

## 論文の内容の要旨

論文題目

### 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)

氏名：家村 顕自

分裂期は DNA 複製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引き起こし、染色体の不安定性や異数性につながる。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、数多くの先天性疾患の原因として報告されている。このことから、娘細胞に染色体を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。

染色体の均等分配には、まず全ての染色体が赤道面に整列する必要がある。核膜崩壊後、二極間の中央領域に存在する染色体は、キネトコアがそれぞれの極から伸びる微小管の側面に結合することで（側面結合）赤道面へ向かって移動する。どちらか片方の極に近い場所に位置する染色体のキネトコアは、一極から伸びる微小管に結合する。このとき、キネトコアと微小管の結合は単極紡錘体結合を確立しやすく、まず極へと移動することが多い。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。このうち、シンテリック結合は速やかにモノテリック結合に修正され、モノテリック結合となった染色体が既に形成されたキネトコア微小管に沿って赤道面に運ばれる。赤道面に近づいた染色体は姉妹キネトコアとそれぞれの極から伸びる微小管末端が結合（末端結合）し、二極紡錘体結合を形成することで赤道面へ整列する。このように、染色体の整列は多段階の制御を受けて成されるが、各段階に関する分子機構は不明な点が多い。

一方、染色体の均等分配は、紡錘体極となる中心体の制御によっても調節されている。

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 個存在し、分裂期では二極性の紡錘体極を形成する。一方で、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）が観察されており、中心体数異常は多極紡錘体形成を促し、染色体不均等分配を引き起こす。また、最近の研究から二極性の紡錘体形成には、中心体”数”の調節だけでなく、分裂期における染色体整列に際した染色体運動によって紡錘体から紡錘体極にかかる力に対抗し中心体構造を安定化させる中心体の”質”の調節が存在することが示唆されている。

本論文第一部・第二部での研究対象、AMP-activated protein kinase (AMPK)  $\gamma$  は、当研究室で行われた分裂期キナーゼ Polo-like kinase 1 (Plk1) 基質分子の網羅的な探索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  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の三種類のサブユニットからなるヘテロ 3 量体を形成して機能している。 $\alpha$  サブユニットにキナーゼ活性を持ち、 $\beta$ 、 $\gamma$  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。これまで、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、細胞老化などを調節していることが報告されているが、AMPK の分裂期における機能は不明な点が多く、特に AMPK $\gamma$  の分裂期への関与は全く未知であった。本論文では、AMPK $\gamma$  の発現抑制による AMPK $\gamma$  の分裂期における機能解析結果と、AMPK $\gamma$  発現抑制細胞の解析から得られた紡錘体形成における二極性の維持機構について二部構成で報告する。加えて、染色体整列過程の初期に引き起こされる現象として近年新たに発見された側面結合染色体の赤道面への移動について、染色体動態に関わる 2 種類のモーター分子 Kinesin-7/CENP-E と Kinesin-10/Kid に着目し、その調節機構の一端を明らかにしたため第三部で報告する。

第一部、まず初めに HeLa 細胞において AMPK $\gamma$  を siRNA で発現抑制し、免疫染色によって分裂期表現型を観察した。その結果、分裂期における後期細胞の割合が減少し、30%以上の細胞が染色体整列異常を示しており（図 1）、AMPK $\gamma$  が染色体整列に関与する分子であることが示唆された。一方、AMPK $\alpha$ 、 $\beta$  の発現抑

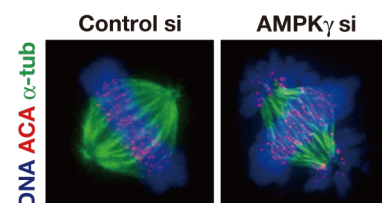


図 1. AMPK $\gamma$  発現抑制細胞の分裂期表現型  
siRNA 処理した分裂期 HeLa 細胞を免疫染色し、キネトコア（赤）、紡錘体（緑）、染色体（青）で示した。

