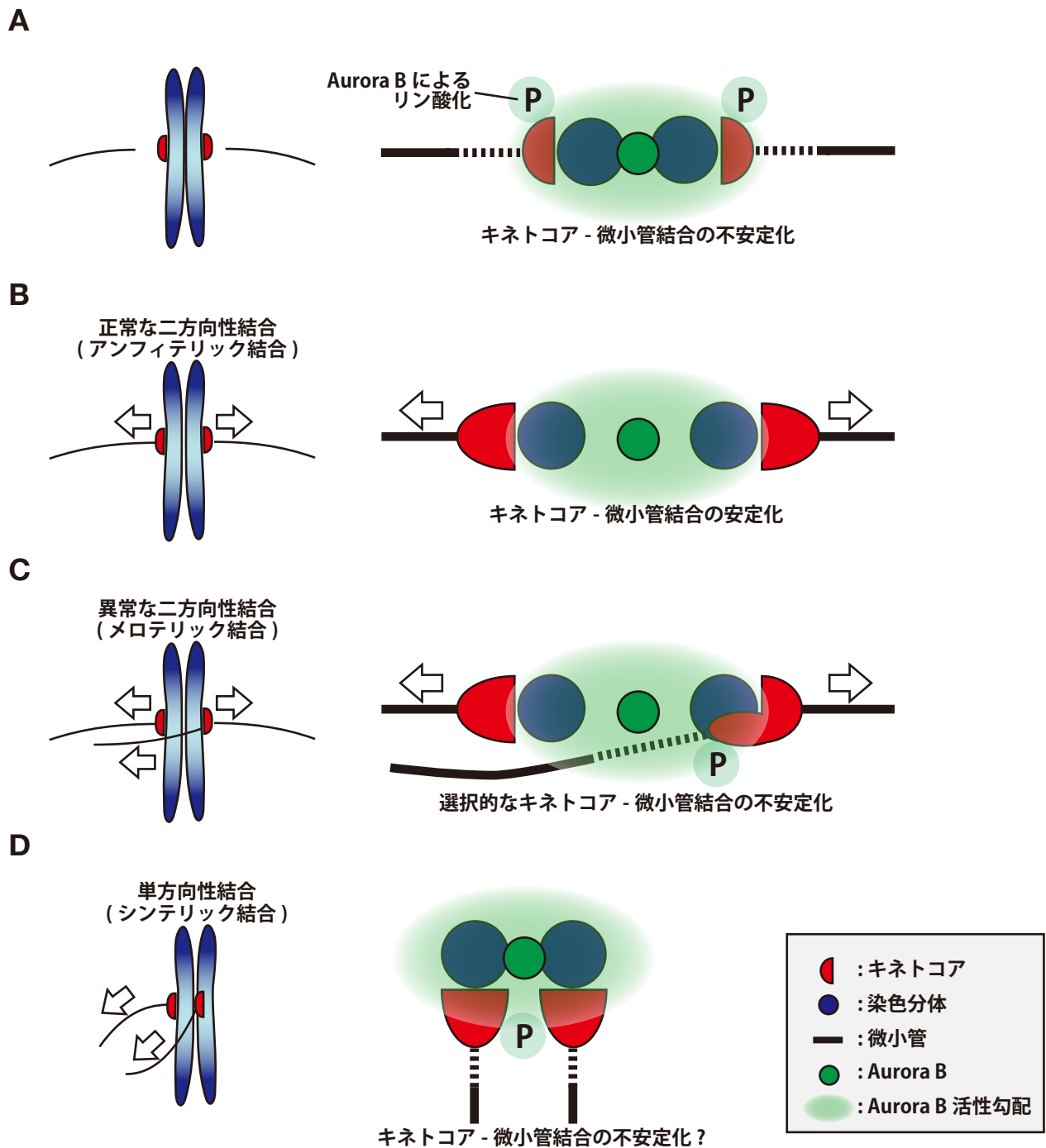
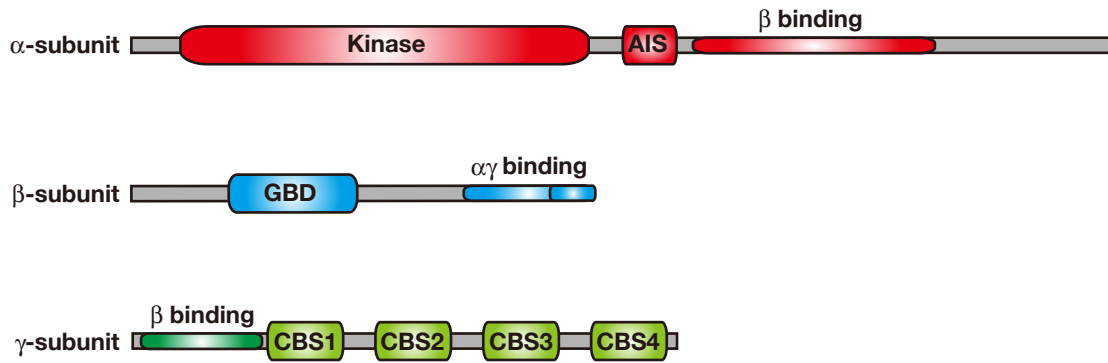


図2. 様々なキネトコア - 微小管結合様式におけるキネトコアと Aurora B の位置関係

(A) キネトコア - 微小管結合が確立していない場合の模式図。(B) 両極から伸びる微小管がそれぞれのキネトコアと結合しているアン菲特リック結合の模式図。(C) 両極から伸びる微小管はそれぞれのキネトコアと結合しているが、片方のキネトコアが両極から伸びる微小管と結合しているメロテリック結合の模式図。(D) 双方の姉妹キネトコアが一極から伸びる微小管と結合しているシンテリック結合の模式図。(A-D 右図) セントロメア領域とキネトコア - 微小管結合部位を拡大した模式図。緑色の濃淡による勾配は濃くなるにつれて Aurora B 活性が高いことを模式的に表している。矢印は微小管の結合によって、キネトコアが矢頭の方に引かれていることを示している。

A



B

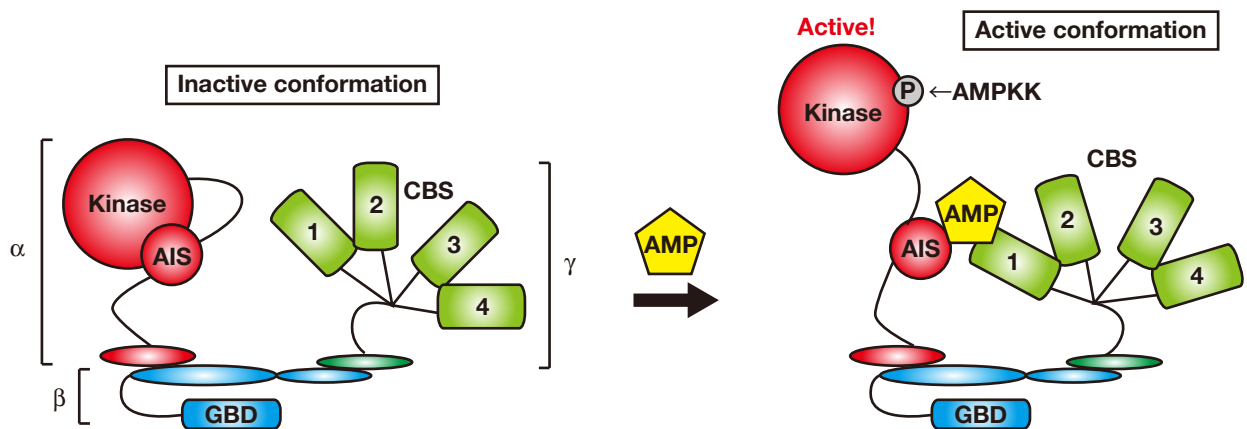


図 3. AMPK サブユニットのドメイン構造と AMP を介した AMPK 複合体の活性化機構

(A) AMPK サブユニットのドメイン構造。α サブユニットは N 末端側から kinase ドメイン、auto-inhibitory sequence (AIS)、β サブユニットとの結合サイトを持つ。β サブユニットは N 末端側から glycogen binding domein (GBD)、αγ サブユニットとの結合サイトを持つ。γ サブユニットは N 末端側から β サブユニットとの結合サイトと 4 つの cystathionine β-synthase (CBS) ドメインを持つ。(B) AMPK 複合体の活性化機構。γ サブユニットが細胞内の AMP と結合することで、α サブユニットが構造変化を引き起こし、AMPKK によるリン酸化を受け、AMPK 複合体は活性化する。

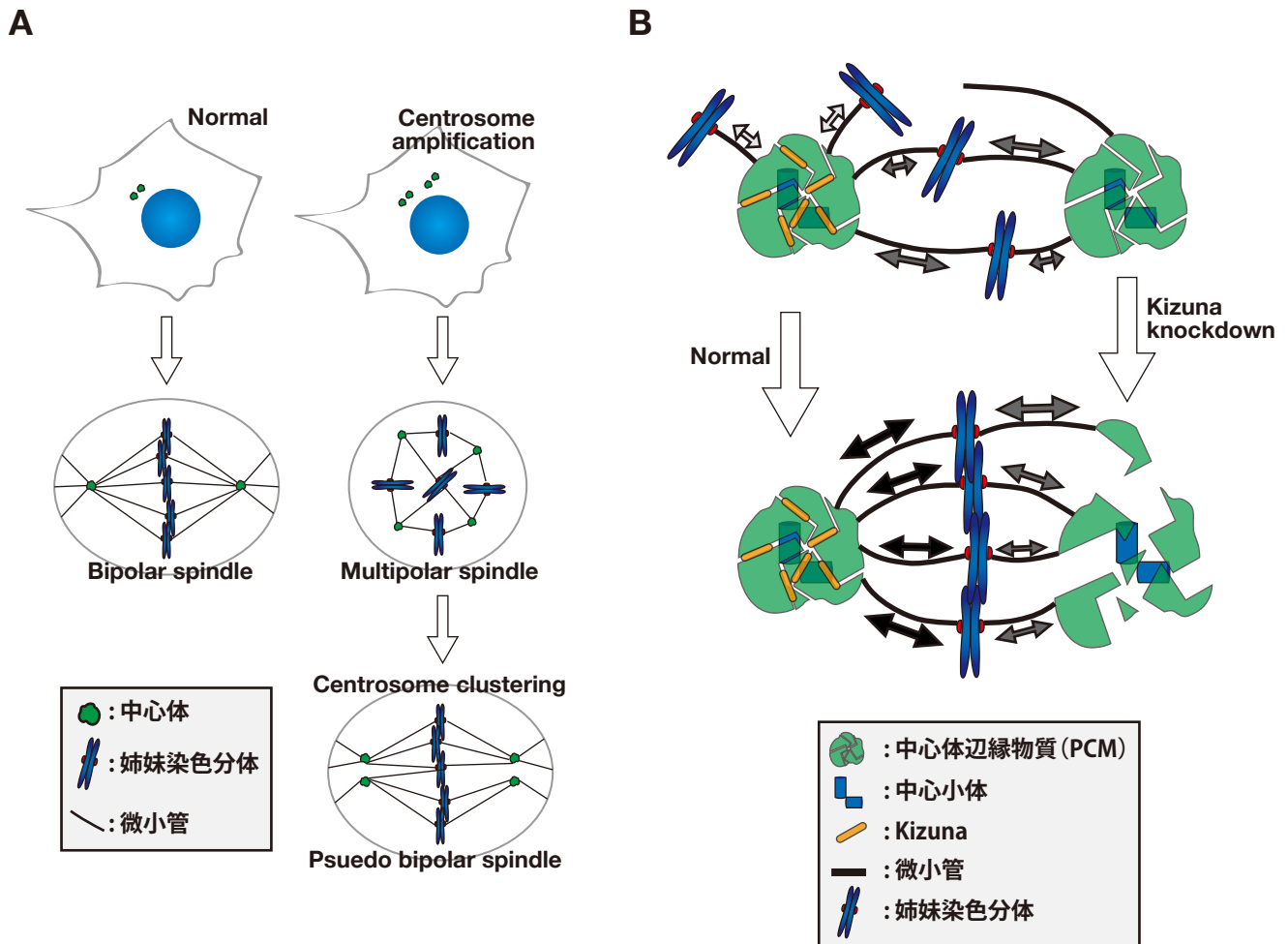


図 4. 中心体の“数”の異常と“質”の異常

(A) 中心体の数の異常。中心体数異常を生じた細胞は多極紡錘体 (multipolar spindle) を形成する (右中段)。癌細胞では中心体が二極に収束し (centrosome clustering)、擬似的な二極紡錘体 (psuedo bipolar spindle) を形成する (右下段)。(B) 中心体の質の異常。Kizuna は分裂期に紡錘体から中心体にかかる力に対抗することで中心体構造を安定に保つ。Kizuna の欠損は分裂期における中心体辺縁物質 (PCM) の断片化を引き起こし、細胞は多極紡錘体を形成する。

