

## 214. M期キナーゼによる動原体のホメオスタティック制御

広田 亨

がん研究会 がん研究所 実験病理部

**Key words** : 染色体分配, 微小管結合, M期チェックポイント, 動原体ストレッチング, フォスファターゼ

### 緒言

セントロメアは、細胞分裂において染色体動態の制御中枢を担う特殊な染色体ドメインであり、微小管と相互作用をするための「動原体」が形成される。動原体は、複数のタンパク質複合体から構成される超分子複合体であり、それらの相互作用ネットワークによって、安定性を備えたホメオスタティックな制御がなされていることが知られている。

特に、微小管との結合を担う NDC80 複合体、M 期チェックポイントシグナルの発信に関わる KNL1 複合体、これらの複合体を動原体の基盤構造 CCAN (Constitutive Centromere Associating Network) とを介する MIS12 複合体は、「KMN ネットワーク」と称される、複数の動原体機能を統合するシステムを形成している [1]。つまり、動原体の心臓部にあたるこのシステムのはたらきが、染色体動態制御を支えていると捉えられるが、複数の機能がいかに統合されるのか、そのメカニズムはよくわかっていない。

我々は先行研究で、分子イメージング法を用いて、動原体は一定の形をとるのではなく、微小管と結合することによって、伸張と収縮を繰り返す極めてダイナミックな構造体であることを見出した [2]。その後、この「染色体ストレッチング」と呼ぶこの現象に着目し、セントロメアの動的な構造変化の分子機構とその生物学的意義の解明を進めたところ、動原体のストレッチングは、微小管結合と M 期チェックポイントシグナルの発信制御を連動する運動であることが明らかになってきた。また、微小管結合や M 期チェックポイントは、「M 期キナーゼ」と総称されるリン酸化酵素が複雑に相互作用しながら制御していることが示唆されていた [3]。そこで本研究では、動原体ストレッチング現象において、M 期キナーゼがどのように関与するのかを明らかにすることによって、動原体が微小管結合と M 期チェックポイントシグナルの発信を統合的に制御するメカニズムを解明することを目的とした。

本研究によって、動原体が微小管と末端結合という安定した結合を達成すると、動原体ストレッチング現象が生じて、これによって M 期チェックポイントの解除が促進されて染色体分配を導くことがわかった。換言すると、動原体ストレッチングは、微小管結合制御とチェックポイント制御の順序を保証する動原体機能を統合するメカニズムと捉えられ、その核心は「チェックポイント分子の動態に関わる KNL1 複合体のリン酸化制御」にあることが示唆された。さらに、本研究によって、この動原体の制御機構の変化が、多くのがん細胞が陥っている染色体不安定性に寄与することが判明し、病理学的な観点からも重要なメカニズムであることも注目に値する [4]。

### 方法

#### 1. 動原体ストレッチングの発生機序に基づき、同現象を操作可能な細胞を作製した

変異体解析により動原体ストレッチングの発生には、CCAN を構成する CENP-T の長大な天然変性領域が関与する可能性が考えられた。つまり、この可変ドメインが動原体の内層と外層を繋留し、微小管の重合・脱重合によって動原体も伸張・収縮をすることが予測された (図 1)。これに基づき、ラパマイシン誘導性の FEBP-FRB 結合を利用して CENP-T の可変性を阻害し、動原体ストレッチングを人為的に操作する実験系を作り出した。動原体ストレッチングの解析は先行実験に従って実施した [2]。

