116　染色体動態異常による染色体異数化機構の解明	家村　顕自

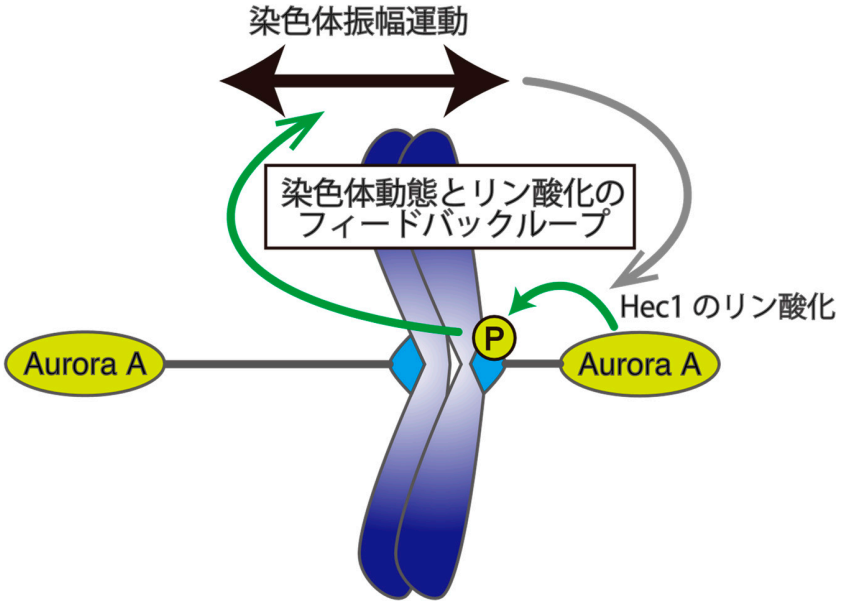
【目的】多くのがん細胞で染色体の異数化がみられる一方、正常細胞の染色体の数は常に一定に保たれている。染色体の異数化は細胞分裂の際に染色体が娘細胞に均等に分配されないこと（染色体不安定性）に起因することから、がん細胞では正常細胞に比べて染色体を均等に分配するシステム（染色体均等分配システム）の堅牢性が低いことが予想される。しかし、正常細胞とがん細胞間の染色体均等分配システムの堅牢性の違いを生みだす原因は不明である。

本研究では、正常細胞とがん細胞における染色体均等分配制御に関わる Hec1 のリン酸化の違いが、分裂期染色体動態（染色体振幅運動）及び染色体均等分配課程にどのように影響するのかという点について解析することで、がん細胞でみられる染色体均等分配システムの堅牢性の低下が何に起因するのかを明らかにする。

【方法】分裂期中期 Hec1 のリン酸化に対する責任キナーゼを明らかにするために、正常二倍体細胞株 RPE-1 細胞をプロテアソーム阻害剤 MG132 で処理することで分裂期中期に同調し、Aurora キナーゼ阻害剤を添加した後、抗 Hec1 抗体及び抗リン酸化 Hec1 抗体を用いて免疫染色することで、Hec1 のリン酸化強度を定量した。また、動原体と微小管を可視化した RPE-1 細胞を同様に処理し、生細胞観察することで、染色体振幅運動に対する Aurora キナーゼの寄与を検証した。加えて、動原体を可視化した RPE-1 細胞を上記と同様に処理し、抗α-tubulin 抗体を用いて免疫染色することで、分裂期中期における誤った動原体ー微小管結合と分裂期後期における染色体分配異常の発生頻度を測定した。

【結果】正常二倍体細胞において分裂期中期 Hec1 は中心体キナーゼ Aurora A によってリン酸化されることをみいだした。また、正常二倍体細胞の分裂期中期で Aurora A を抑制すると、分裂期中期 Hec1 のリン酸化に必要な染色体振幅運動が減弱するとともに、誤った動原体ー微小管結合の増加と染色体分配異常が引き起こされた。分裂期中期 Hec1 が染色体振幅運動に依存してリン酸化されるという他の研究結果を踏まえると、正常二倍体細胞では、染色体振幅運動により Aurora A が Hec1 をリン酸化し、そのリン酸化を以て染色体の振幅運動は更に駆動するというフィードバックループ機構により、染色体均等分配システムの堅牢性が維持されているというモデルが示唆された。

