

研 究 成 果 報 告 書

スピンドルチェックポイントのシグナル伝達系

15370085

平成 15 年度～平成 17 年度科学研究費補助金
(基盤研究 (B)(2)) 研究成果報告書



平成 18 年 5 月

研究代表者 松本 智裕

京都大学放射線生物研究センター 教授

科研

2005

118

付図

スピンドルチェックポイントのシグナル伝達系

15370085

平成15年度～平成17年度科学研究費補助金
(基盤研究 (B)2) 研究成果報告書

研究代表者: 松本 智裕 (京都大学放射線生物研究センター)

研究分担者: 土生 敏行 (京都大学放射線生物研究センター)

交付決定額 (配分額)

年度	直接経費	平成18年5月
平成15年度	6,300,000	0
平成16年度	4,100,000	0
平成17年度	4,000,000	研究代表者 松本 智裕
総計	14,400,000	0

京都大学放射線生物研究センター 教授

研究発表

(1) 学会発表

Luo X., Tang Z., Xia G., Wassmann K., Nishimoto T., Kimura J., and Yu H. (2004) The Mad2 spindle checkpoint — Mad2 has two distinct, mutually folded states. *Biochem Biophys Res Commun* 311: 738-745.

Guohong Xia, Xuelian Luo, Kichiyuki Nishimoto, Takahiro Matsubara, and Shinya Yu (2004) Specific binding of p107 to Mad2 and its function in the spindle checkpoint. *Biochem Biophys Res Commun* 311: 101-107.

Kuniaki Yang, Eiki Matsumoto, Junjiro Mori, and Takahiro Matsubara (2005) Delay Following by Presumed Dissociation of p53/135/105 Checkpoint and p53/135/105 Association of the Spindle Checkpoint Leading to Amplified Cell Cycle. *Cell Cycle* (2005) 4: 1335-1343.

<はしがき>

スピンドルチェックポイントは動原体へのスピンドル接続が完了していない際に、姉妹染色分体の解離を防ぐことにより均等な染色体分配を保障する細胞周期監視機構である。スピンドルチェックポイントのシグナル伝達機構は Mad2 タンパク質の活性を細胞周期の進行にともない制御するものと考えられる。本研究では Mad2 タンパク質の生化学的性状を解明するとともに、Mad2 タンパク質に拮抗的に作用するタンパク質、p31^{comet} の作用機序の解明を目指した。

研究組織

研究代表者：松本智裕 (京都大学放射線生物研究センター 教授)
研究分担者：土生敏行 (京都大学放射線生物研究センター 助手)

交付決定額 (配分額)

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成15年度	6,300,000	0	6,300,000
平成16年度	4,400,000	0	4,400,000
平成17年度	4,400,000	0	4,400,000
総計	15,100,000	0	15,100,000

研究発表

(1) 学会誌等

Luo X., Tang Z., Xia, G., Wassmann K., Matsumoto T., Rizo, J. and Yu H. (2004) The Mad2 spindle checkpoint protein has two distinct natuively folded states. *Nat Struct Mol Biol.* 11:338-345.

Guohong Xia, Xuelian Luo, Toshiyuki Habu, Josep Rizo, Tomohiro Matsumoto, and Hongtao Yu (2004) Conformation-specific binding of p31^{comet} to Mad2 antagonizes the function of Mad2 in the spindle checkpoint. *EMBO J.* 23:3133-3143.

Ikui AE, Yang CPH, Matsumoto T, Horwitz SB. Low Concentrations of Taxol Cause Mitotic Delay Followed by Premature Dissociation of p55CDC from Mad2 and BubR1 and Abrogation of the Spindle checkpoint, Leading to Aneuploidy. *Cell Cycle* (2005) 4:1385-1388.

(2) 口頭発表

土生 敏行、松本 智裕：紡錘糸結合性タンパク質、p31^{comet} は有糸分裂中期に Mad2 依存的スピンドルチェックポイントを抑制する。第 5 回日英細胞周期ワークショップ、2004 年 4 月、奈良。

土生 敏行、松本 智裕：紡錘糸結合性タンパク質、p31^{comet} は有糸分裂中期に Mad2 依存的スピンドルチェックポイントを抑制する。The Cell Cycle Meeting at Cold Spring Harbor Laboratories, 2004 年 5 月、ニューヨーク。

松村 拓洋、松本 智裕：スピンドルチェックポイントのターゲットである分裂酵母 Slp1 の解剖。第 3 回国際分裂酵母会議、2004 年 8 月、サンディエゴ。

久能 樹、土生 敏行、松本 智裕：分裂酵母 Clr6-HDAC によるチェックポイントキナーゼ、Cds1 の制御。第 2 回東海岸分裂酵母会議、2005 年 11 月、マイアミ。

(3) 出版物

Matsumoto, T. and Yanagida, M. (2005) The dream of every chromosome; equal segregation for a healthy life of the host. *Genome Instability and Cancer Development*, in *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer, Nigg, Erich A. (Ed.) Vol. 570, 281-310.