では、染色体整列異常や分裂期後期細胞の減少は見られず、また、分裂期では AMPK $\alpha$ 、 $\beta$  のタンパク質量が低く保たれていることを見出した。このことから、分裂期における AMPK $\gamma$  が AMPK 活性や複合体非依存的に機能する可能性が示唆された。次に、AMPK $\gamma$  発現抑制細胞における染色体整列異常をより詳細に解析するため、生細胞観察を行った。分裂期前期から中期にかけての染色体の動きを追跡したところ、分裂期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た一方、将来的な赤道面から離れた箇所に位置する、即ち、核膜崩壊時に染色体領域の端に位置していた染色体は赤道面へ移動できず、赤道面から離れた極周辺で停滞することが分かった。次に、AMPK $\gamma$  発現抑制細胞における不整列な染色体のキネトコア-微小管結合状態を確認したところ、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。キネトコアと微小管を可視化した HeLa 細胞を用いてキネトコア-微小管結合の動的変化を観察した結果、シンテリック結合修正が引き起こされていないことが分かった。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分裂期キナーゼ Aurora B の活性によって修正されるが、AMPK $\gamma$  発現抑制細胞におけるセントロメア領域の Aurora B 活性に変化はなかった。以上の結果から、AMPK $\gamma$  は Aurora B の下流もしくは異なる経路でシンテリック結合修正をモノテリック結合に修正し、染色体を赤道面に整列させる機能を担う分子であることが明らかとなった (図 2)。

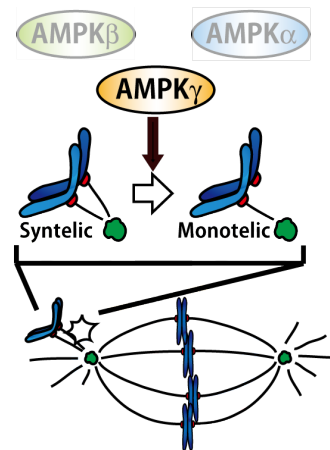


図 2. 第一部の概要図  
AMPK $\gamma$  はシンテリック結合修正に関与する。

第二部、第一部において AMPK $\gamma$  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、この表現型の他に、紡錘体極が断片化する表現型を見出した。AMPK $\gamma$  発現抑制細胞の中心体構成タンパク質を免疫染色したところ、紡錘体極の断片化は中心体辺縁部質 (PCM) の断片化により引き起こされていることが分かった (図 3)。また、より多くの不整列な染色体を持つ極の PCM が顕著に断片化していた。そこで、AMPK $\gamma$  発現抑制細胞における PCM の断

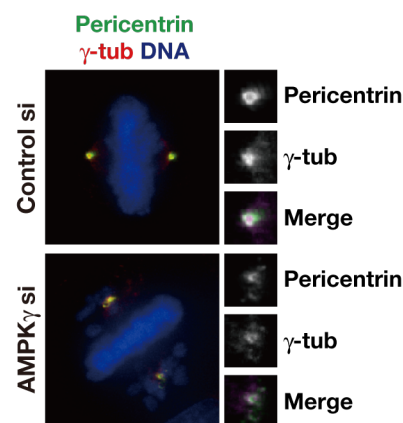


図 3. AMPK $\gamma$  発現抑制による PCM の断片化  
siRNA 処理した分裂期 HeLa 細胞を免疫染色し、PCM 構成分子 ( $\gamma$ -tubulin, 赤、pericentrin, 緑)、染色体 (青) で示した。

片化と不整列な染色体の発生との因果関係について検討した。紡錘体の張力によって生じる紡錘体極にかかる力に対抗して分裂期 PCM を安定化する機能をもつ Kizuna (Kiz) を発現抑制し、PCM の断片化を促進させた細胞における染色体整列を観察したところ、紡錘体極の断片化が引き起こされているにも関わらず、不整列な染色体は見られなかった。この結果から、AMPK $\gamma$  発現抑制細胞における PCM の断片化は不整列な染色体に依存して引き起こされることが示唆された。次に、キネトコア-微小管結合修正異常を引き起こす Aurora B 阻害剤を処理したところ、分裂期における多極紡錘体形成細胞の割合が亢進した。Aurora B による多極紡錘体形成の亢進は、微小管の張力を抑制する低濃度ノコダゾール処理で抑制