染色体振幅運動と Hec1 のリン酸化のフィードバックループ



116. 染色体動態異常による染色体異数化機構の解明

家村　顕自

東北大学 加齢医学研究所 分子腫瘍学研究分野

Key words：分裂期，染色体動態，異数性，リン酸化，がん

緒　言

多くのがん細胞では染色体の異数化がみられる一方、正常細胞の染色体の数は常に一定に保たれている。染色体の異数化は細胞分裂の際に染色体が娘細胞に均等に分配されないこと（染色体不安定性）に起因し、遺伝子発現の変化を通じてがんの発生や進展に寄与すると考えられる。このことから、がん組織を形成する細胞では正常細胞に比べて染色体を均等に分配するシステム（染色体均等分配システム）の堅牢性が低いことが予想される。しかし、正常細胞とがん細胞間の染色体均等分配システムの堅牢性の違いを生みだす原因は不明である。

これまでに申請者は分裂期染色体動態を詳細に解析し、分裂期染色体を効率よく運搬する新たな機構を明らかにした［1〜3］。この研究を進める中で、染色体が分配される直前にみられる染色体動態（染色体振幅運動）が染色体不安定性をもつがん細胞で低下していることを見いだした。また、この染色体振幅運動の低下と共に、がん細胞では染色体均等分配に必要な染色体と微小管の結合を担う分子 Hec1 のリン酸化が減弱することを見いだしている。Hec1 のリン酸化の低下は、染色体と微小管の結合を安定化させるため、がん細胞では染色体と微小管の結合が過度に安定化していることにより、正常細胞に比べて誤った染色体と微小管の結合が生じ、その結果染色体の不均等分配が起きやすい可能性が考えられる。

そこで本研究では、正常細胞とがん細胞における染色体均等分配制御に関わる Hec1 のリン酸化の違いが、分裂期染色体動態（染色体振幅運動）及び染色体均等分配課程にどのように影響するのかという点について解析することで、がん細胞でみられる染色体均等分配システムの堅牢性の低下が何に起因するのかを明らかにする。

方法および結果

1. 中心体キナーゼ Aurora A は分裂期中期 Hec1 をリン酸化するとともに染色体振幅運動に寄与する

Hec1 は分裂期前中期において動原体キナーゼ Aurora B によってリン酸化される。そこで、正常二倍体細胞株でみられる分裂期中期 Hec1 のリン酸化に対する責任キナーゼの同定を試みた。正常二倍体細胞株 RPE-1 細胞をカバーグラスに播種し、プロテアソーム阻害剤 MG132 で処理することで分裂期中期に同調し、Aurora B 阻害剤もしくは Aurora B と同じファミリーに属する中心体キナーゼ Aurora A の阻害剤を添加した後、抗 Hec1 抗体及び抗リン酸化 Hec1 抗体を用いて免疫染色した。リン酸化 Hec1 シグナルの強度を Hec1 シグナルの強度で除した値を Hec1 のリン酸化強度として比較したところ、コントロール処理細胞と比べて、Aurora B 阻害剤処理細胞においてはその値に変化がなかったが、Aurora A 阻害剤を処理した細胞では有意に減弱していた（図 1A）。以上の結果から、分裂期中期における Hec1 は動原体キナーゼ Aurora B ではなく中心体キナーゼ Aurora A によってリン酸化されることが示唆された。

これまでに、分裂期中期における染色体振幅運動は Hec1 のリン酸化によって制御されていることが報告されている。そこで、染色体振幅運動と Aurora A 活性の関連性について検証した。EGFP-CENP-A 及び EGFP-α-tubulin が恒常的に発現する RPE-1 細胞をグラスチャンバーに播種し、上記と同様に処理した細胞について、高解像度 4D 顕微鏡を用いて、2 秒毎に生細胞観察を行った。観察画像について、EGFP-CENP-A のシグナルを動原体の軌跡として追跡した。その結果、コントロール処理細胞と比べて、Aurora B 阻害剤処理細胞では染色体振幅運動に大きな変化はみられなかったが、Aurora A 阻害剤を処理すると、染色体振幅運動が顕著に減弱することが分かった（図 1B）。この結果か