研究成果

有糸分裂において紡錘糸（スピンドル）は各染色体を娘細胞に誘導するという重要な役割を担う。染色体が均等分配されるためには、姉妹染色分体の解離に先立ち、全ての染色体のキネトコア（動原体）にスピンドルが接続されなければならない。スピンドル接続の完了以前に姉妹染色分体が解離すると、スピンドルを持たない染色体は娘細胞へ正確に誘導されない。スピンドルチェックポイントは、均等な染色体分配を保障する監視機構である。キネトコアへのスピンドル接続が完了していない際に、姉妹染色分体の解離を防ぐことがその主な任務である。

スピンドルチェックポイントのシグナル伝達機構は Mad2 タンパク質の活性を細胞周期の進行にともない制御するものと考えられる。間期には核膜上に存在する Mad2 タンパク質は、有糸分裂期の開始にともない核内に移行し、スピンドルが未接続の動原体へ誘導される。スピンドル未接続の動原体では Mad2 が Slp1/CDC20 との複合体に組み込まれるものと予想されている。有糸分裂中期に達し、スピンドルが全ての動原体に接続すると姉妹染色分体の解離が起こる。このためには Mad2 タンパク質が Slp1/CDC20 との複合体から放出され Slp1/CDC20 が活性化されなければならない。すなわちスピンドルチェックポイントが解除されること（silencing）が必須である。生化学的

法により精製された Mad2・Slp1 複合体は非常に堅固で、たとえば 0.4 M KCl といった高濃度の塩溶液中でも高い安定性をしめす。一方、細胞内では有糸分裂中期から後期に遷移する短時間のうちに、Mad2・Slp1 複合体は解離する。この複合体のすばやい解離過程には別の Mad2 結合性タンパク質、p31comet、が関与することが最近の我々の研究でわかっている。p31comet の作用機序をさらに詳細に解明することが本研究の最大の目標である。

Mad2タンパク質の生化学的性状、さらにp31cometが有するMad2に対する生物学的活性については、その研究成果を論文2報として発表した（本報告書に添付）。

p31cometがスピンドルチェックポイントの解除因子として機能するための作用機序を解明するため、生化学的手法によりp31cometと相互作用する因子の同定を試みた。抗p31-comet抗体の免疫沈降法によりp31cometと共沈するタンパク質を精製し、そのアミノ酸配列を決定した。その結果、ダイニンモーター複合体のサブユニットの一つであるダイニン中間鎖（以下、DNCI）を同定した。同調培養したHeLa細胞の抽出液による免疫沈降法により、p31cometとDNCIは有糸分裂中期から後期にかけて複合体を形成することを確認した。またこの免疫沈澱中にはMad2の存在も確認された。p31comet, Mad2, そしてDNCIの3者が有糸分裂期の後半で複合体を形成しているようである。p31cometの細胞内局在を検討した結果、有糸分裂期の細胞ではp31cometが紡錘糸上に存在することが判明した。有糸分裂初期には紡錘糸全長にわたり存在するp31cometは中期への進行にともない紡錘糸の動原体側の先端に蓄積する（図1）。DNCIについてもp31cometと同様な細胞内局在性が示されている。

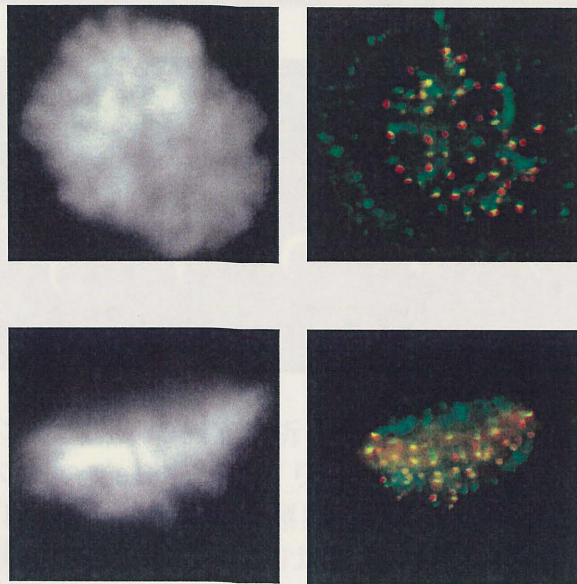


図1：p31cometの細胞内局在：有糸分裂初期（上段左、DAPI染色による染色体像、右は抗体染色によりp31cometを緑、動原体特異的タンパク質のCENP-Aを赤で可視化）では紡錘糸上にp31cometが局在する。有糸分裂中期（下段、染色方法は上段と同様）では、赤（CENP-A）と緑（p31comet）の点が重なり画面上では黄色の点として認識される。p31cometが紡錘糸に依存して動原体に到達したものと推察される。