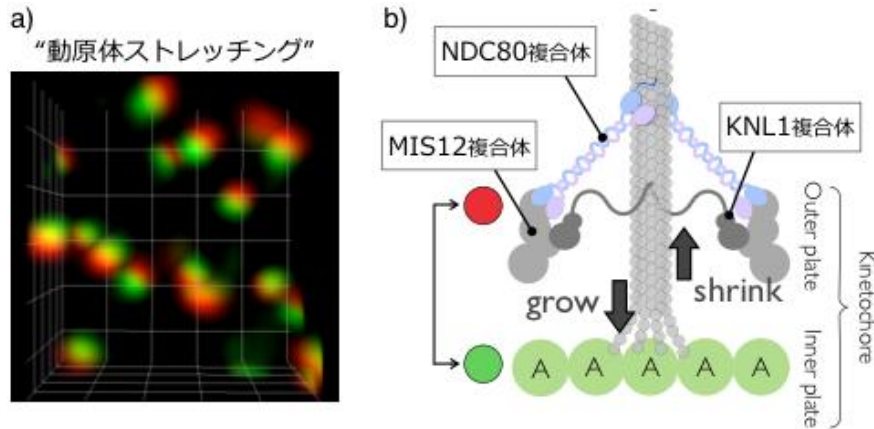


図1. 動原体ストレッチングの発生機序

- a) 動原体の内層と外層をそれぞれ緑色と赤色蛍光タンパク質で標識した。緑と赤の間の距離が変動する現象が「動原体ストレッチング」とよばれる(グリッド:  $2\mu\text{m}$ )。
- b) 動原体ストレッチングは外層の複合体群が結合している微小管の先端が重合・脱重合することで内層を押し戻したり戻したりすることで発生すると考えられる。

## 2. 動原体ストレッチングを抑制した細胞の染色体動態を、ライブイメージングにより解析した

1で作製した細胞を用いて、染色体をHoechst33342染色で可視化し、ラパマイシン添加によって動原体ストレッチングを抑制後、M期進行と動原体動態を観察した。ライブイメージングはオリンパス倒立型顕微鏡IX-71でタイムラプス画像を取得し、デルタビジョンによる3Dデコンボリューション処理を行って解析した。

## 3. 動原体ストレッチングと微小管結合、及びM期チェックポイントとの関連を解析した

動原体ストレッチングは核膜崩壊前には見られず、前中期より観察され、中期にはその頻度が最大となることが観察されたので、微小管結合が「側面結合」では起こらずに、それが「末端結合」に変換されると起こると予測された。このNDC80複合体を不活性化することで検証した。

M期チェックポイントとの関連を検討するために、チェックポイント分子Mad1、Mad2、BubR1の動原体局在を免疫細胞染色法で解析した。これらの局在は微小管の結合状態に影響を受けるため、動原体と微小管との結合が明瞭に観察できる単極紡錘体において、ストレッチングの抑制効果を評価した。

## 4. M期チェックポイント制御の分子機構について、M期キナーゼが関連する制御を基軸に検討した

3の解析で動原体ストレッチングの抑制によりチェックポイント分子が有意に動原体に局在したので、チェックポイント分子の動態に関わるKNL1複合体のリン酸化修飾が変化していると予測され、それに関連するM期キナーゼ、及びフォスファターゼの局在を解析した。

## 5. M期チェックポイント解除の遅延による染色体分配の影響を解析した

2と同様にライブイメージング解析を用いて、正常二倍体細胞において動原体ストレッチングを抑制してM期チェックポイントの解除遅延を誘導し、その後の染色体動態異常を観察した。その原因を探索するためにセパレースのはたらきを検討した。

## 6. がん細胞における染色体不安定性とM期チェックポイント制御機構の変化を検討した

さまざまなタイプのがん細胞について、ライブイメージング解析による染色体不安定性の程度、M期の進行動態解析を行い、これと動原体ストレッチングの定量解析、KNL1複合体のリン酸化制御の解析を組み合わせた。これによって染色体不安定性という細胞病態にM期キナーゼの動原体制御の意義を明らかにした。

## 結果

### 1. 動原体ストレッチングによる分裂期進行の促進

動原体ストレッチングを抑えると、分裂前中期の進行は変化がないにもかかわらず、分裂中期が延長した。このことから、ストレッチングは、微小管結合の制御には影響がないが、結合後の M 期チェックポイントの解除プロセスに参与することが示唆された (図 2)。