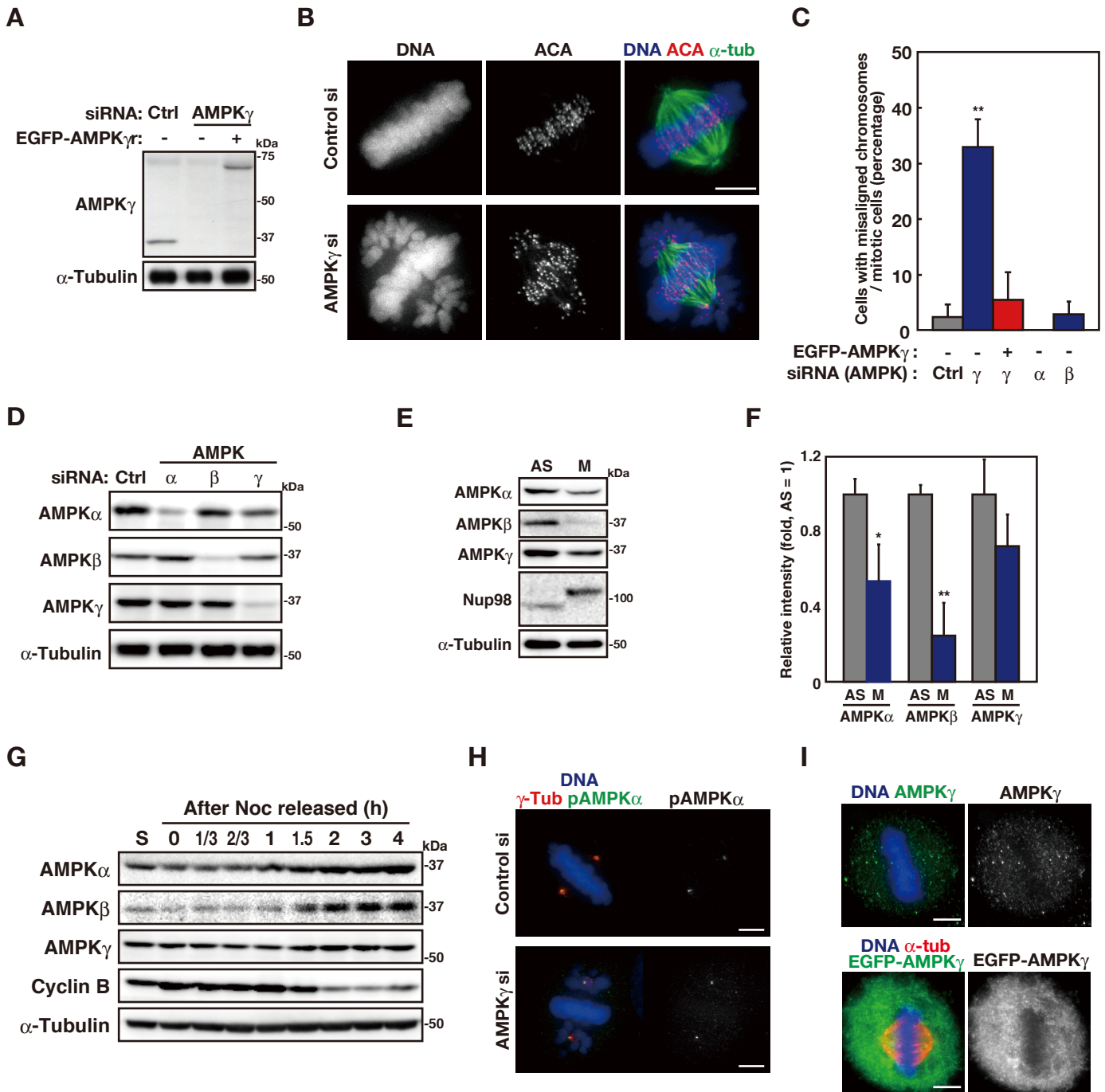


図 5. AMPK γ 発現抑制細胞は分裂期において染色体整列異常を引き起こす

(A) siRNA による AMPK γ の発現抑制効果。EGFP-AMPK γ r 発現もしくは未発現 HeLa 細胞に Control (Ctrl) もしくは AMPK γ siRNA を処理し、分裂期に同調後、細胞可溶化液を得た。細胞可溶化液を SDS-PAGE によって分離し、図示したタンパク質の抗体を用いて検出した。(B) AMPK γ 発現抑制細胞の分裂期表現型。Control もしくは AMPK γ siRNA 処理 HeLa 細胞を α -tubulin (緑)、ACA (赤)、Hoechst33342 (DNA, 青) によって染色した。Bar = 5 μ m。(C) AMPK サブユニット発現抑制細胞における染色体整列異常の割合。EGFP-AMPK γ r 発現もしくは未発現 HeLa 細胞に図示した siRNA を用いて発現抑制を行い分裂期に同調した。グラフは分裂期細胞における染色体整列異常を示した細胞割合を示している。独立した実験を 3 回行ない、標準偏差をエラーバーとして示した。**, P=0.003、Ctrl に対する student t 検定。(D) siRNA による AMPK サブユニットの発現抑制効果。図示した siRNA を処理した分裂期 HeLa 細胞可溶化液を、SDS-PAGE によって分離し、図示したタンパク質の抗体を用いて検出した。(E) 分裂期における AMPK サブユニットのタンパク質量。未同調 HeLa 細胞可溶化液 (AS) 及び分裂期同調 HeLa 細胞を shake off によって回収し可溶化した溶液 (M) を、SDS-PAGE によって分離し、図示したタンパク質の抗体を用いて検出した。Nup98 バンドのシフトアップによって、M 期同調を確認している。(F) (E) におけるそれぞれのバンドの輝度を定量し、 α -tubulin のバンド輝度によって標準化した。グラフは AS の値を 1 とした相対値を表している。独立した実験を 3 回行ない、標準偏差をエラーバーとして示した。*, P=0.045, **, P=0.009、AS に対する student t 検定。(G) 分裂期進行に伴う AMPK サブユニットタンパク質量の変化。Thymidine block によって同調した HeLa 細胞可溶化液 (S) 及び、thymidine block リリース 10 時間後、ノコダゾール (Noc) で 2 時間処理しリリース後、図示した時間で回収した細胞可溶化液を、SDS-PAGE によって分離し、図示したタンパク質の抗体を用いて検出した。(H) 活性化型 AMPK α の分裂期細胞内局在。Control もしくは AMPK γ siRNA 処理 HeLa 細胞を pAMPK α (緑)、ACA (赤)、Hoechst33342 (DNA, 青) によって染色した。Bar = 5 μ m。(I) EGFP-AMPK γ 発現もしくは未発現 HeLa 細胞を AMPK γ もしくは EGFP (緑)、 α -tubulin (赤)、Hoechst33342 (DNA, 青) によって染色した。Bar = 5 μ m。

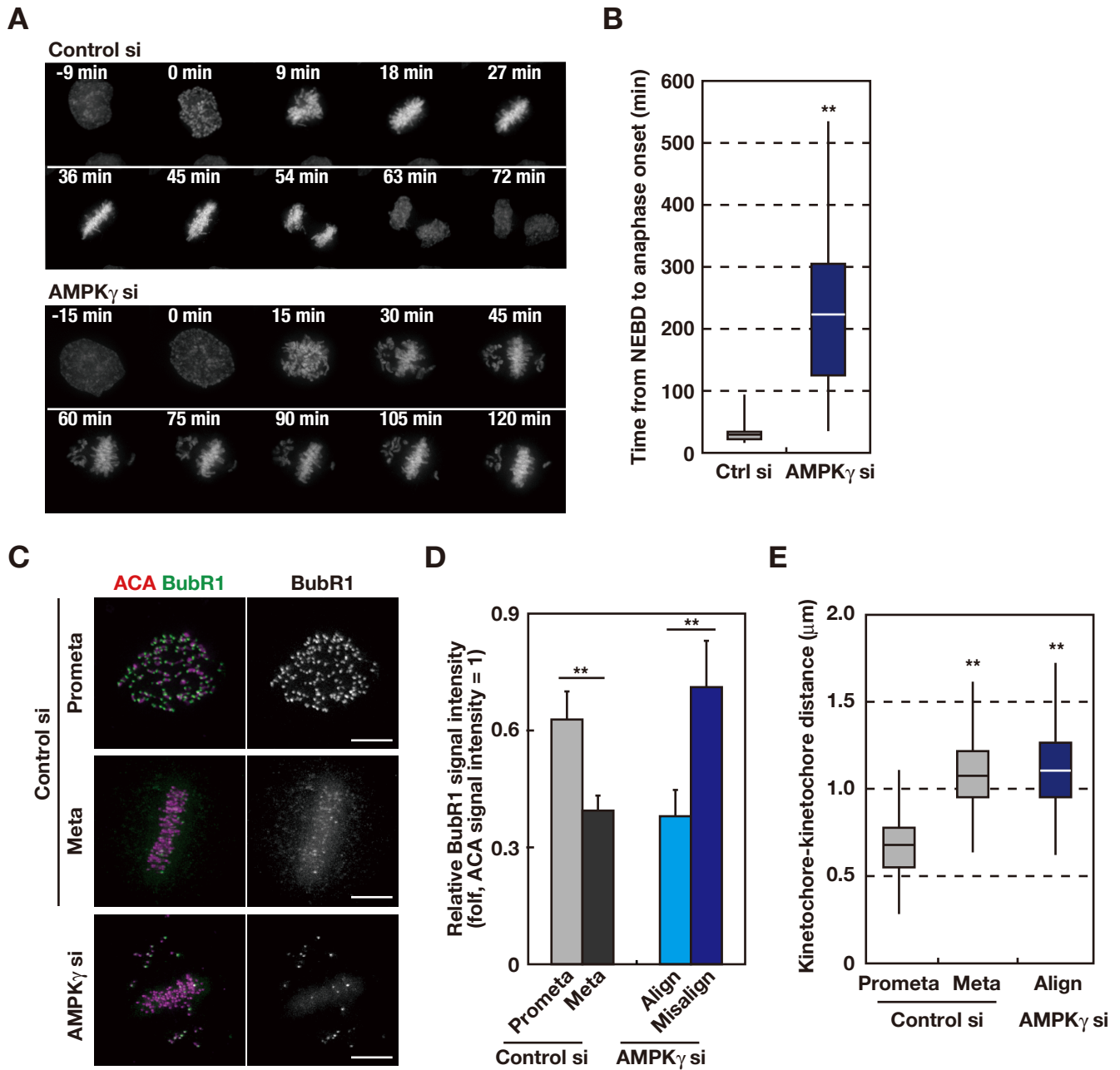


図 6. AMPK γ 発現抑制細胞において赤道面に整列した染色体は二極紡錘体結合を確立する

(A) Control 及び AMPK γ siRNA 処理 EGFP-HistoneH2B 細胞の生細胞観察。核膜崩壊を 0 分として示した。(B) AMPK γ 発現抑制細胞の分裂期後期進行遅延。Control (Ctrl) もしくは AMPK γ siRNA 処理 EGFP-HistoneH2B 細胞について 10 時間生細胞観察を行った。核膜崩壊から分裂期後期進行直前までの時間を計測し、箱ひげ図として示した。中央値を横線で示し、箱の上下端はそれぞれ第一・第三四分位点を示している。各々のカラムは最低 100 細胞以上を測定した。**, $P < 0.001$, Mann-Whitney U 検定。(C) AMPK γ 発現抑制細胞の BubR1 局在。Control もしくは AMPK γ siRNA 処理 HeLa 細胞を BubR1 (緑)、ACA (赤) によって染色した。Bar = 5 μ m。(D) BubR1 シグナル強度の定量。(C) と同様に処理した細胞について BubR1 及び ACA シグナルの蛍光強度を測定した。グラフは ACA シグナル強度を 1 とした相対値の平均を表している。5 細胞測定し、標準偏差をエラーバーとして示した。**, $P < 0.001$, student t 検定。(E) 姉妹キネトコア間の距離。Control もしくは AMPK γ siRNA 処理 HeLa 細胞を ACA で染色した。対となる姉妹キネトコアの ACA 間の距離を測定し、(B) の箱ひげ図と同様に示した。各々のカラムは最低 150 ペア以上の姉妹キネトコアを測定した。**, $P < 0.001$, Mann-Whitney U 検定。

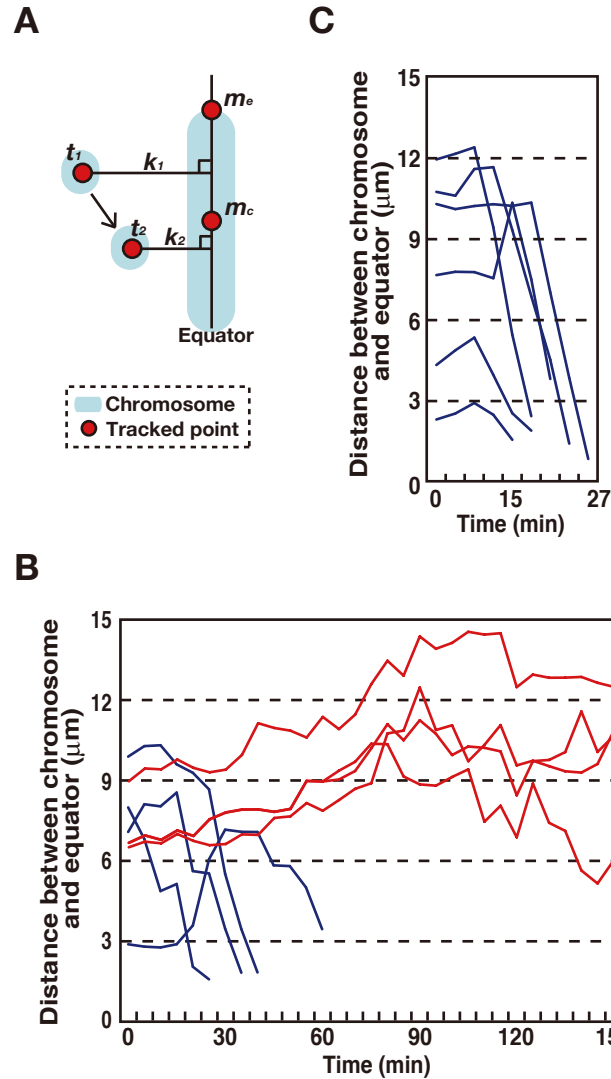


図 7. AMPK γ 発現抑制では赤道面から離れた箇所に位置する染色体が不整列な染色体となる

(A) 図 6A における染色体 - 赤道面間の距離の測定。各時間について 3 点測定した (m_e : 整列した染色体群の端、 m_c : 整列した染色体群の中央、 t_n : 染色体)。各時間における m_e と m_c を通る直線を赤道面と規定し、 t_n から赤道面の直線までの直交する直線の距離を染色体 - 赤道面間距離 (k_n) とした。(B, C) 不整列な染色体 (赤) 及び整列した染色体 (青) と赤道面間の距離。図 6A について (A) のように染色体 - 赤道面間距離を算出し、横軸を核膜崩壊からの時間、縦軸を距離として表した。