DNCIの機能を明確にするため、DNCIをsiRNAにより失活させ生細胞内における染色体の挙動を観察した。特に姉妹染色分体の解離のタイミングを詳細に解析するため動原体特異的タンパク質CENP-AをGFPタンパク質と融合することにより蛍光標識した。DNCIのsiRNA処理を施さない細胞（コントロール）では有糸分裂期に進入後、約40分で姉妹染色分体の解離が見られたが、DNCIが失活した細胞では、染色体が赤道面上に整列したにもかかわらず姉妹染色分体の解離が見られない。有糸分裂開始後、約10時間にわたり姉妹染色分体は対合を維持したまま核内を活発に運動した後、細胞死にいたる（図2）。この表現型はDNCIが赤道面への染色体の整列には関与しないが、その後の姉妹染色分体の解離に深く関わることを示唆する。スピンドルチェックポイントの解除因子であるp31cometとの相互作用を考慮すると、DNCIの欠損が、恒常的なスピンドルチェックポイントの活性化を引き起こしている可能性が大きい。

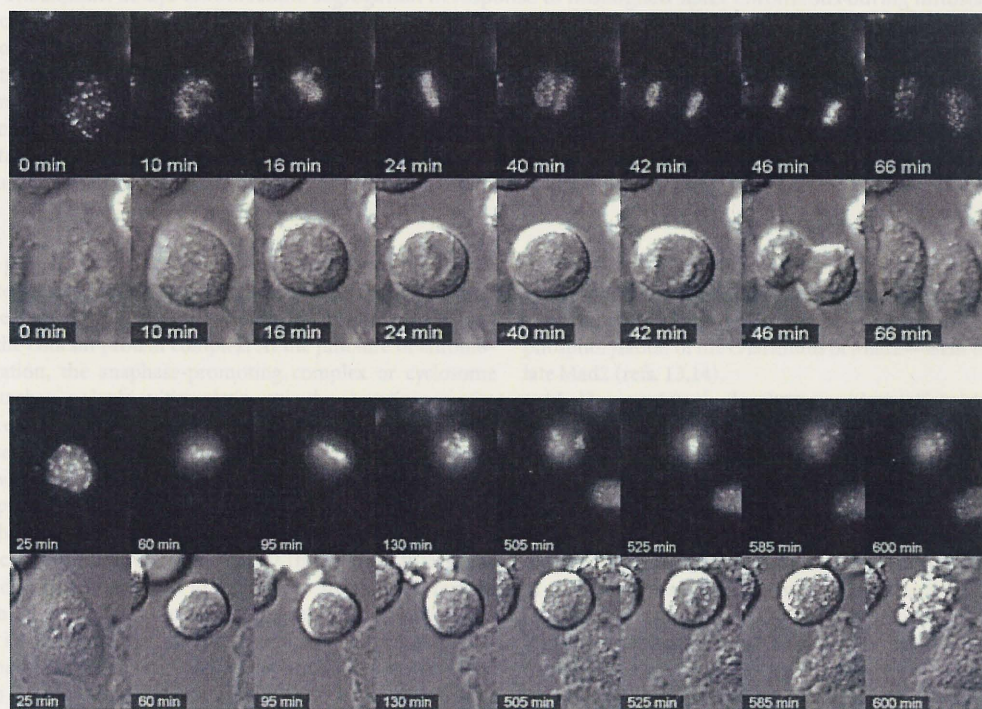


図2：生細胞観察によるDNCIの機能解析：CENP-AとGFPとの融合タンパク質を発現するHeLa細胞においてsiRNA法によりDNCIを失活させ経時的に染色体の動態を観察した（下段2列：上は蛍光標識されたCENP-A、下は細胞の全体像）。コントロール実験（上段2列）では有糸分裂開始後、約40分で姉妹染色分体の解離が開始される。これに対してDNCIを失活させた細胞では、有糸分裂開始後約60分で染色体が赤道面に整列するにもかかわらず姉妹染色分体の解離がおこらない。その後、一旦整列した染色体は核内に分散（130分から505分）し、再度、赤道面に整列する（525分）が、染色分体の解離がおこらないまま細胞死が引き起こされる（600分）。