

Aurora キナーゼによる染色体の制御機構に関する研究

《研究の概要》

細胞が増殖する過程で、ゲノム情報を過不足なく継承することは、生命の恒常性を維持するための最も基本的な営みであり、その一連のプロセスは正確に遂行されなければならない。ところが、多くのがん細胞では、分裂のたびに染色体数に変動する「染色体の不安定性」と呼ばれる病的な染色体動態がみられ、この性質の獲得こそが発がんやがんの悪性化と深く関連していると考えられている。細胞分裂は一連のタンパク質リン酸化反応によって進行するので、分裂期に活性を有する「分裂期キナーゼ」の機能とその連携を紐解いていくことが、安定した染色体の伝搬を保証するメカニズムを解明する一つの重要なアプローチであると考えられる。分裂期キナーゼの一つである Aurora B はクロマチンに親和性が高く、生物種を超えて染色体の制御に直接的な役割を持っているということが最近の研究で分かってきた。実際に、Aurora B の活性を抑えた分裂期細胞を観察すると、染色体の構築は崩れ、染色体の動態に異常を来し、染色体の分配は失敗に終わることからも、Aurora B が染色体の形成から分離までの各プロセスで鍵となる酵素であることが見てとれる。従って、染色体制御の分子メカニズムの解明、さらにその破綻による染色体不安定性の病態解明、に向けては、Aurora B の活性がどのような局面に必要か？ どのような分子と連携しているか？ を紐解いていくことが一つの突破口となるはずである。このような背景から、本研究では、Aurora B と染色体構成分子との関連、Aurora B と動原体機能との関連を追究した。また、多彩な機能を担う Aurora B の活性は厳密な制御下にあるはずで、Aurora B の時空間的な制御機構についての検討も進めた。その結果、以下の成果を得た：

染色体の形成過程においては、Aurora B がコンデンシン I およびトポイソメラーゼ II α 染色体の骨格となる軸索構造への取り込みを誘導することを見出した。コンデンシン I の染色体局在は極めて動的であることが示唆されたので、これらの染色体構築分子群は Aurora B によってリン酸化されると、クロマチンへの親和性が高まり結合が促進すると考えられた。また、染色体を形成する過程で、Aurora B はコヒーシンの解離を促進することを併せ考えると、染色体の構築とは、染色体の構成分子群の動的な分子代謝に基づく過程であり、その分子動態は Aurora B によって制御されているというモデル図に至っている。HP1 α はコヒーシン同様に Aurora B によってクロマチンより除去される分子の一つである。本研究で、分裂期における HP1 α の機能を追究したところ、ヒストンより解離した HP1 α は Aurora B を含んだ染色体パッセンジャー複合体とともにセントロメアに局在し、動原体と微小管の正しい接続を保証するという、安定した染色体分配のための中心的な役割を担うことを発見した。また Aurora B の局在と活性化の制御については、セパレーズと新規の脱リン酸化酵素に依存した経路を見出すことができた。これらの成果は、染色体継承システムの理解を深めたというばかりではなく、がん細胞における染色体不安定性の病態と意義の解明に、さらには新たな分子標的治療法の開発に繋がることが期待される。

広田 亨	財団法人癌研究会癌研究所 実験病理部・部長	研究の総括 染色体因子の調節機構とその生物学的意義の解明
熊田和貴	財団法人癌研究会癌研究所 細胞生物部・研究員	Aurora キナーゼの活性制御機構の解明
白髭克彦	東京工業大学バイオ研究 基盤支援センター・准教授	ゲノム学的手法を用いた染色体動態モデルの構築

研究報告

I 研究目的

細胞増殖の基本は、細胞周期が回転して細胞が2つに分裂することであり、生命体の恒常性の維持は、細胞分裂の過程で安定してゲノムを継承することにある。ゲノム情報を担うクロマチンは、細胞の分裂に先だって凝縮し“染色体”に変換され、その姉妹染色分体は分裂後期の開始時にいつせいに分離される。細胞はこれらのプロセスを完遂することによって、ゲノムの均等配分を確実にしている。フレミングが染色体を記述してから 130 余年来、多くの研究が重ねられてきたが、染色体の形成、移動、分離、といった一連の動態が、どのような分子機構によって制御されているのかは今日においても未だに十分理解されていない。

細胞分裂の度に染色体数が変動するという「染色体不安定性」という特性は、がん細胞の有する生物学的特徴の一つであり、約 85%の臨床癌がこの性質を獲得していると言われている。染色体数の異常はゲノムの大きな量的変化を意味し、無秩序な細胞増殖集団の発生あるいは大量の細胞死滅を導くことがあるので、がん細胞が「染色体不安定性」を獲得することは、生体で腫瘍を形成して正常組織の機能低下を招く要因となっていると推察される。つまり、多くのがん細胞では、共通して、染色体の形成から分配を調節するシステムのどこかが破綻していることが予測される。従って、染色体制御の分子機構を理解することは、生物学的、医学的見地から極めて重要な課題であると言える。

細胞分裂は一連のタンパク質リン酸化によって進められるので、分裂期に特異的に活性を有する一連の「分裂期キナーゼ」の機能を解明することは、生理的な細胞分裂の仕組みの分子基盤として重要である。分裂期キナーゼとしては、従来より、M 期サイクリン依存性キナーゼ (Cdk) が主要なはたらきをしていることが知られるが、加えて、Aurora や Polo と呼ばれるキナーゼが、分裂期の各イベントに、より直接的な役割を担っていることが分かってきた。さらに、Cdk の活性化が未だ見られない分裂期初盤、あるいは Cdk1 活性が低下した後期以降といった時期に、Aurora と Polo が主導となり染色体分離や細胞質分裂を進めるという、これらの分裂期キナーゼの必須機能が明かされつつある。私たちの研究を含めた最近の研究の結果、クロマチンに親和性がある Aurora B は、染色体制御の要所で不可欠な役割を担うキナーゼであることが浮き彫りになりつつある。つまり、Aurora B の酵素活性を抑えた分裂期細胞では、染色体の正常な構築は崩壊し、染色体の動態に支障をきたし、染色体は正しく二分されない。このような観察から、Aurora B が