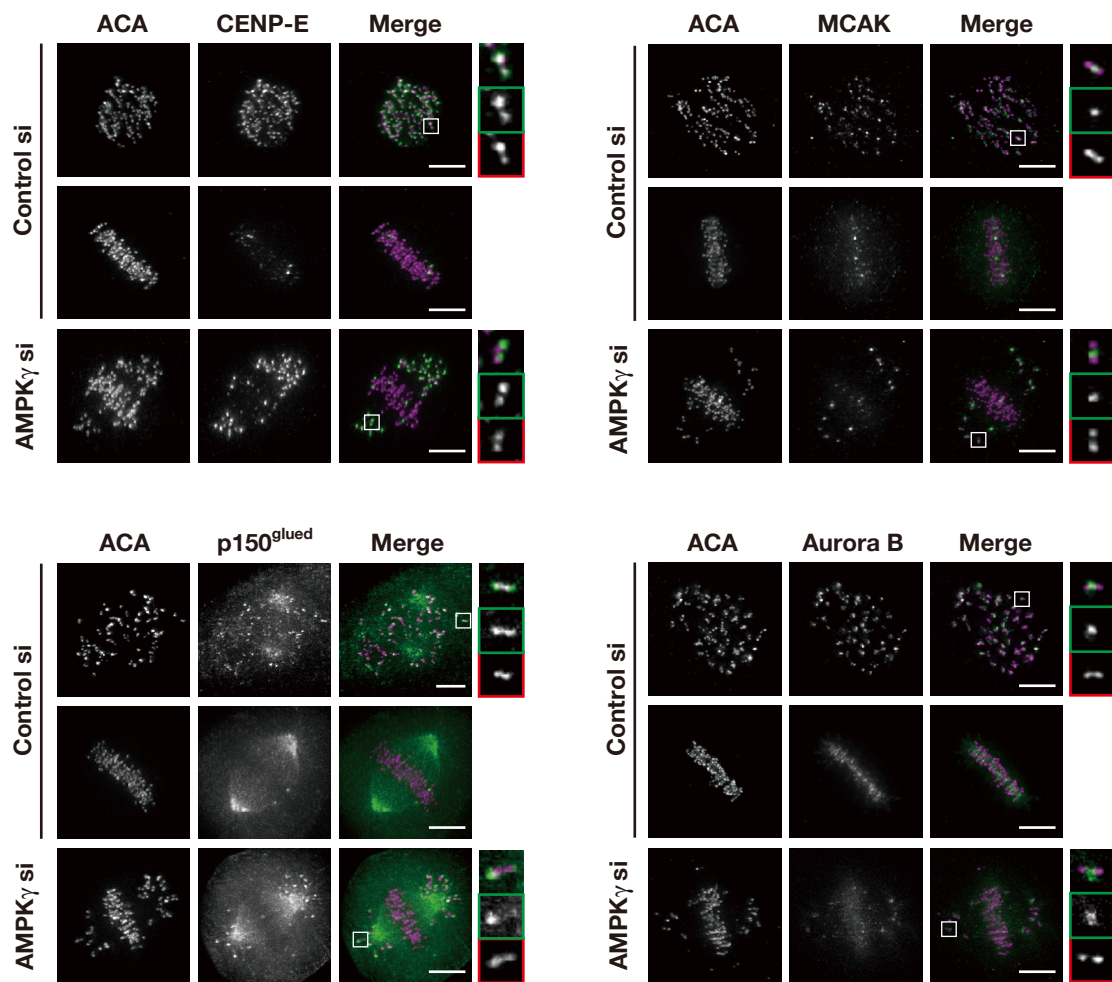


図 8. AMPK γ 発現抑制細胞における染色体整列調節分子の局在
Control もしくは AMPK γ siRNA 処理 HeLa 細胞を図示したタンパク質の抗体（緑）、ACA（赤）によって染色した。白線で囲んだ領域を右パネルに拡大し示した。Bar = 5 μ m。

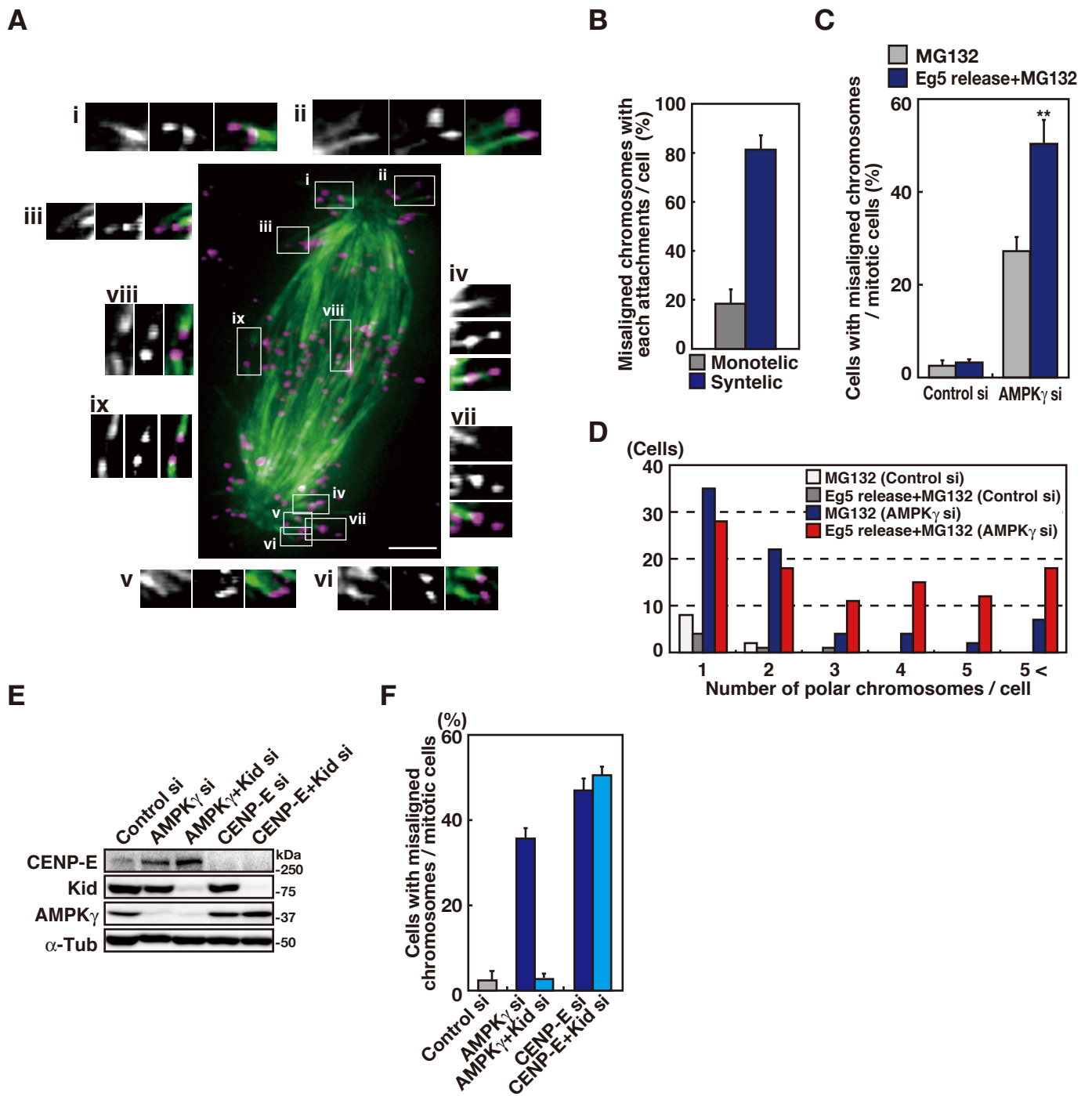


図 9. AMPK γ はシンテリック結合修正に関与する

(A) AMPK γ 発現抑制細胞におけるキネトコア - 微小管結合の可視化。AMPK γ siRNA 処理 HeLa 細胞を α -tubulin (緑)、ACA (赤) で染色した。挿入図は Z 軸方向に選択したスタックを重ね合わせることで、それぞれのキネトコア - 微小管結合を示した (シンテリック結合 : i-vi、モノテリック結合 : vii、二極紡錘体結合 : viii, ix)。Bar = 5 μ m。(B) (A) における不整列な染色体のキネトコア - 微小管結合状態。AMPK γ 発現抑制細胞における不整列な染色体のシンテリック結合及びモノテリック結合の割合を示した。10 細胞を計測し、標準偏差をエラーバーとして示した。(C, D) AMPK γ 発現抑制細胞における Eg-5 阻害剤誘導性シンテリック結合の修正異常。Thymidine ブロックからリリースした HeLa 細胞について最後の 2 時間を 1 μ M Eg-5 阻害剤 (Eg5) もしくは MG132 (プロテアソーム阻害剤) で処理した。その後、Eg-5 阻害剤処理細胞は MG132 を含む培地で 2 時間リリースした。グラフは染色体整列異常を示した分裂期細胞割合 (C) と不整列な染色体数 (D) を示している。独立した実験を 3 回行ない、標準偏差をエラーバーとして示した。**, P=0.003、MG132 に対する student t 検定。(E) siRNA による AMPK γ とモータータンパク質の共発現抑制効果。HeLa 細胞に図示した siRNA を処理し、分裂期に同調後、細胞可溶化液を得た。細胞可溶化液を SDS-PAGE によって分離し、図示したタンパク質の抗体を用いて検出した。(F) AMPK γ とモータータンパク質の共発現抑制細胞における染色体整列異常の割合。HeLa 細胞に図示した siRNA を用いて発現抑制を行い分裂期に同調した。グラフは分裂期細胞における染色体整列異常を示した細胞割合を示している。独立した実験を 3 回行ない、標準偏差をエラーバーとして示した。

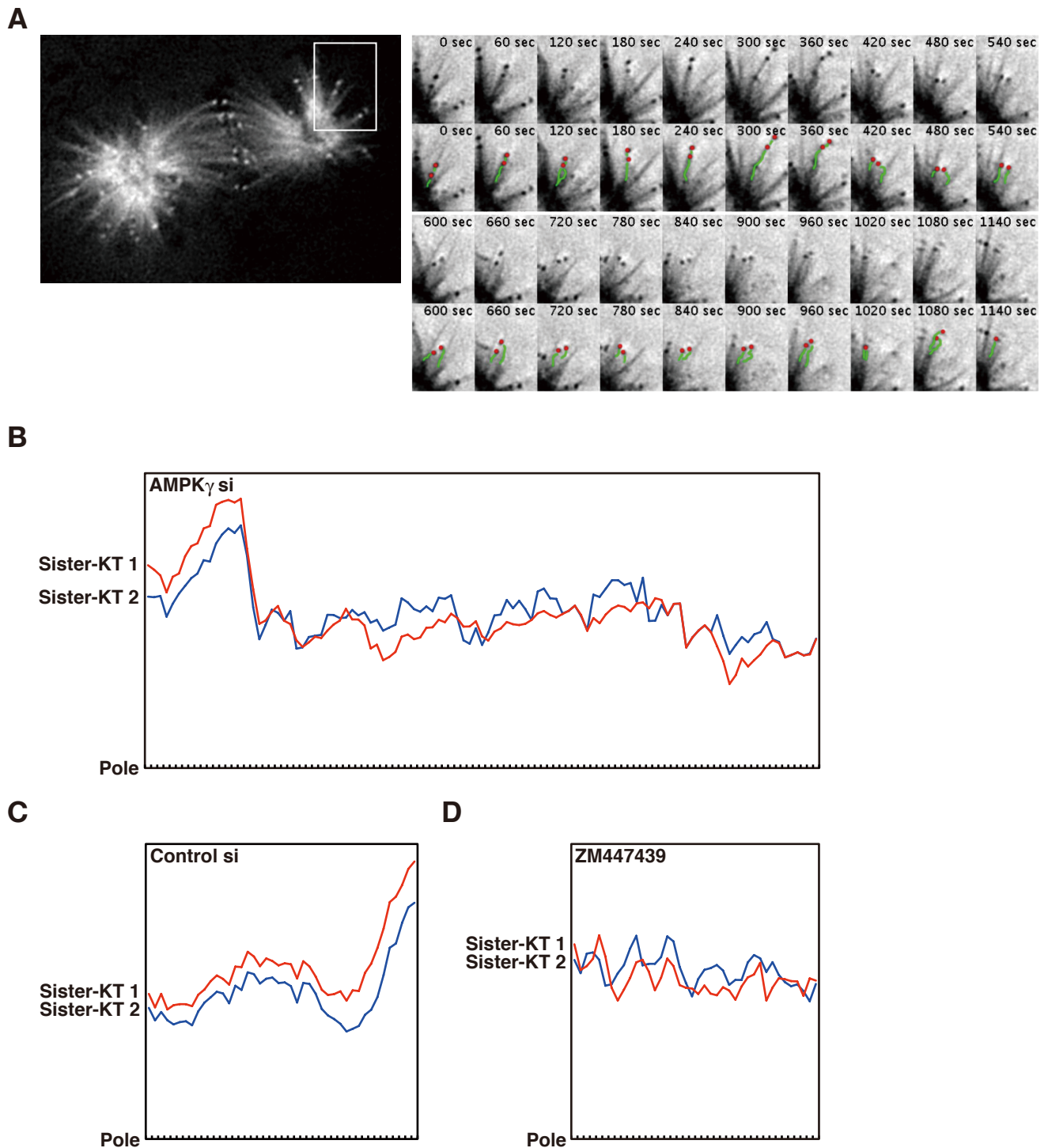


図 10. キネトコア - 微小管結合の生細胞観察

(A) AMPK γ 発現抑制 EGFP-CENP-A, EGFP- α -tubulin 発現細胞の生細胞観察。寒天重層法によって細胞を扁平にした。左パネルは扁平にした細胞像を示し、白線で囲んだ領域の選択した時間像を右パネルに拡大し示した。右パネル下段は、有意なシグナルをトレースし、緑 (α -tubulin) と赤 (CENP-A) で示した。(B-D) 姉妹キネトコアの動態観察。(A) における姉妹キネトコアペア (Sister-KT1, 2) 及び、Control siRNA 処理もしくは 4 μ M ZM447439 を 2 時間処理した EGFP-CENP-A, EGFP- α -tubulin 発現細胞を (A) と同様に観察した際に見られた姉妹キネトコアペア (Sister-KT1, 2) について、EGFP- α -tubulin の収束点を極 (pole) とし、pole から対となる姉妹キネトコアそれぞれのキネトコアまでの距離を測定した。グラフは横軸をフレーム数、縦軸を距離として示している。