できた。また、Kiz を AMPK $\gamma$  発現抑制細胞に過剰発現したところ、PCM の断片化が抑制された。これらの結果から、キネトコア-微小管結合修正異常に伴う紡錘体の過剰な張力が、紡錘体極に対して過剰な力を生み出し、分裂期における紡錘体極構造を不安定化することが示唆された。(図 4)。

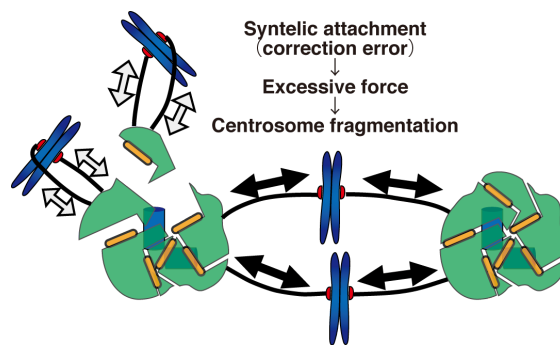


図 4. 第二部の概要図  
キネトコア-微小管結合修正異常は紡錘体極へ過剰な力を生み出し、PCM の断片化を引き起こす。

第三部、AMPK $\gamma$  発現抑制細胞の大半の染

色体は赤道面に整列していることから、染色体整列を制御する本質的な制御機構はキネトコア-微小管修正以前に存在する可能性を考え、分裂期初期に生じる側面結合染色体の移動機構に着目した。微小管末端とキネトコアの結合（末端結合）を抑制するため、末端結合に必要な Hec1 と呼ばれる分子を発現抑制し、同時に Kid もしくは CENP-E を発現抑制した。生細胞観察における染色体動態及び固定細胞におけるキネトコアの分布を詳細に解析したところ、Kid が側面結合染色体の赤道面への移動に寄与していることを見出した (図 5, Hec1/Kid si)。一方、CENP-E は染色体を赤道面へ運び、染色体整列に必須の分子として知られているが、Hec1 発現抑制下においては Kid による側面結合染色体の赤道面への移動を抑制した (図 5, Hec1/CENP-E si)。Hec1 発現抑制細胞は末端結合が形成できないため、分裂期において紡錘体を形成する微小管の安定性が著しく低下する。そこで、CENP-E の機能が Hec1 発現の有無によって変化するのは、この微小管の安定性に起因するのではと考え、微小管脱重活性もしくは微小管を束ねる活性をもつ Kinesin-13/MCAK もしくは Kinesin-14/HSET を更に同時に発現抑制し、キネトコアの分布を検証した。その結果、CENP-E は微小管の安定性依存的に染色体整列に寄与することが見出された。

以上の結果から、側面結合が多く微小管の安定性が低い分裂期初期には Kid が主に染色体を赤道面へと運び、分裂期進行とともに末端結合が形成されはじめ微小管が安定化すると CENP-E が染色体運搬に寄与するという 2 種類のモーター分子が協調的に働くことによって染色体が整列する新たなモデルが示唆された (図 6)。

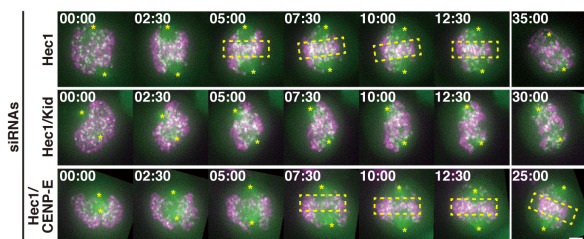


図 5. 側面結合染色体の赤道面への移動  
微小管/キネトコア (緑)、染色体 (マゼンタ) を可視化した細胞における生細胞観察結果。黄色アスタリスクは紡錘体極の位置を示し、明確に判別可能な赤道面を黄色点線で囲んだ。

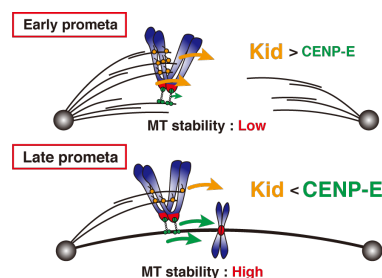


図 6. 第三部のモデル図  
分裂期初期には Kid が染色体の赤道面への移動に寄与し、分裂期進行とともに微小管が安定化することで CENP-E が寄与する。