ら、Aurora A は染色体振幅運動の駆動に寄与していることが示唆された。

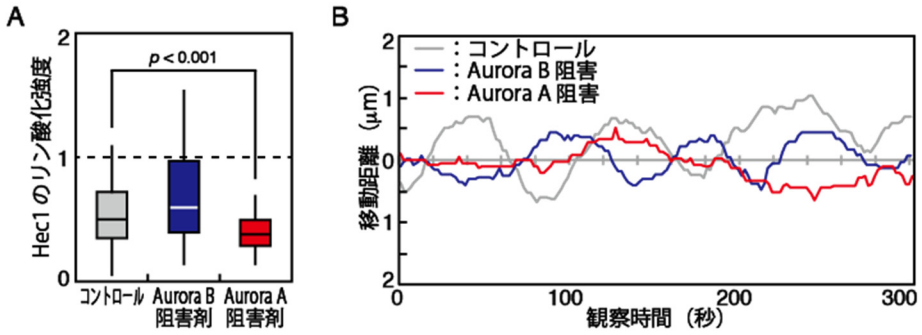


図 1. Aurora キナーゼ阻害剤処理による分裂期中期 Hec1 のリン酸化強度と染色体振幅運動の変化

A) 分裂期中期 Hec1 のリン酸化強度。各々の動原体におけるリン酸化 Hec1 の強度を測定し、箱ひげ図として示した。Mann-Whitney U test を用いて検定を行い、有意確率を図示した。

B) 分裂期中期における動原体の軌跡。分裂期中期細胞における動原体を追跡し、その軌跡を紡錘体赤道面からの距離として示した。

2. 分裂期中期における Aurora A 活性は動原体-微小管結合修正と染色体均等分配に寄与する

Hec1 のリン酸化は動原体と微小管の結合親和性を低下させ、誤った動原体-微小管結合の修正を担っている。そこで、分裂期中期 Hec1 のリン酸化に寄与する Aurora A 活性が、動原体-微小管結合修正に寄与しているかどうかを検証した。EGFP-CENP-A を恒常的に発現する RPE-1 細胞をカバーグラスに播種し、1 と同様に薬剤処理した分裂期中期細胞について、カルシウム含有緩衝液を用いて不安定な微小管を除去した後、抗α-tubulin 抗体を用いて免疫染色した。EGFP-CENP-A シグナルの最大輝度を示す画像スライスを含めたスライス像について最大輝度投影を行い、動原体と微小管の結合を評価した(図 2A)。その結果、コントロール処理の分裂期中期細胞では、誤った動原体-微小管結合が 10.8%存在していた。一方、Aurora A 阻害剤を処理した細胞では、誤った動原体-微小管結合が 23.8%に増加した(図 2B)。

次に、染色体分配への Aurora A 阻害効果を検証するために、1 と同様に薬剤処理した分裂期中期細胞から薬剤を除き、分裂期後期へ進行させた後、染色体分配異常細胞の割合を測定した。その結果、コントロール処理細胞では、染色体分配異常が 5.7%存在していた。一方、Aurora A 阻害剤処理細胞では、染色体分配異常が 13.3%と有意に増加した（図 3C)。以上の結果から、分裂期中期における誤った動原体-微小管結合は、Aurora A 活性によって修正され、染色体は正しく分配されることが示唆された。