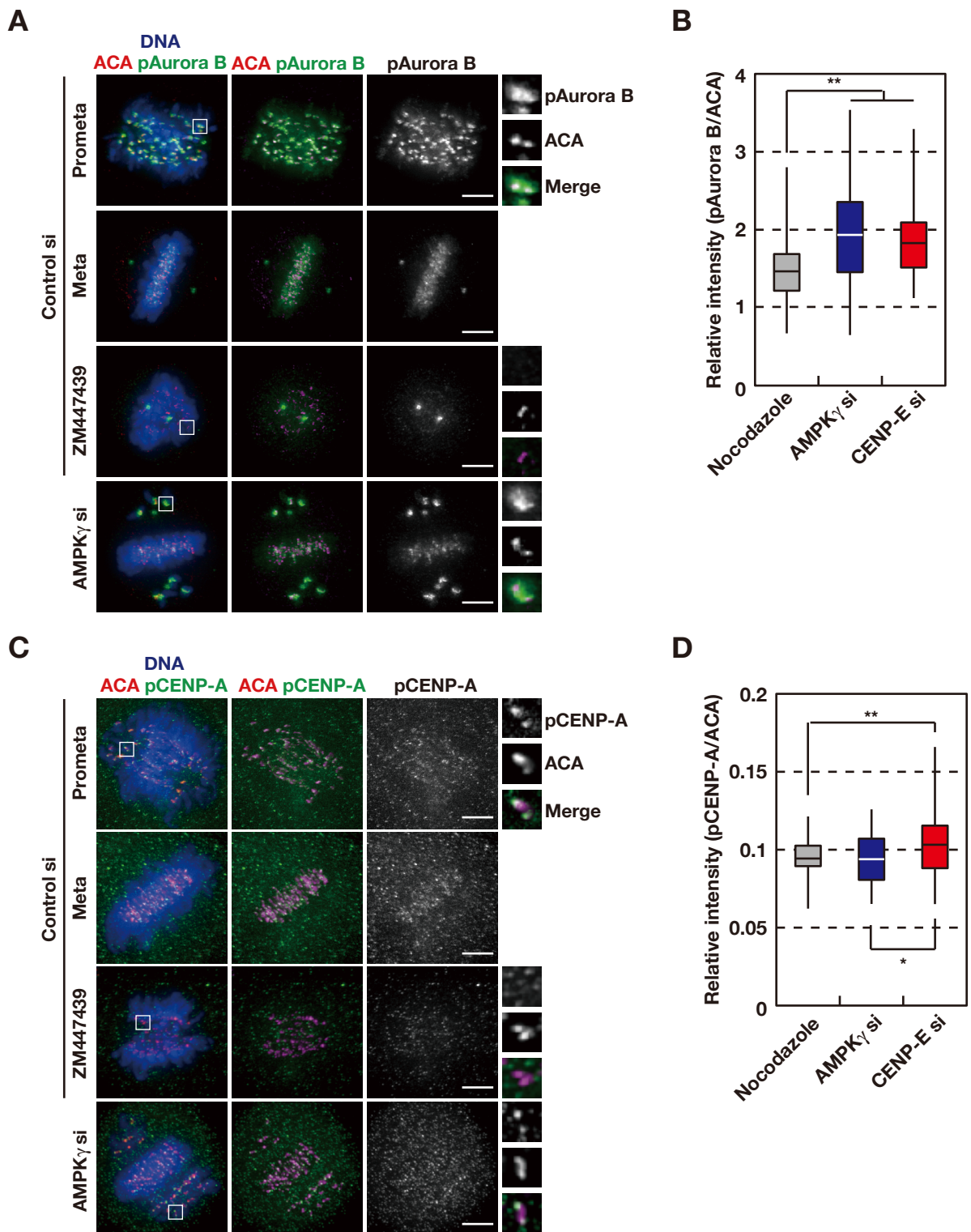


図 11. AMPK γ 発現抑制細胞における不整列な染色体の Aurora B は活性化している

(A, C) Control もしくは AMPK γ siRNA 処理及び 2 時間 4 μ M ZM447439 処理した HeLa 細胞を pAurora B (A) 及び pCENP-A (C) (緑)、ACA (赤)、Hoechst33342 (DNA, 青) によって染色した。白線で囲んだ領域を右パネルに拡大し示した。Bar = 5 μ m。(B, D) A, C において pAurora B (B) 及び pCENP-A (D) のシグナル強度を定量した。**, $P < 0.001$, **, $P = 0.02$ 、Mann-Whitney U 検定。

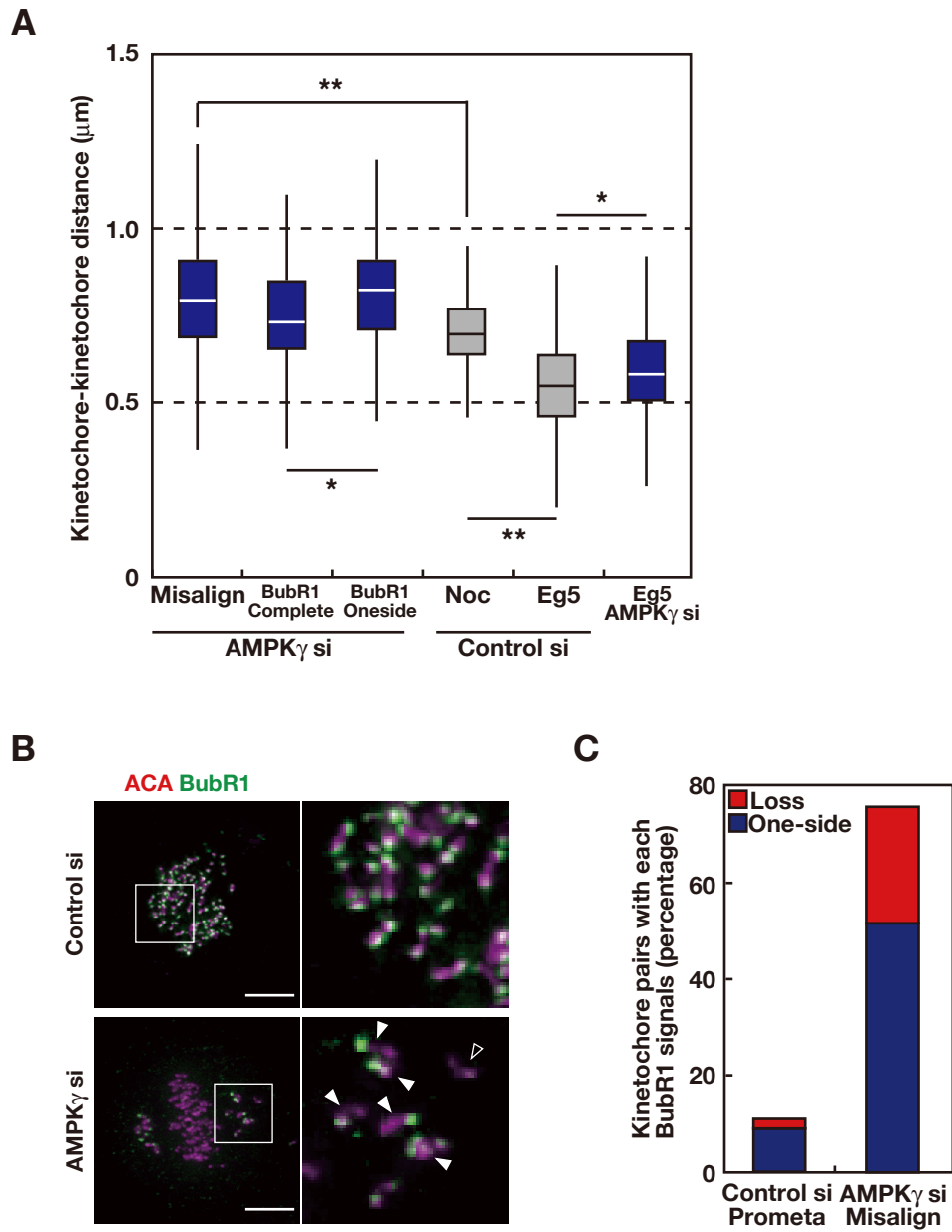
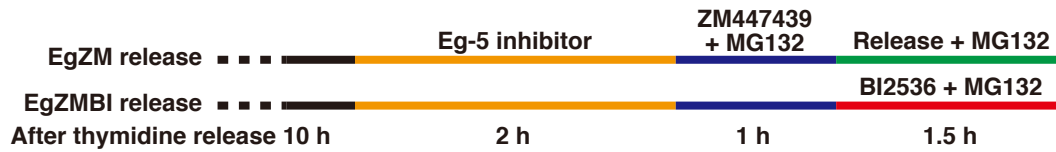


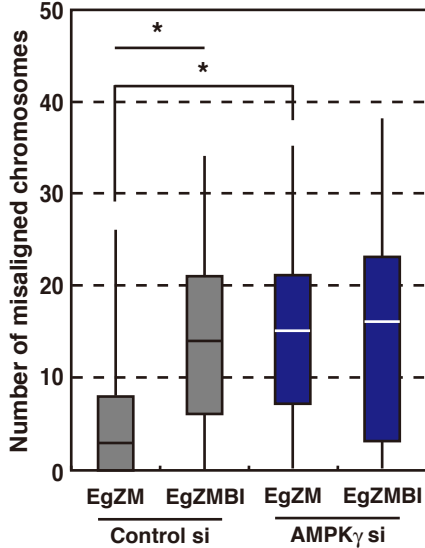
図 12. AMPK γ 発現抑制細胞における不整列な染色体には不均衡な張力が生じている

(A) 姉妹キネトコア間の距離。2 時間の 100 nM Nocodazol (Noc)、1 μ M Eg-5 阻害剤 (Eg5) 処理した Control もしくは AMPK γ siRNA 処理 HeLa 細胞を ACA で染色した。対となる姉妹キネトコアの ACA 間の距離を測定し、図 6B の箱ひげ図と同様に示した。各々のカラムは最低 100 ペア以上の姉妹キネトコアを測定した。*, 0.01 < P < 0.001, **, P < 0.001、Mann-Whitney U 検定。(B) 不整列な姉妹キネトコアにおける BubR1 の局在。図 6C と同様に細胞を処理し染色した。白線で囲んだ領域を右パネルに拡大し示した。黒矢頭：姉妹キネトコア双方の BubR1 シグナルが消失している、白矢頭：姉妹キネトコアの片方の BubR1 シグナルが消失している。Bar = 5 μ m。(C) (B) における姉妹キネトコアペアの BubR1 局在状態。不整列な染色体の姉妹キネトコアペアにおいて、姉妹キネトコア双方の姉妹キネトコア双方の BubR1 シグナルが消失しているもの (Loss) と、姉妹キネトコアの片方の BubR1 シグナルが消失している (One-side) ものの割合を示した。120 以上の姉妹キネトコアペアを測定した。

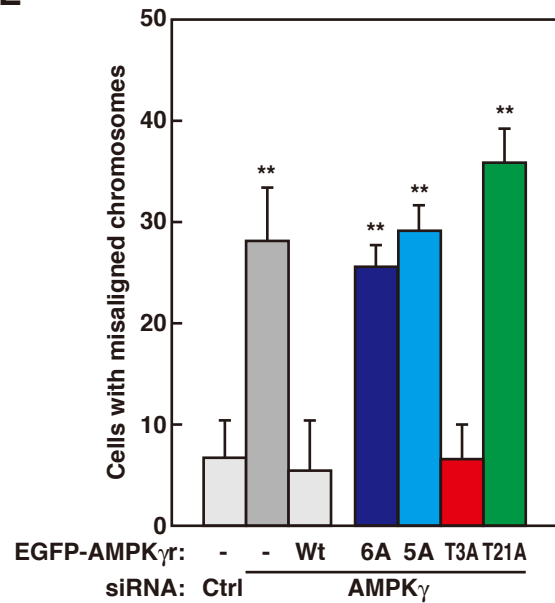
A



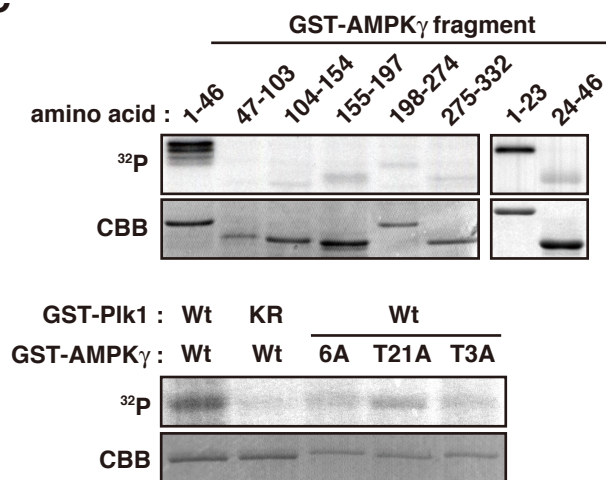
B



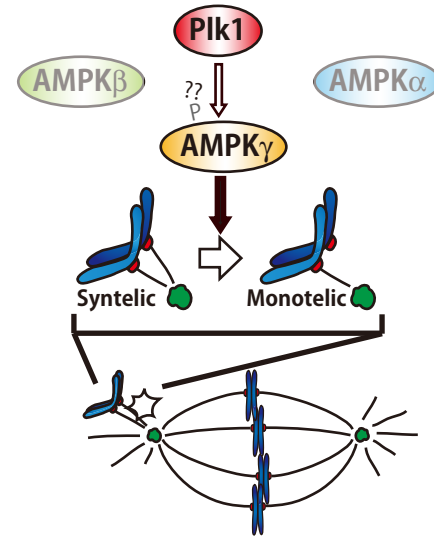
E



C



F



D

Species	Residue Position	Sequence
<i>H. Sapiens</i>	1	ME <u>T</u> VI <u>S</u> S <u>S</u> SPAVENEHPQ <u>E</u> T <u>P</u> E 23
<i>P. Troglodytes</i>	1	ME <u>T</u> VI <u>S</u> S <u>S</u> SPALENEHPQ <u>E</u> T <u>P</u> E 23
<i>B. Taurus</i>	1	ME <u>A</u> VP <u>S</u> S <u>D</u> SYP <u>A</u> VENEHLQ <u>E</u> T <u>P</u> E 23
<i>M. musculus</i>	1	ME <u>S</u> V- <u>A</u> AE <u>S</u> S <u>P</u> ALENEHFQ <u>E</u> T <u>P</u> E 22
<i>R. Norvegicus</i>	1	ME <u>S</u> V- <u>A</u> AE <u>S</u> APAPENEHSQ <u>E</u> T <u>P</u> E 22
<i>D. Rerio</i>	1	ME <u>C</u> LP <u>A</u> V <u>L</u> DD <u>L</u> DCKE <u>A</u> HI <u>E</u> D <u>P</u> E 23
<i>S. Cerevisiae</i>	1	ME <u>K</u> PTQ <u>D</u> SQEKVSIE <u>Q</u> L <u>A</u> V <u>E</u> S-- 21