### 2. 動原体ストレッチングによるM期チェックポイントの解除の促進

図 2 で動原体ストレッチを抑制した細胞では、通常中期で激減～消失するチェックポイント分子群 Mad1、Mad2、BubR1 が、有意に動原体に残存することを見出した。単極紡錘体細胞の検討により、動原体ストレッチングが抑えられていると微小管が末端結合した後もチェックポイント分子群が動原体に認められた。つまり M 期チェックポイントは動原体が末端結合となって初めて誘導されるのだが、この仕組みがあるゆえに、微小管結合制御とチェックポイント制御の順序が保証されていると理解された。

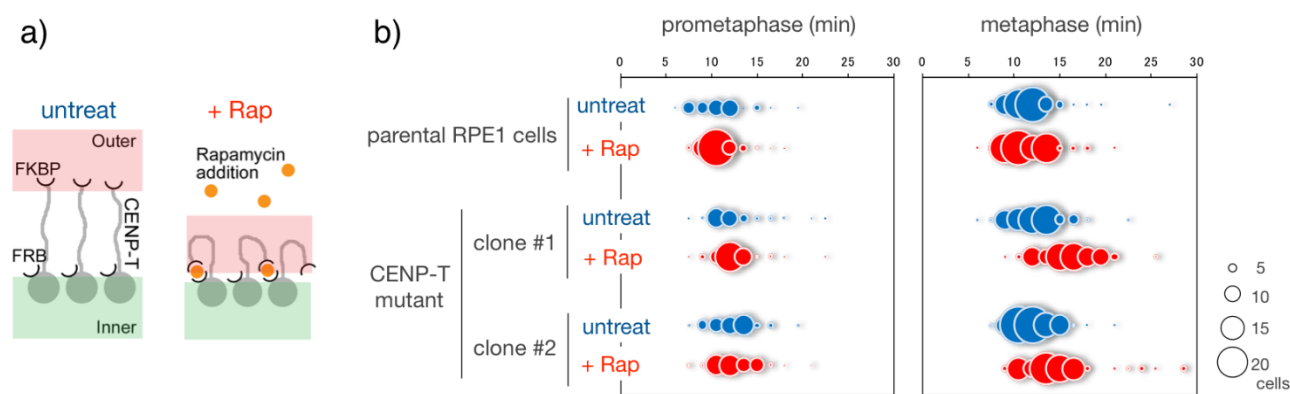


図 2. 動原体ストレッチングの制御と M 期の進行

- ラパマイシン (Rap) によって CENP-T の両端に融合した FKBP と FRB が特異的に会合するため、CENP-T の伸長が妨げられ動原体ストレッチングが抑制される。
- CENP-T の両端に FKBP と FRB を発現する RPE-1 細胞 (CENP-T mutant 細胞) の 2 クローンと、野生型 RPE-1 細胞、ラパマイシン処理あり (赤) なし (青)、についてライブイメージング解析を行った。CENP-T mutant 細胞にラパマイシンを添加すると中期 metaphase の所要時間が伸びたが、前中期 prometaphase は影響なし。

### 3. 動原体ストレッチングによるM期チェックポイントの解除

チェックポイント分子群は Mps1 キナーゼによってリン酸化された KNL1 複合体に結合し、動原体より Mps1 が消失するとそれらも消失すると考えられていた。しかし、動原体ストレッチングを抑制しても、Mps1 キナーゼは通常どおり消失していた。このことは、動原体ストレッチングは Mps1 の減弱に依存することなくチェックポイントの解除を促進すると示唆したが、実際に Mps1 阻害後に後期が誘導されるまでの時間はストレッチング阻害により延長した。

そこでチェックポイント分子群が残存していた理由として、Mps1 キナーゼと拮抗する PP1 フォスファターゼの関与を検討したところ、ストレッチングを抑制すると動原体にリクルートされる PP1 が減少することを見出した。つまり、動原体ストレッチングは、キナーゼとフォスファターゼのバランスを逆転させることでチェックポイントの解除を促進すると考えられた。即ち、動原体ストレッチングは PP1 のリクルートを促進し、その結果として、チェックポイント分子群を動原体から引き離すことでチェックポイントを解除していることが明らかとなった。