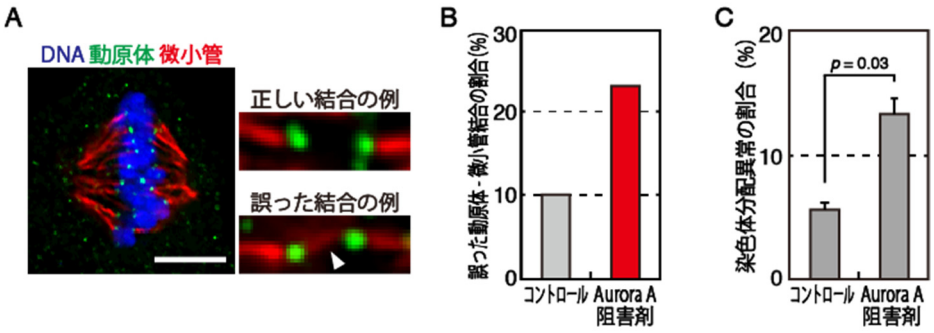


図 2. Aurora A 阻害剤処理細胞における誤った動原体-微小管結合と染色体分配異常の発生頻度

A) EGFP-CENP-A を恒常的に発現する正常二倍体細胞の分裂期中期免疫染色像。抗 EGFP 抗体（動原体、緑）、抗α-tubulin 抗体（微小管、赤）で染色した。DNA は DAPI を用いて染色した（青）。任意の Z 軸スライス 3 枚について、最大輝度投影を行なったものを示している。拡大図は姉妹動原体における動原体-微小管結合の一例。誤った結合では、姉妹動原体の間に微小管（赤）のシグナルが確認できる（矢頭）。スケールバー：5 μm。

B) 分裂期中期における誤った動原体-微小管結合の割合。姉妹動原体の間に微小管のシグナルが確認できた姉妹動原体を誤った動原体-微小管結合としてその割合を測定した。各処理につき少なくとも 100 姉妹動原体を観察した。

C) 染色体分配異常細胞の発生頻度。分裂期後期細胞について、染色体分配に異常がみられた細胞の割合を測定した。各処理につき少なくとも 100 細胞数え、独立した実験を 3 回行なった平均を図示し、その標準偏差をエラーバーとして示した。Student t-test により検定を行い、有意確率を図示した。

考　察

本研究により、分裂期中期でのAurora A活性は、Hec1のリン酸化と染色体振幅運動に寄与し、動原体と微小管の結合修正と染色体均等分配を担うことが明らかとなった。Hec1のリン酸化が誤った動原体-微小管結合の修正に寄与していることや、染色体振幅運動に必要とされる過去の報告、また、分裂期中期におけるHec1のリン酸化と染色体振幅運動は異数性がん細胞ではみられず、正常二倍体細胞でのみ観察される特徴であることから、分裂期中期でのAurora A活性が正常二倍体細胞における染色体均等分配の堅牢性を担っている分子の一つである可能性が考えられる。即ち、正常二倍体細胞では、分裂期中期にAurora AがHec1をリン酸化することで、染色体振幅運動を駆動するとともに、誤った動原体-微小管結合を修正しているというモデルが想像される。一方で、正常二倍体細胞でのみなぜAurora Aによる分裂期中期Hec1のリン酸化がみられるのかという点に関しては未解決な問題である。しかし、並行して進めていた研究において、分裂期中期Hec1が染色体振幅運動に依存してリン酸化されることを見いだしている。染色体振幅運動の活性は紡錘体を形成する微小管の安定性によって規定されており、微小管が不安定化すると染色体振幅運動が亢進することが報告されている。また、正常細胞に比しがん細胞では分裂期において微小管が安定化していることが知られている。これらの点を考慮した本研究の成果から、正常二倍体細胞では分裂期微小管の不安定化による染色体振幅運動の活性化に続き、染色体振幅運動依存的にAurora AがHec1をリン酸化、Hec1のリン酸化により染色体振幅運動が更に駆動するという、Aurora AによるHec1のリン酸化と染色体振幅運動のフィードバックループにより、誤った動原体-微小管結合が修正され、染色体均等分配システムの堅牢性を維持する環境づくりがなされているというモデルを提唱する（図3）。