図 13. AMPK γ による染色体整列には 21 番目のスレオニン残基が必要である

(A) 阻害剤を用いた染色体整列検定。Thymidine ブロックリリース 10 時間後の細胞において 1 μ M Eg-5 阻害剤 (Eg)、4 μ M ZM447439 (ZM)、100 nM BI2536 (BI)、30 μ M MG132 を図示したように処理した。(B) 不整列な染色体数の測定。(A) のように処理した分裂期 HeLa 細胞について不整列な ACA ペア数を計測し、図 6B の箱ひげ図と同様に示した。各々のカラムは 100 細胞以上について測定した結果を示している。(C) GST 融合 AMPK γ 断片化及びアミノ酸変異タンパク質を用いた *in vitro* キナーゼアッセイ。(D) *In vitro* において PIK1 によってリン酸化される残基周辺のアライメント。H. Sapiens : NP_002724.1, P. Troglodytes : XP_509039.2, B. Taurus : NP_777011.2, M. Musculus : NP_058061.2, R. Norvegicus : NP_037142.1, D. Rerio : NP_998326.1, S. Cerevisiae : CAA96823 (SNF4) の配列情報を用いた。赤字は変異を導入した残基を示している。(E) AMPK γ 変異体による染色体整列異常レスキュー実験。図示した変異体を AMPK γ 発現抑制細胞に発現し、分裂期細胞における染色体整列異常細胞の割合を測定した。独立した実験を 3 回行ない、標準偏差をエラーバーとして示した。**, 0.01 < P < 0.001、Wt に対する student t 検定。(F) 本研究結果の概要図。

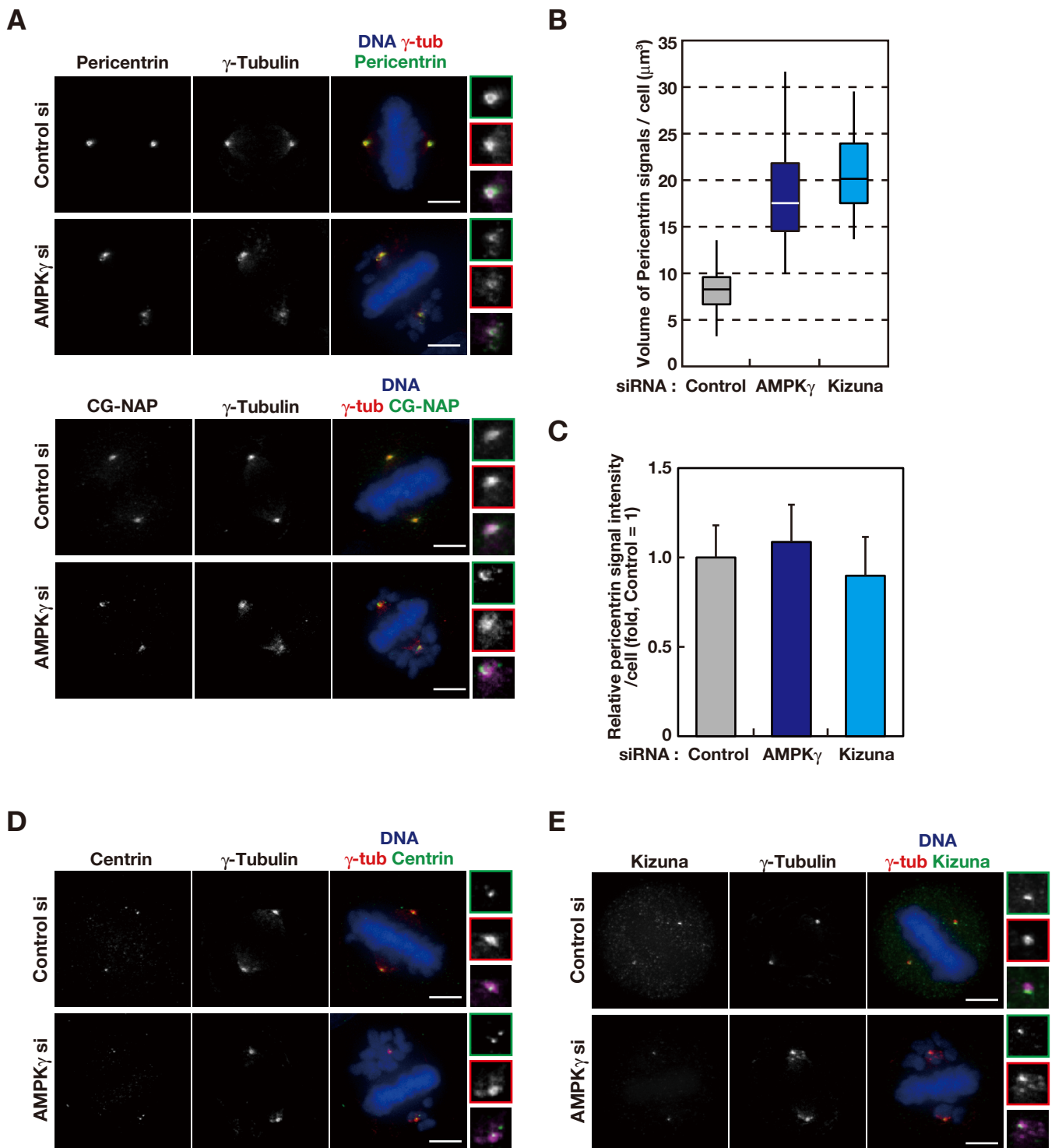


図 14. AMPK γ 発現抑制によって PCM タンパク質の極への収束が抑制される

(A, D, E) Control もしくは AMPK γ siRNA 処理 HeLa 細胞を図示したタンパク質の抗体 (緑)、ACA (赤)、Hoechst33342 (DNA, 青) によって染色した。Bar = 5 μ m。 (B, C) siRNA 処理細胞における pericentrin シグナル体積と蛍光強度。Control, AMPK γ , Kizuna siRNA 処理 HeLa 細胞を pericentrin 抗体で染色した後、細胞における pericentrin シグナル体積を測定し、図 6B の箱ひげ図と同様に示した (B)。また、同様に処理細胞の pericentrin 蛍光強度を測定した (C)。5 細胞以上測定し標準偏差をエラーバーとして示している。

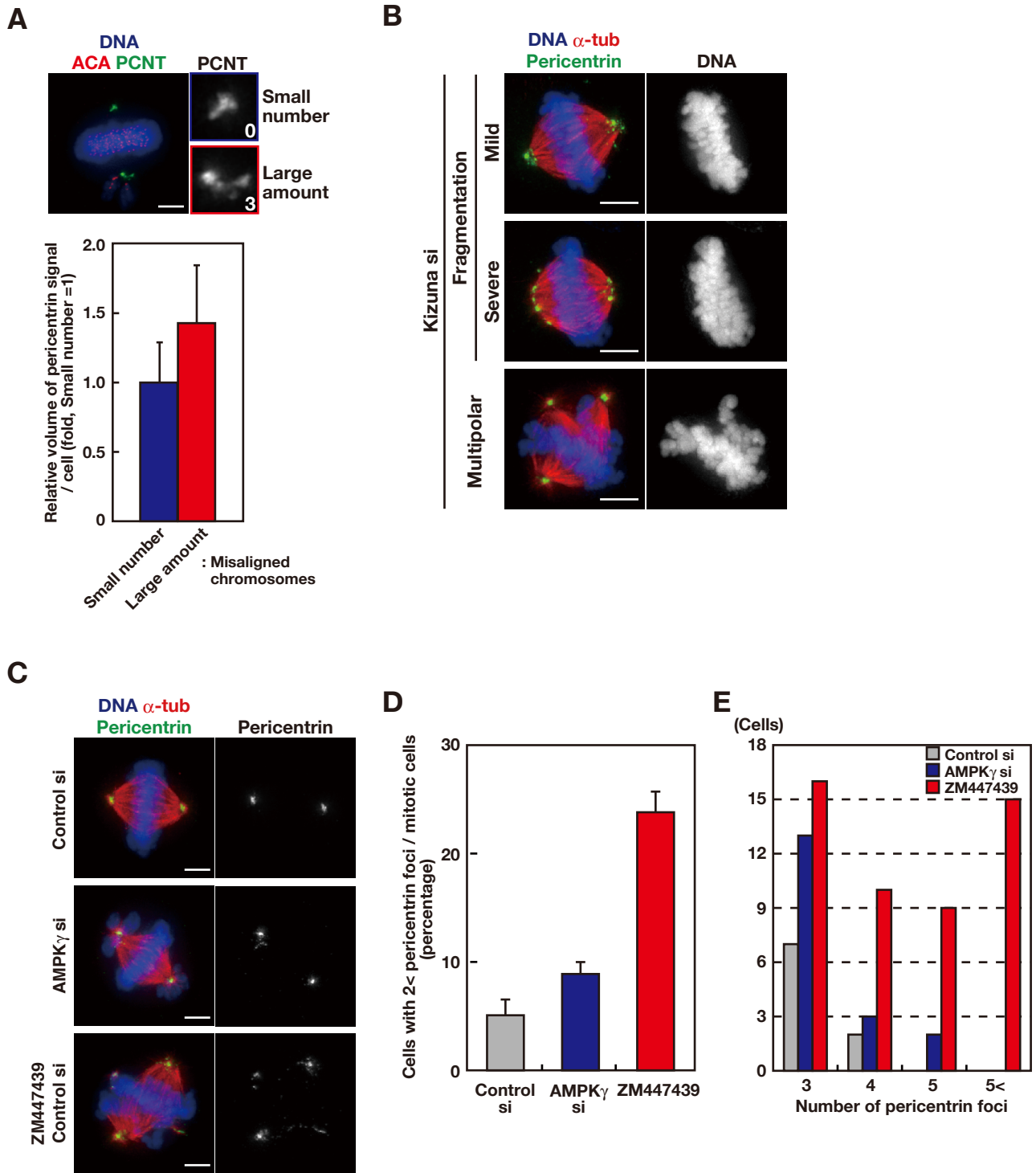
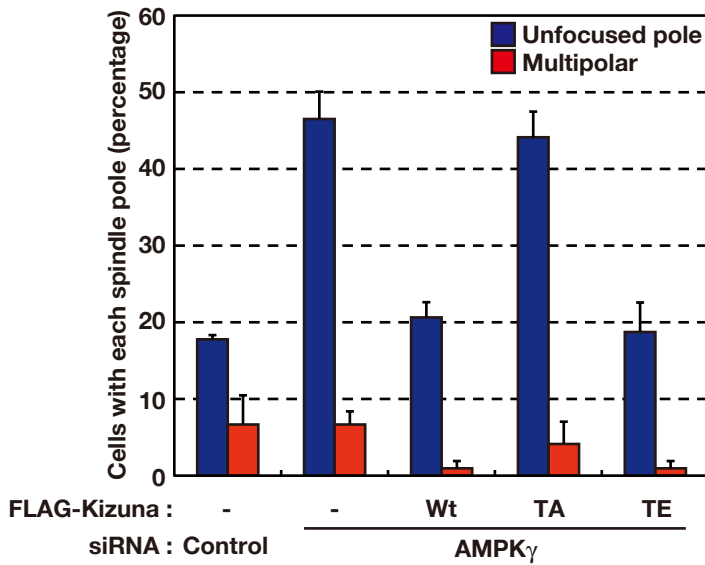


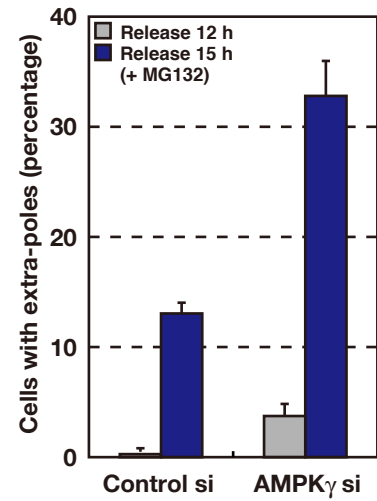
図 15. AMPK γ 発現抑制による PCM の収束異常は不整列な染色体に依存する

(A) 染色体整列異常と PCM の収束異常。AMPK γ siRNA 処理 HeLa 細胞を pericentrin (PCNT, 緑)、ACA (赤) で染色した (上パネル)。PCNT シグナルを右パネルに拡大して示し、右下に PCNT シグナル近傍に存在した ACA ペア数を示した。下のグラフは、各細胞の PCNT シグナル近傍に位置した ACA ペア数の多寡における PCNT シグナル体積を、ACA ペアが少ない PCNT シグナル体積を 1 とした相対値で示している。30 細胞を計測し、標準偏差をエラーバーとして示した。(B) Control もしくは Kizuna siRNA 処理 HeLa 細胞を pericentrin (緑)、ACA (赤)、Hoechst33342 (DNA, 青) で染色した。Bar = 5 μ m。(C) Control もしくは AMPK γ siRNA 処理及び thymidine ブロックリリース 10 時間後、4 μ M ZM447439 で 2 時間処理した細胞を pericentrin (緑)、 α -tubulin (赤)、Hoechst33342 (DNA, 青) によって染色した。Bar = 5 μ m。(D, E) 多極紡錘体形成細胞の割合と細胞における PCM の数。(C) と同様に処理した分裂期 HeLa 細胞について、pericentrin foci が 3 つ以上観察された細胞の割合 (D) と pericentrin foci の数 (E) を測定した。独立した実験を 3 回行ない、標準偏差をエラーバーとして示した。

A



B



C

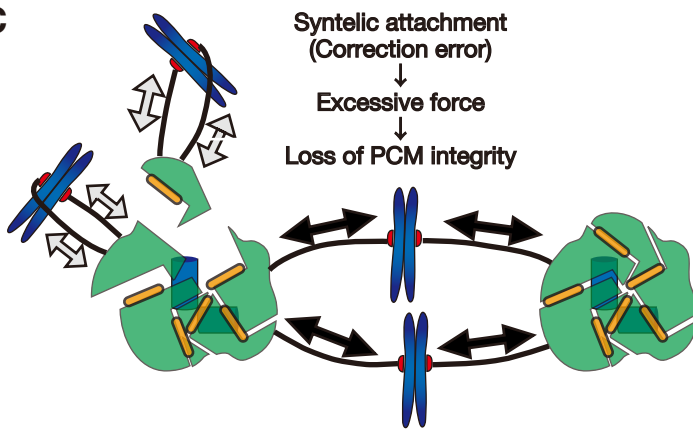


図 16. キネトコア - 微小管結合維持による紡錘体極への力の増大が PCM の収束異常を引き起こす

(A) Control もしくは AMPK γ siRNA 処理した HeLa 細胞に図示した FLAG-Kizuna 変異体を発現させ、分裂期に同調した。グラフは分裂期細胞における紡錘体極異常の割合を示している。独立した実験を 3 回行ない、標準偏差をエラーバーとして示した。(B) 分裂期中期遅延による紡錘体極の異常。Control もしくは AMPK γ siRNA 処理及び thymidine ブロックリリース 12 時間後及びリリース 12 時間後に 3 時間 30 μ M MG132 処理した分裂期 HeLa 細胞について、分裂期細胞における紡錘体極異常細胞の割合を測定した。独立した実験を 3 回行ない、標準偏差をエラーバーとして示した。(C) 本研究結果の概要図