#### 4. M期チェックポイント解除遅延による染色体分配エラーの誘導

正常二倍体細胞において動原体ストレッチングを抑制して M 期チェックポイントの解除遅延を誘導すると、姉妹染色体の不分離を意味する DNA ブリッジを後期に多発した。その原因として、コヒーシンの除去不全が原因で DNA ブリッジの形成に至っていたことが考えられた。この可能性を検討するために、染色体上のコヒーシンを減じたところ、期待通り DNA ブリッジの発生頻度が低下した。

したがって、M 期チェックポイントの速やかな解除は、その後に姉妹染色分体を結合しているコヒーシンを完全に除去するためのセパレーズの活性化に重要であると考えられた。

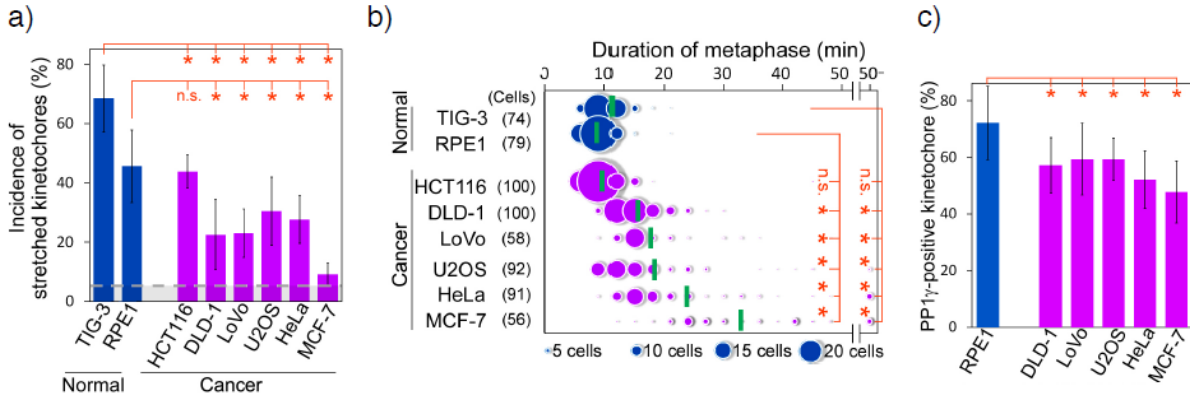


図 3. がん細胞の染色体不安定性に関与する動原体ストレッチング

- 正常二倍体細胞（青）と染色体不安定性を示す種々のがん細胞（紫）における動原体ストレッチングの頻度。がん細胞では頻度が有意に低下している。
  - a) で解析した細胞について中期の所要時間の比較。
  - 中期の動原体における PP1 $\gamma$  の陽性率。
- いずれも統計学的有意差は Dunnett's test により検討した。\*P<0.05。

#### 5. がん細胞の染色体不安定性の原因としての動原体ストレッチングの異常

さまざまな臓器由来のがん細胞を解析し、高い染色体不安定性をもつ細胞株では、動原体ストレッチングの頻度が低いという相関があった。またこれらのがん細胞株では、上記実験結果に沿うように、ストレッチング頻度の程度と、中期の所要時間との間に高い相関関係があり、中期におけるフォスファターゼ PP1 の動原体局在が低下していることが半明した (図 3)。これらの結果より、がん細胞の染色体不安定性に、動原体ストレッチングの異常が重要な位置づけにあると考えられた。

### 考 察

#### 1. 動原体ストレッチングによる M 期チェックポイント解除機構について

本研究によって、動原体はストレッチング現象によって、微小管結合制御とチェックポイント制御を統合していること、そしてその核心は「チェックポイント分子の動態に関わる KNL1 複合体が PP1 をリクルートすること」であることが示唆された。PP1 のリクルートは、KNL1 上の SSILK と RVSF モチーフに起こるが、これらのモチーフは Aurora B キナーゼによるリン酸化を受けると PP1 との結合能を失うことが知られている [5]。さらに、このモチーフのリン酸化に拮抗するフォスファターゼ PP2A-B56 もまた KNL1 上に控えている。つまり、チェックポイント KNL1 複合体には、複数の M 期キナーゼとフォスファターゼの相互作用による制御システムが存在し、そこに動原体ストレッチングという運動が関わっているのは興味深い。実際に、予備的な観察で、ストレッチングによって KNL1 も伸縮することが見出されており [4]、伸縮によってキナーゼ・フォスファターゼのバランスが調節されている可能性が浮上している。