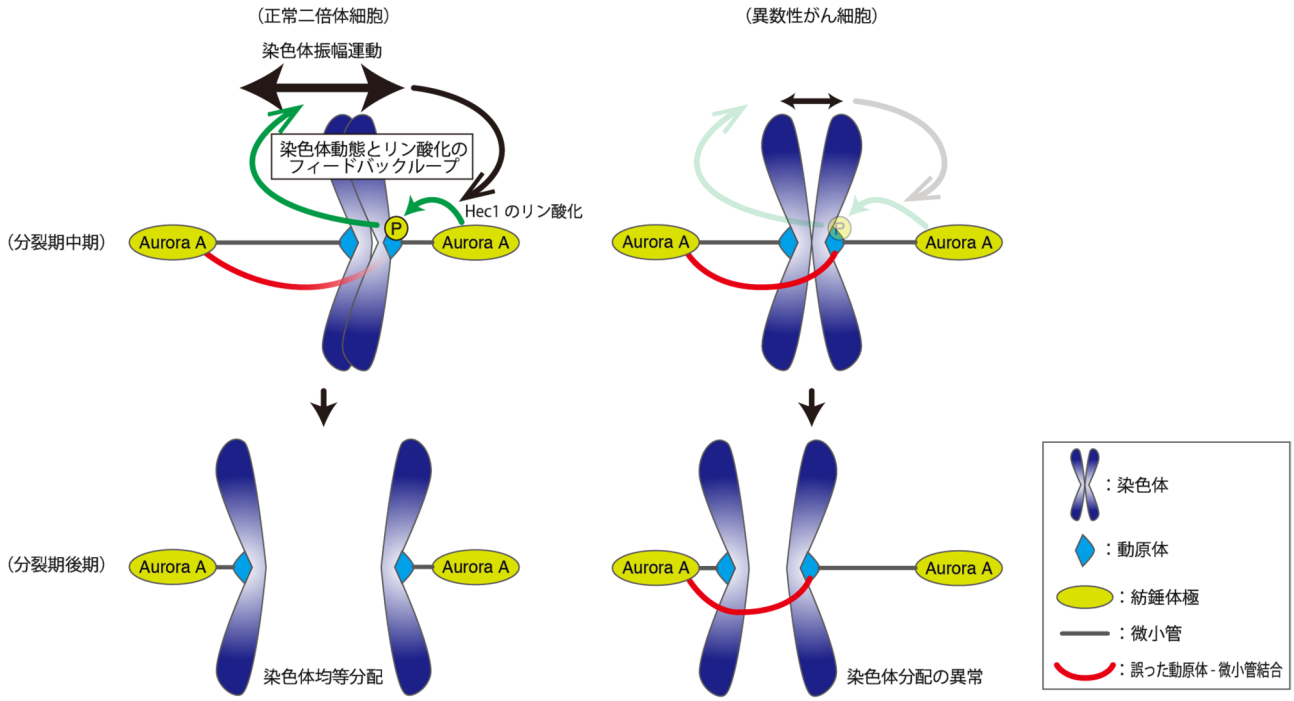


図 3. 染色体動態と Hec1 のリン酸化のフィードバックループを介した染色体均等分配システム維持モデル
正常二倍体細胞では、分裂期中期において Aurora A が Hec1 をリン酸化するとともに染色体振幅運動に寄与しており、分裂期中期での Aurora A 活性は誤った動原体-微小管結合修正と染色体均等分配に必要とされる（左上緑矢印）。他方、Aurora A による Hec1 のリン酸化は染色体振幅運動に依存する（左上黒矢印）。このことから、正常二倍体細胞では、染色体動態と Hec1 のリン酸化のフィードバックループの存在により、誤った動原体-微小管結合が修正され染色体は均等に分配される（左下）。異数性がん細胞では分裂期中期 Hec1 のリン酸化と染色体振幅運動がみられず、染色体動態と Hec1 のリン酸化のフィードバックループが機能していない（右上）。このため、誤った動原体-微小管結合が修正されず、染色体分配異常が高頻度で生じる。

共同研究者・謝辞

研究遂行にあたり、適宜ご助言・ご教示くださりました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対し、この場をお借りして厚く御礼申しあげます。

文　献

1） Iemura K, Tanaka K. Chromokinesin Kid and kinetochore kinesin CENP-E differentially support chromosome congression without end-on attachment to microtubules. Nat Commun. 2015 Mar 6;6:6447. doi: 10.1038/ncomms7447.

2） Iemura K, Tanaka K. Mechanism for efficient chromosome alignment in mitosis.Seikagaku. 2017 Feb;89(1):102-5. PMID:29624969.

3） Itoh G, Ikeda M, Iemura K, Amin MA, Kuriyama S, Tanaka M, Mizuno N, Osakada H, Haraguchi T, Tanaka K. Lateral attachment of kinetochores to microtubules is enriched in prometaphase rosette and facilitates chromosome alignment and bi-orientation establishment. Sci Rep. 2018 Mar 1;8(1):3888. doi: 10.1038/s41598-018-22164-5.