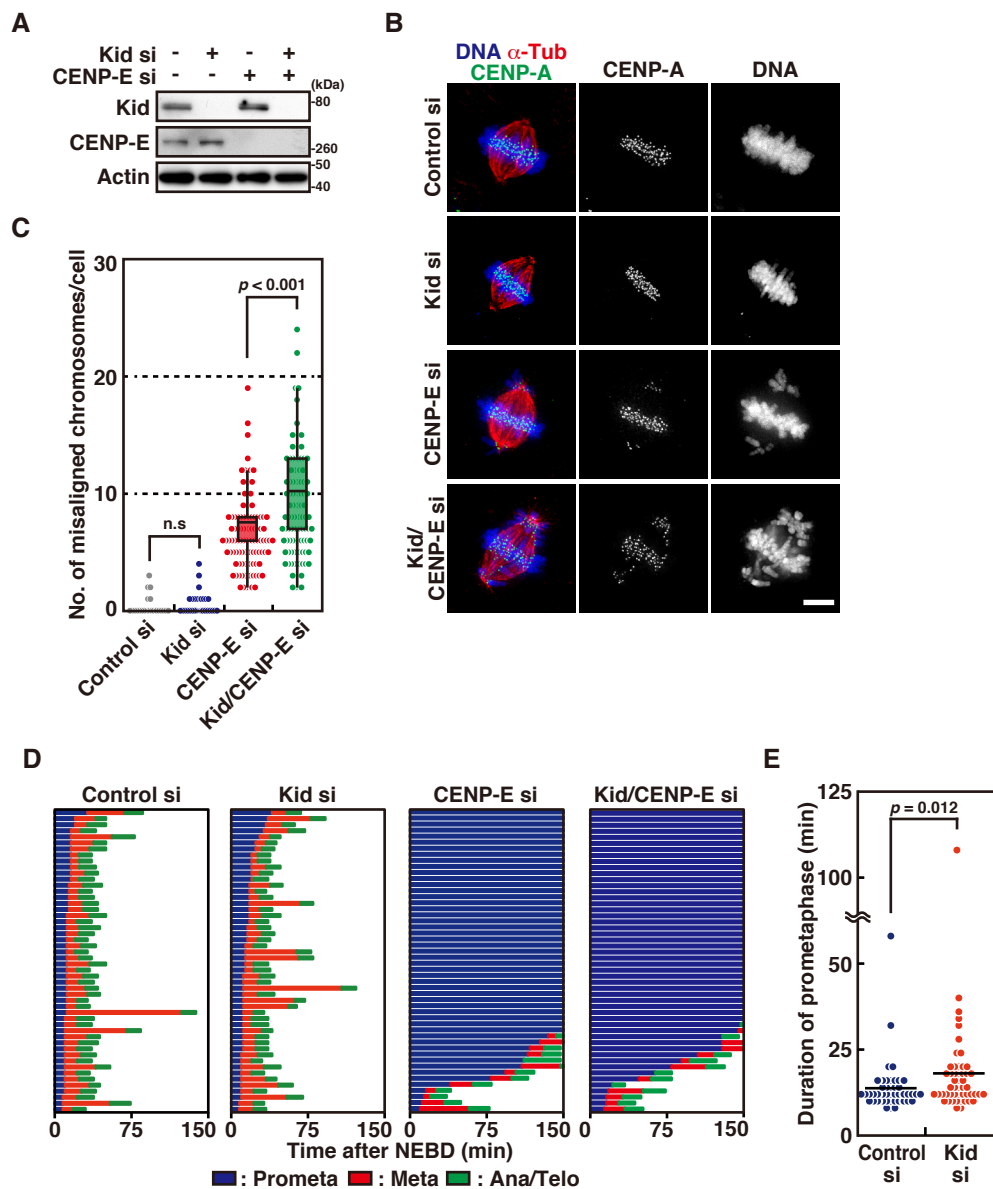
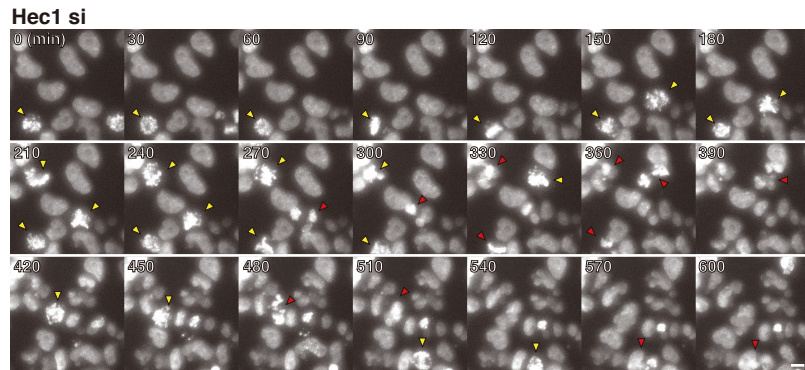


図 17. Kid は染色体整列に寄与する

(A) siRNA による Kid 及び CENP-E の発現抑制効果。HeLa 細胞に Kid もしくは CENP-E siRNA を処理し、分裂期に同調後、細胞可溶化液を得た。細胞可溶化液を SDS-PAGE によって分離し、図示したタンパク質の抗体を用いて検出した。(B) Kid 及び CENP-E 発現抑制細胞の分裂期表現型。EGFP-CENP-A 恒常発現 HeLa 細胞を図示した siRNA にて処理し、 α -tubulin (赤)、EGFP (緑) 抗体によって染色した。DNA は DAPI (青) によって染色した。Bar = 5 μ m。(C) Kid 及び CENP-E 発現抑制細胞における不整列な染色体数。(B) と同様に処理した細胞において極周辺に取り残された染色体の本数を図 6B と同様に箱ひげ図及びドットプロットで示した。各カラムにつき 150 細胞計測した。p, Mann-Whitney U 検定。(D) Kid 及び CENP-E 発現抑制による分裂期進行異常。H2B-mCherry が恒常的に発現する HeLa 細胞に図示した siRNA を処理し、生細胞観察した。核膜崩壊から染色体整列、染色体整列から分裂期後期への移行、分裂期後期への移行から核膜形成の時間を各細胞で計測し、それぞれの時間を Prometa (青)、Meta (赤)、Ana/Telo (緑) としバーグラフで示した。各バーが 1 細胞における時間を示しており、各 siRNA 処理につき 50 細胞計測した。(E) Kid 発現抑制細胞における分裂期前中期の時間。(D) における Kid 発現抑制細胞の Prometa に要した時間をドットプロットで示した。中央値をバーで示した。p, Mann-Whitney U 検定。

A



B

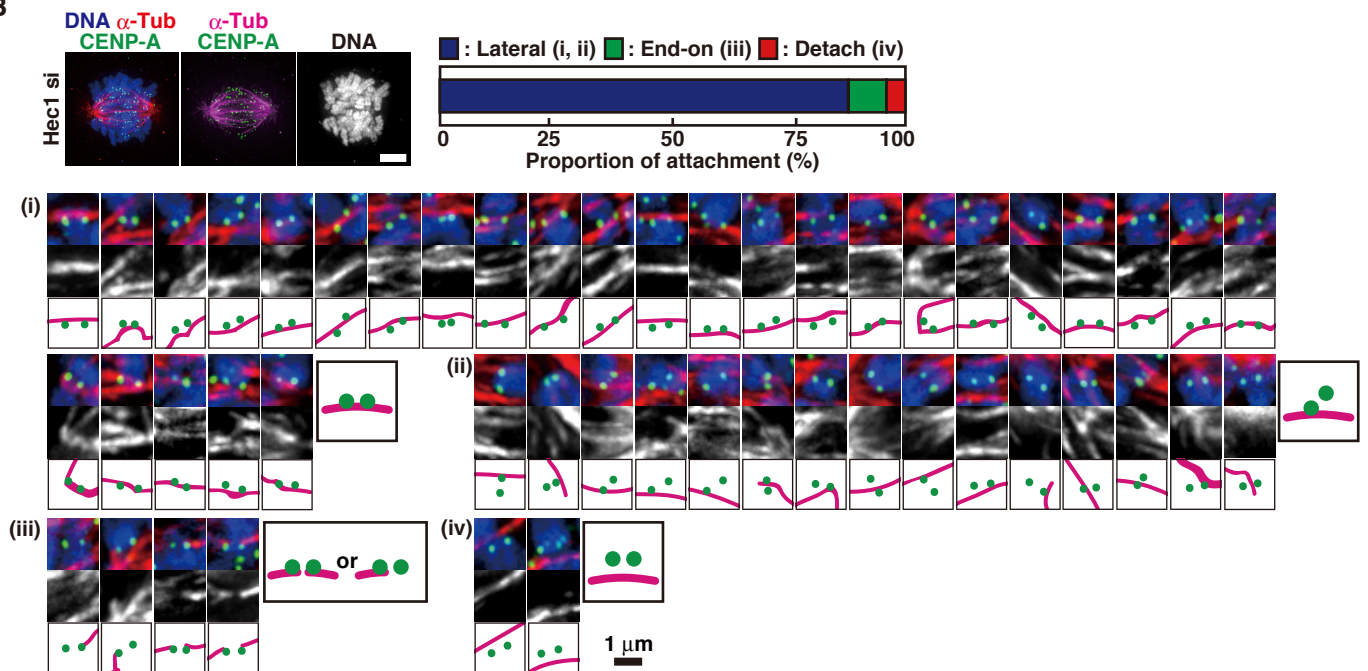


図 18. Hec1 発現抑制細胞は側面結合染色体を誘導する

(A) Hec1 発現抑制による SAC の異常。H2B-mCherry が恒常的に発現する HeLa 細胞を Hec1 siRNA 処理し、生細胞観察した。左上に経過時間を示した。分裂期停止細胞を黄矢頭で示し、mitotic slippage を引き起こした細胞を赤矢頭で示した。Bar = 5 μ m。(B) Hec1 発現抑制細胞におけるキネトコア - 微小管結合。EGFP-CENP-A が恒常的に発現する HeLa 細胞を Hec1siRNA で処理し、 α -tubulin 抗体 (赤)、EGFP 抗体 (緑) で染色した。DNA は DAPI (青) で染色した。Bar = 5 μ m。姉妹キネトコアとそれに隣接する微小管を、姉妹キネトコア双方が側面結合 (i)、姉妹キネトコアの一方が側面結合 (ii)、末端結合を含む (iii)、キネトコアが微小管から解離している (iv) と分類分けし、拡大図として示した。染色像における姉妹キネトコアと隣接する微小管をトレースし拡大図下段に示した。また、それぞれの分類の割合をバーグラフで示した。

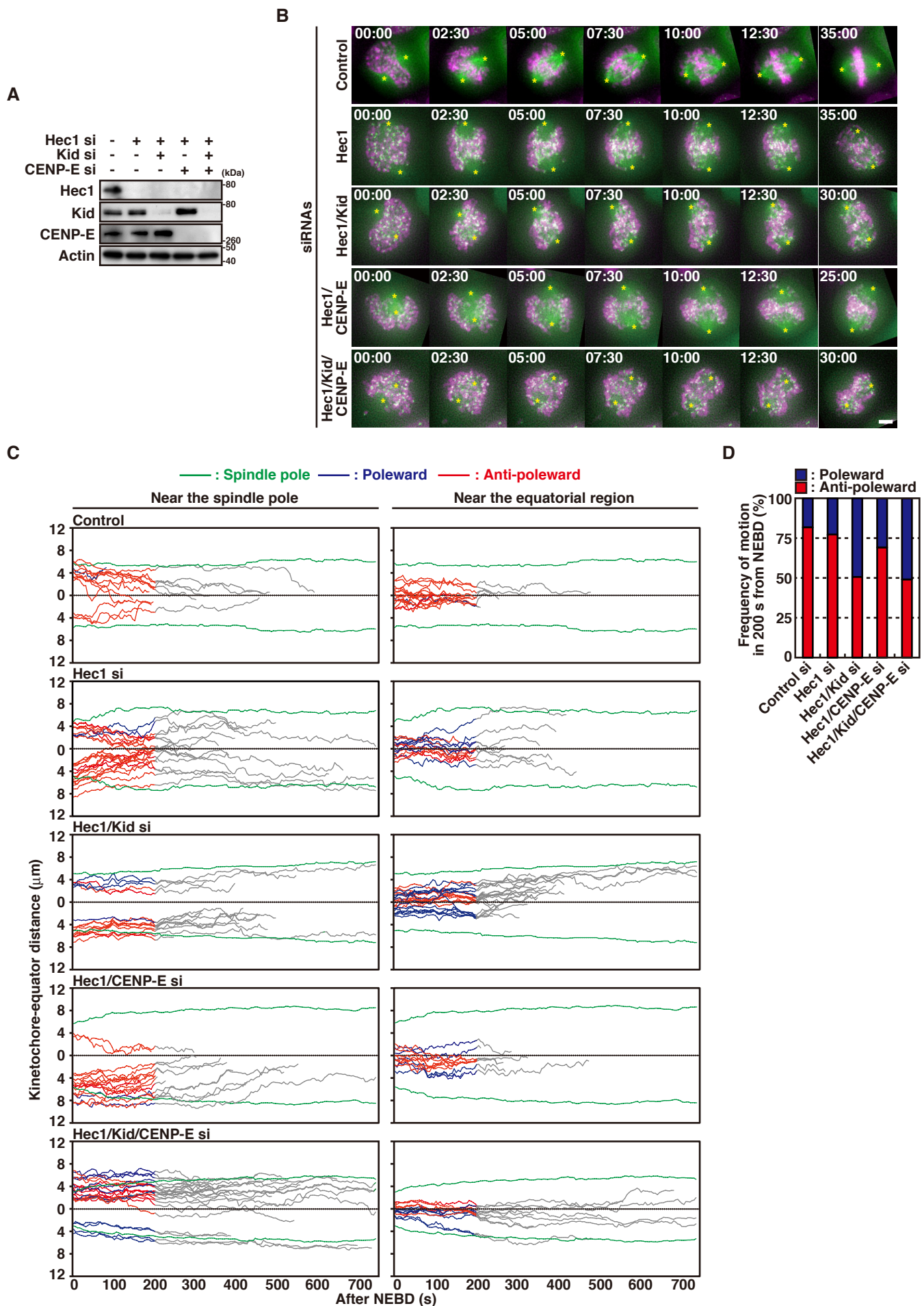


図 19. Hec1 発現抑制細胞における側面結合染色体の移動

(A) siRNA による Hec1、Kid 及び CENP-E の発現抑制効果。HeLa 細胞に図示した siRNA を処理し、分裂期に同調後、細胞可溶化液を得た。細胞可溶化液を SDS-PAGE によって分離し、図示したタンパク質の抗体を用いて検出した。(B) Hec1、Kid、CENP-E 発現抑制細胞の生細胞観察。H2B-mCherry、EGFP-CENP-A、EGFP- α -tubulin が恒常的に発現する HeLa 細胞を図示した siRNA で処理し核膜崩壊後 5 秒毎に生細胞観察した。極を黄アスタリスクで示し、左上に経過時間を示した。Bar = 5 μ m。(C) 分裂期前中期におけるキネトコア動態の軌跡。(B) において各 siRNA 処理につき 29 個以上の EGFP-CENP-A のドットを追跡した。EGFP- α -tubulin 像における紡錘体末端の軌跡を極の軌跡として緑線で示した。緑線の中点を通り、極を結ぶ直線に対する垂線を各時間における赤道面と定義した。赤道面から極までの距離を二分し、追跡開始時に EGFP-CENP-A のドットが位置していた場所によって場合分けした。追跡開始 200 秒までに赤道面に近づいた軌跡を赤線で示し、赤道面から離れた軌跡を青線で示した。追跡開始 200 秒以降の軌跡は灰色線で示した。(D) 染色体の移動方向の比率。(C) と同様にキネトコアを 10 細胞で追跡し、追跡開始から 200 秒までの移動方向の割合をグラフに示した。