## 2. 動原体の制御異常と染色体不安定性について

M期チェックポイントは、正確な染色体分配に不可欠な機能であることから、その欠陥ががん細胞で生じ、それゆえに染色体不安定性を導くと考えられてきた。一方で、多くのがん細胞ではチェックポイントは正常に作動することの実験結果があり未解決の課題となっていた [6]。これに対して、本研究は「M期チェックポイントの解除過程の異常」という解答を与え、染色体不安定性の成因を刷新したと言える。

本研究に続いて、M期チェックポイント解除の遅延によって中期が延長すると、染色体分離の実行プロテアーゼ・セパレーズの活性化が影響されることを見出した [7]。セパレーズは、本来、後期の開始時に急速に活性化してピークを迎えるが、M期チェックポイント解除が遅延すると、解除が完了しない状態でセパレーズが活性化し始めてしまい、その結果、コヒージンを完全に除去するために必要な活性化が得られない。いわばブレーキがかかった状態でアクセルを踏んでいるような状態であるが、なぜ、セパレーズ活性制御が破綻するのかは次の課題である。

### 共同研究者・謝辞

本研究は、がん研究会がん研究所実験病理部の内田和彦、趙民知、長坂浩太、高橋元子の諸氏の協力を得て実施した。また共同研究者としてご尽力くださった大阪大学大学院生命機能研究科の深川竜郎、東北大学加齢医学研究所の田中耕三、かずさDNA研究所の舛本寛、姫路獨協大学薬学部医療薬学科の柴田克志の諸氏に深謝いたします。

### 文 献

- 1) Musacchio A, Salmon ED. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 May;8(5):379-93. Epub 2007 Apr 11. PMID: 17426725. DOI: 10.1038/nrm2163.
- 2) Uchida KSK, Takagaki K, Kumada K, Hirayama Y, Noda T, Hirota T. Kinetochore stretching inactivates the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol.* 2009 Feb 9;184(3):383-90. Epub 2009 Feb 2. PMID: 19188492. DOI: 10.1083/jcb.200811028.
- 3) Godek KM, Kabeche L, Compton DA. Regulation of kinetochore-microtubule attachments through homeostatic control during mitosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015 Jan;16(1):57-64. Epub 2014 Dec 3. PMID: 25466864. DOI: 10.1038/nrm3916.
- 4) Uchida KSK, Jo M, Nagasaka K, Takahashi M, Shindo N, Shibata K, Tanaka K, Masumoto H, Fukagawa T, Hirota T. Kinetochore stretching-mediated rapid silencing of the spindle-assembly checkpoint required for failsafe chromosome segregation. *Curr Biol.* 2021 April 26;31:1581-1591. PMID: 33651990. DOI: 10.1016/j.cub.2021.01.062.
- 5) Nijenhuis W, Vallardi G, Teixeira A, Kops GJ, Saurin AT. Negative feedback at kinetochores underlies a responsive spindle checkpoint signal. *Nat Cell Biol.* 2014 Dec;16(12):1257-64. PMID: 25402682. DOI: 10.1038/ncb3065.
- 6) Thompson SL, Bakhoun SF, Compton DA. Mechanisms of chromosomal instability. *Curr Biol.* 2010 Mar 23;20(6):R285-95. PMID: 20334839 DOI: 10.1016/j.cub.2010.01.034.
- 7) Shindo N, Otsuki M, Uchida KSK, Hirota T. Prolonged mitosis causes separase deregulation and chromosome nondisjunction. *Cell Rep.* 2021 Jan 19;34(3):108652. PMID: 33472072. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108652.