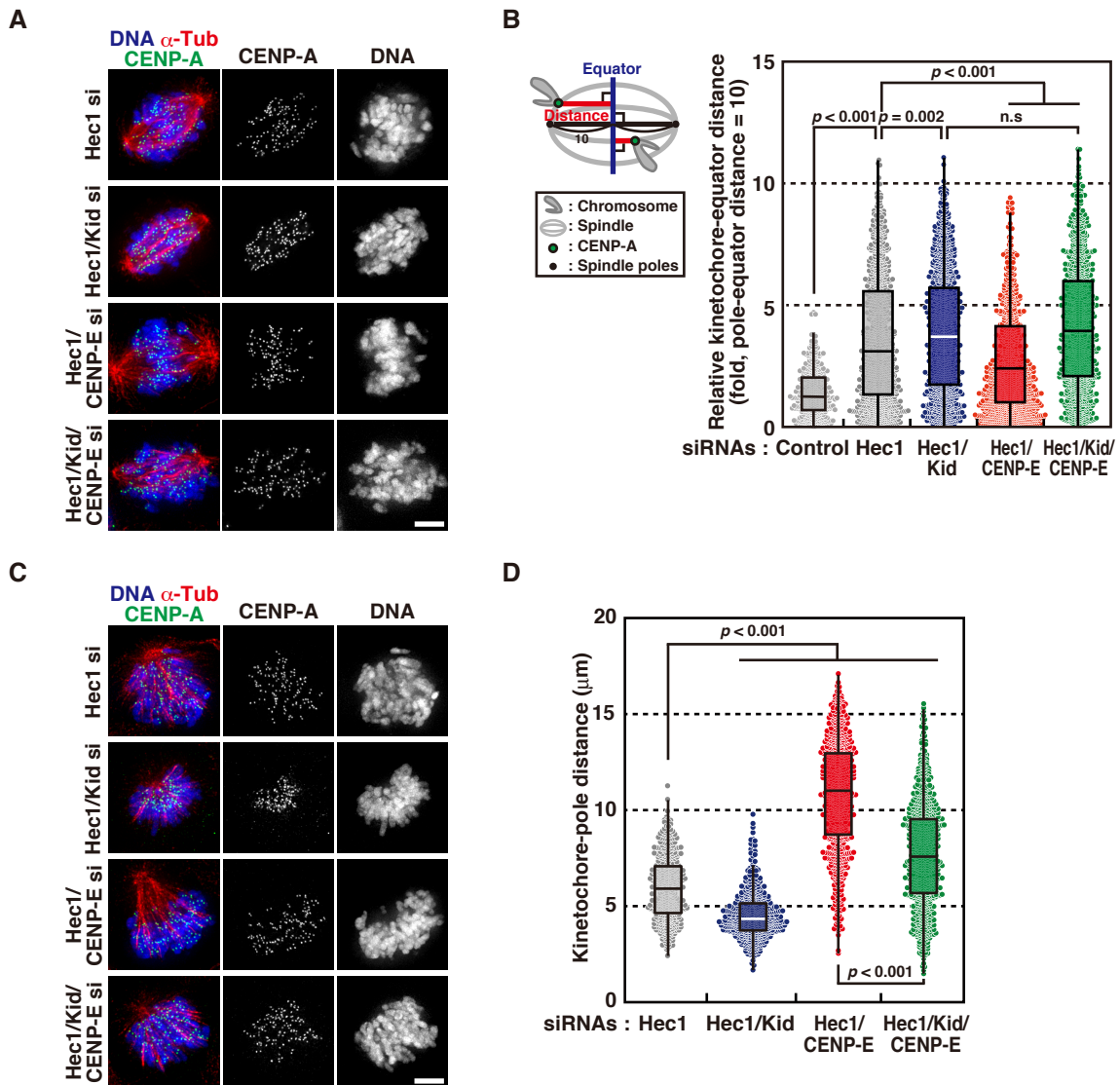


図 20. Hec1/Kid もしくは CENP-E 発現抑制細胞におけるキネトコアの分布

(A) Hec1/Kid もしくは CENP-E 発現抑制細胞の分裂期表現型。EGFP-CENP-A 恒常発現 HeLa 細胞を図示した siRNA にて処理し、 α -tubulin (赤)、EGFP (緑) 抗体によって染色した。DNA は DAPI (青) によって染色した。Bar = 5 μ m。(B) キネトコアから赤道面の相対距離。(A) と同様に処理した細胞において左模式図で示すようにキネトコア - 赤道面距離を計測し、図 6B と同様に箱ひげ図及びドットプロットで示した。各カラムにつき 10 細胞最低 952 キネトコア - 赤道面距離を計測した。p, Mann-Whitney U 検定。(C) 単協紡錘体における Hec1/Kid もしくは CENP-E 発現抑制細胞の表現型。EGFP-CENP-A が恒常的に発現する HeLa 細胞に図示した siRNA を処理し、チミジンリリース 9 時間後に 1 μ M Eg5 inhibitor III を 2 時間添加した。 α -tubulin (赤)、EGFP (緑) 抗体によって染色し、DNA は DAPI (青) によって染色した。Bar = 5 μ m。(D) キネトコアから極の距離。(C) と同様に処理した細胞においてキネトコア - 極距離を計測し、図 6B と同様に箱ひげ図及びドットプロットで示した。各カラムにつき 5 細胞最低 481 キネトコア - 赤道面距離を計測した。p, Mann-Whitney U 検定。

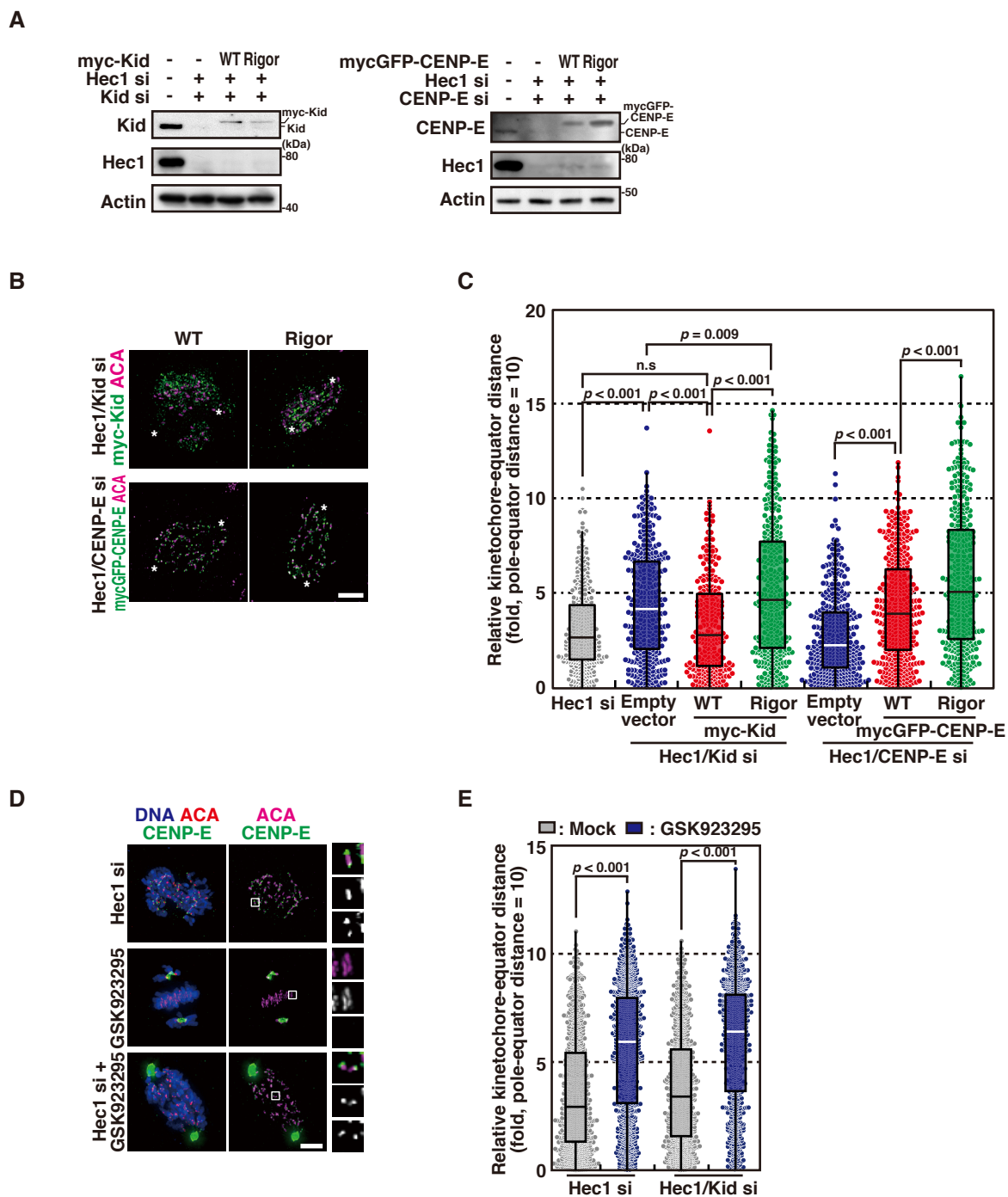
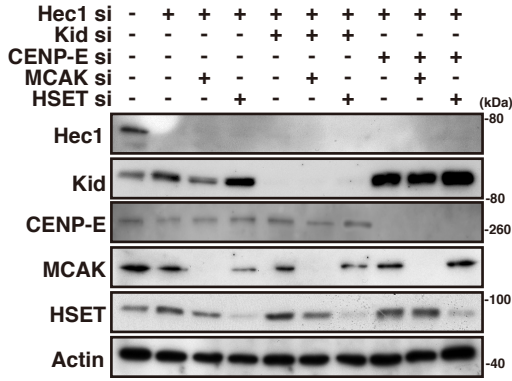


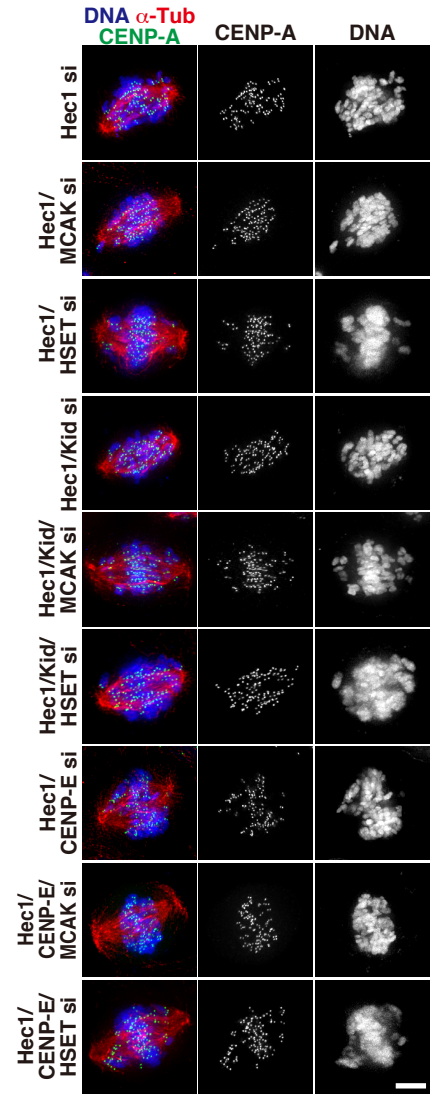
図 21. Hec1 発現抑制細胞のキネトコア分布における Kid 及び CENP-E モーター活性の役割

(A) Kid 及び CENP-E 各種変異体の発現確認。HeLa 細胞に Kid もしくは CENP-E の野生型 (WT) もしくはモーター不活性変異体 (Rigor) を過剰発現し、図示した siRNA で処理した。分裂期に同調後、細胞可溶化液を得た。細胞可溶化液を SDS-PAGE によって分離し、図示したタンパク質の抗体を用いて検出した。(B) Kid 及び CENP-E 発現細胞の Hec1 発現抑制細胞における分裂期表現型。Kid もしくは CENP-E の野生型 (WT) もしくはモーター不活性変異体 (Rigor) を過剰発現した HeLa 細胞を図示した siRNA にて処理し、ACA (赤)、myc もしくは EGFP (緑)、 α -tubulin 抗体によって染色した。極の位置を白アスタリスクで示した。Bar = 5 μ m。(C) キネトコアから赤道面の相対距離。(B) と同様に処理した細胞において図 20B と同様にキネトコア - 赤道面距離を計測し、図 6B と同様に箱ひげ図及びドットプロットで示した。各カラムにつき 5 細胞最低 271 キネトコア - 赤道面距離を計測した。p, Mann-Whitney U 検定。(D) GSK923295 処理における CENP-E の局在。HeLa 細胞に図示した siRNA を処理し、チミジンリリース 9 時間後に 200 nM GSK923295 を 2 時間添加した。ACA (赤)、CENP-E (緑) 抗体によって染色し、DNA は DAPI (青) によって染色した。Bar = 5 μ m。(E) GSK923295 処理細胞におけるキネトコアから赤道面の相対距離。(D) と同様に処理した細胞において図 20B と同様にキネトコア - 赤道面距離を計測し、図 6B と同様に箱ひげ図及びドットプロットで示した。各カラムにつき 10 細胞最低 951 キネトコア - 赤道面距離を計測した。p, Mann-Whitney U 検定。

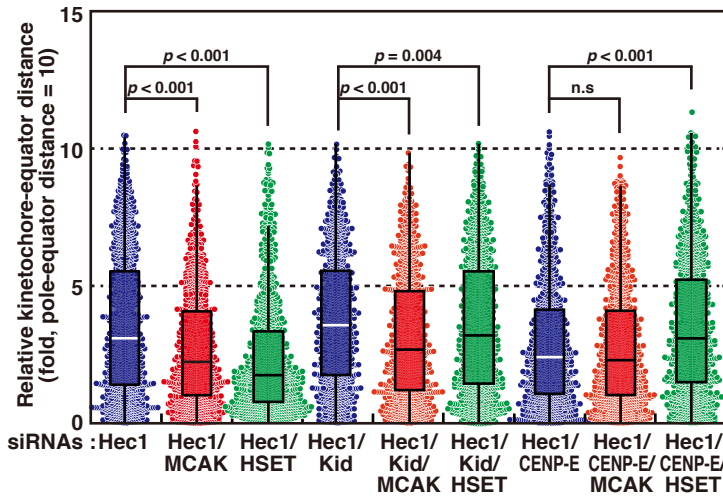
A



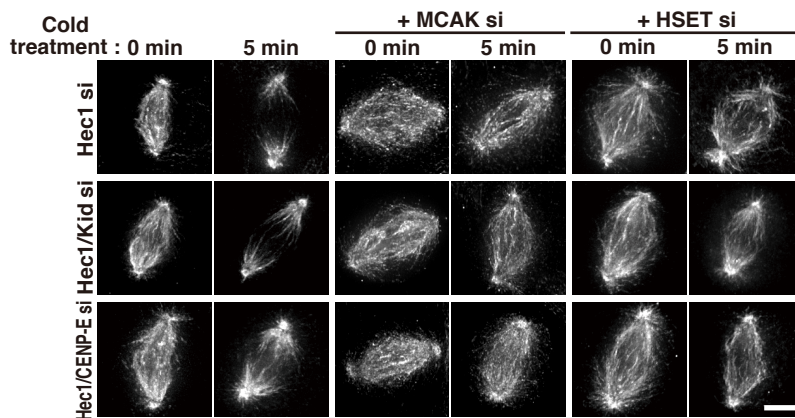
B



C



D



E

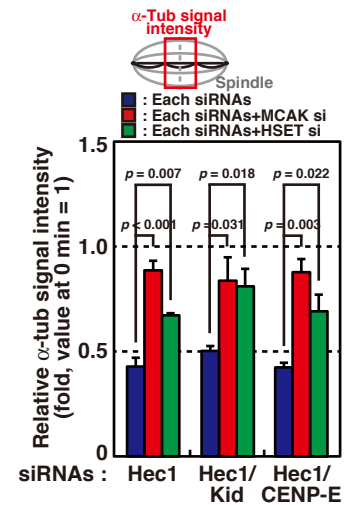


図 22. Hec1 発現抑制細胞における微小管の安定化は CENP-E による染色体の移動を促進させる

(A) siRNA 処理による各タンパク質の発現抑制効果。HeLa 細胞を図示した siRNA で処理し、分裂期に同調後、細胞可溶化液を得た。細胞可溶化液を SDS-PAGE によって分離し、図示したタンパク質の抗体を用いて検出した。(B) Hec1/Kid, CENP-E, MCAK, HSET 発現細胞の分裂期表現型。EGFP-CENP-A 恒常発現 HeLa 細胞を図示した siRNA にて処理し、 α -tubulin (赤)、EGFP (緑) 抗体によって染色した。DNA は DAPI (青) によって染色した。Bar = 5 μ m。(C) キネトコアから赤道面の相対距離。(B) と同様に処理した細胞において図 20B と同様にキネトコア - 赤道面距離を計測し、図 6B と同様に箱ひげ図及びドットプロットで示した。各カラムにつき 10 細胞最低 1019 キネトコア - 赤道面距離を計測した。p, Mann-Whitney U 検定。(D) Hec1/Kid, CENP-E, MCAK, HSET 発現抑制細胞における紡錘体形態。分裂期 HeLa 細胞を図示した siRNA で処理し、0 分及び 5 分間氷上に静置した後、 α -tubulin 抗体で染色した。Bar = 5 μ m。(E) 紡錘体中央部における微小管蛍光強度の定量。(D) と同様に処理した細胞において紡錘体を 3 等分した中央領域における α -tubulin 蛍光強度を定量しグラフに示した。独立した実験を 3 回行い、標準偏差をエラーバーで示した。p, Student' s t- 検定。

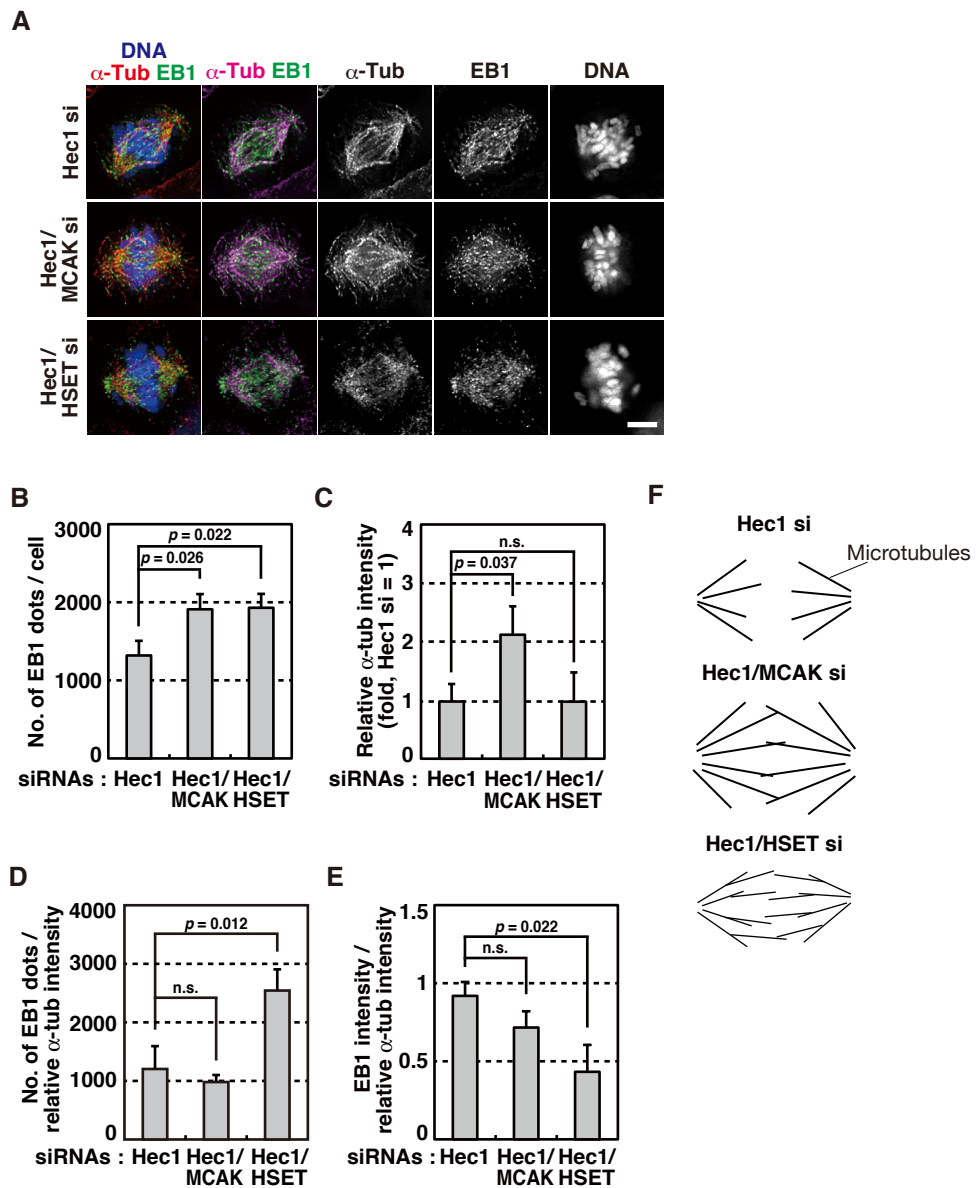


図 23. Hec1/MCAK, HSET 発現抑制細胞における紡錘体微小管の形態

(A) Hec1/MCAK, HSET 発現抑制細胞における EB1 の分布。HeLa 細胞を図示した siRNA にて処理し、 α -tubulin (赤)、EB1 (緑) 抗体によって染色した。DNA は DAPI (青) によって染色した。単一の Z 軸像のみを示した。Bar = 5 μ m。 (B) 細胞あたりの EB1 ドット数。一細胞における EB1 の平均数をグラフに示した。 (C) 細胞あたりの微小管量。一細胞における α -tubulin の蛍光強度をグラフに示した。 (D, E) EB1 ドット数 (D) 及び EB1 の蛍光強度 (E) を α -tubulin の蛍光強度で標準化した。 (B-E) 独立した実験を 3 回行い、標準偏差をエラーバーで示した。p, Student' s t- 検定。 (F) 各 siRNA 処理による紡錘体微小管の模式図。

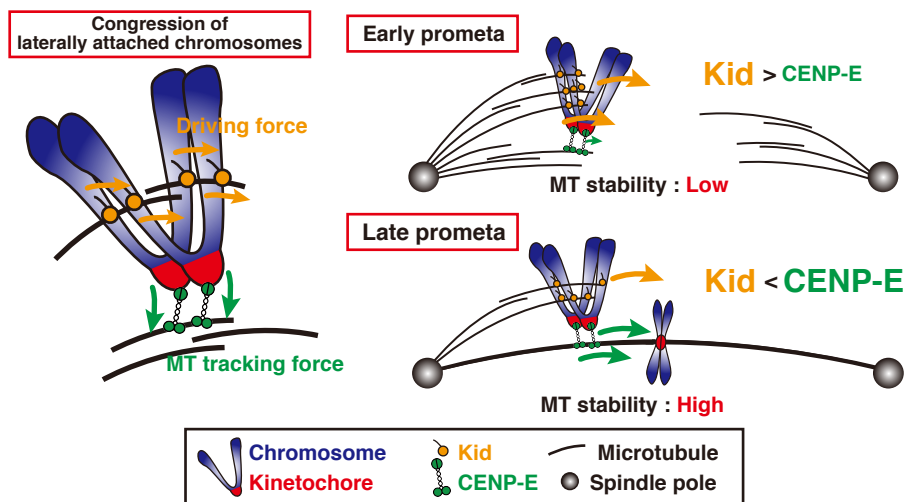


図 24. 側面結合染色体の赤道面への移動における本研究結果のモデル図

左模式図：Hec1 発現抑制によって生じた側面結合染色体は Kid によって赤道面へ運ばれる（橙矢印）。CENP-E は微小管結合能によって Kid 依存的な赤道面の移動に対する抵抗となる（緑矢印）。右模式図上：紡錘体微小管が不安定な分裂期前中期初期、側面結合染色体は Kid によって赤道面へ運ばれ、この移動における CENP-E の寄与度は低い。右模式図下：紡錘体微小管が徐々に安定化する分裂期前中期後期、CENP-E は微小管の安定化に依存して運動能を獲得し染色体整列に寄与する。

謝辞

本研究を進めるにあたり、研究を行う機会を与えていただき、またいつも温かいご指導とご理解を頂きました東京大学医科学研究所癌細胞シグナル分野の山本雅教授（現：沖縄科学技術大学院大学）、大杉美穂准教授（現：東京大学総合文化研究科）、東北大学加齢医学研究所分子腫瘍学研究分野の田中耕三教授に心より感謝いたします。また、固相リン酸化法により AMPK γ を含め Pik1 の基質候補分子を網羅的に同定された同分野の東京大学医科学研究所癌細胞シグナル分野の押森直木博士（現：ロックフェラー大学）には、実験手技を始めご討議・ご助言を頂きました。心より感謝いたします。同分野の西住紀子博士、井上玄志博士、宮崎絹代氏、吉開清人氏、東北大学加齢医学研究所分子腫瘍学研究分野の原田葵氏には常日頃よりご助言とご支援を頂きました。心より感謝いたします。

研究推進のためにさまざまな材料を供与して頂きました。Anti-centromere antigen は順天堂大学の高崎芳成教授より、anti-pericentrin, anti-CG-NAP は神戸大学の小野功貴教授、帝京平成大学の高橋美樹子教授より、EGFP-CENP-E 各種変異発現プラスミドは Ludwig Institute for Cancer Research の Don W. Cleveland 博士よりご供与頂きました。心より感謝いたします。さらに、anti-phospho CENP-A、EGFP-histone H2B、EGFP-CENP-A、EGFP-tubulin 恒常発現 HeLa 細胞株を供与していただくと共に、研究についてご討議・ご助言を賜りました癌研究所の広田亨博士に心より感謝いたします。また、本論文に実験データを載せることはできませんでしたが、AMPK γ 結合タンパク質の質量分析を行なって頂いた同研究所の大海忍博士、AMPK 複合体解析のためにゲル濾過クロマトグラフィーを行なって下さいました味の素株式会社アミノサイエンス研究所の江島大輔博士に心より感謝いたします。

本研究の一部は独立行政法人日本学術振興会特別研究員制度によりサポートして頂きました。心より感謝いたします。

最後に、長い大学院生活を温かい目で見守ってくれた両親、そして、私生活において全ての面でサポートしてくれた妻と娘（家村絵里氏、杏里氏）に深く感謝いたします。