どのような分子を基質とし、それらの基質はリン酸化を受けることによってどのような機能を担うようになるのか、といった Aurora B とその関係分子との相互作用を明らかにしていくことで、染色体制御の分子背景の大枠が見えてくるに違いないと考えられた。得られる知見は、がん細胞の生物学的特徴の一つである「染色体の動態異常」の分子背景を究明するための基盤となるであろうと考えられる。さらに Aurora B を含めた分裂期キナーゼは、がん細胞の細胞増殖性を促進する病理的な活性を併せ持つことから、その病態解明あるいは創薬戦略にも光明を投げると期待される。従って、本課題では、Aurora B の機能及びその活性制御様式の解明を目的とし、次の3つの側面について具体的な到達目標を設定した。

1) Aurora B による染色体構成分子の制御について：コンデンシン、コヒーシン、トポイソメラーゼ II α といった染色体の支柱となる軸索構造を構成するタンパク質群を重点的に、Aurora B による動態制御機構を明らかにする。

2) Aurora B による微小管・動原体相互作用の制御について：Aurora B がいかんして正確な染色体分配の前提である二方向性 Bi-orientation (姉妹動原体がそれぞれ異なる紡錘体極と結合した状態) の確立を促すのか、その分子メカニズムを解明し、染色体分配の最終検問である「紡錘体チェックポイント」との関わりについて明らかにする。

3) Aurora B 活性を制御する経路について：Aurora B の活性は時空間的に厳密な制御を受けているはずであるがその制御様式はよく分かっていない。出芽酵母での観察に基づいて、Aurora B とタンパク質分解酵素セパレーズとの関連性を明らかにする。

II 研究計画および材料と方法

全ての実験は、ヒトまたはマウスの癌組織由来の培養細胞を用い、主に生化学的および顕微鏡的手技を中心とした細胞生物学的解析によって進める。特にダイナミックなプロセスを把握するのに有利な生細胞観察系を駆使する実験を立案した。

i) 染色体を構築する過程での Aurora B の役割を明らかにする。Aurora B の阻害するとなぜ染色体の基本構築や機能が喪失するかを検討する。染色体はコンデンシン、コヒーシンといった「染色体構成分子」の活発な代謝に基づいて構築されていることが示唆されているので、これらの分子群を蛍光標識した細胞を用いて、Aurora B 活性の有無による動態変化を観察する。特に、細胞内における分子の動態を解析法として FRAP (蛍光消褪後の回復率を経時間的に測定する) 技法を導入する。

ii) 染色体構成分子群の分裂期特異的なリン酸化について Aurora B の関与を検討する。分裂期に見られるコンデンシンとコヒーシンのリン酸化体をタンパク質の電気泳動法によって識別できる条件において、それぞれのリン酸化の Aurora B 依存性を調べる。次いで、リン酸化部位の同定を、Aurora 基質のコンセンサス配列 RXS/T をもとに候補部位を調べる。同定したリン酸化部位の意義を調べるために、リン酸化型特異抗体を作成する。最終的には、非リン酸化変異体の表現形を解析しリン酸化修飾の意義を検討する。

iii) Aurora B の関係分子を探索する。Aurora B は多彩な機能を持つにもかかわらず、そのリン

酸化基質として同定されているものは限られている。基質の探索を行うために、内因性の Aurora B 複合体と結合する分子を質量分析により探索する（そのために Aurora B と複合体を形成する INCENP に対する抗体を作成）。同定された結合分子、生化学な検討、および細胞内動態の検討を行い。基質である可能性を検討する。

iv) 染色体構成分子のゲノム学的解析を行う。ChIP-Chip 解析（クロマチン免疫沈降法と DNA チップを組み合わせた方法）によって染色体構成分子群のゲノムレベルでの動態を検討する。この解析は大量の抗体を必要とし、さらにその成否は特異抗体の質に依存するので、まずはコンデンシンとコヒーシン複合体に対する特異抗体を開発する。次に Aurora B を阻害した場合の局在変化を観察する。ChIP-Chip 法での解析が困難なセントロメアについては、クロマチン線維の免疫染色法を試す（セントロメア・ヒストン CENP-A を目印とする）。

v) 分裂期マーカーであるヒストン H3 のリン酸化の意義を検討する。われわれは Aurora B がヒストン H3 がリン酸化する結果として、ヘテロクロマチンタンパク質 (HP1 α) の解離が誘導されることを見出した (Hirota et al., Nature, 2005)。この成果を発展させるために、HP1 α も同様に Aurora B によってリン酸化される可能性を検討し、HP1 α の解離機構を明らかにする。最終的に分裂期における HP1 α の細胞内局在とその機能を解析する。

vi) Aurora B を阻害すると、中期赤道面へ整列できない染色体が頻発することから、微小管と動原体との結合調節に Aurora B がかかわっていることが示唆されている。先ず動原体と微小管の結合様式の詳細な検討を可能とする細胞、即ちそれぞれの構造物を蛍光標識した細胞を樹立する必要がある。その細胞を生細胞観察し、Aurora B が働くところをピンポイントで突き止める。

vii) Aurora B とセパレーズとが機能的に関連していることに着目し、Aurora B の活性化機構を明らかにする。先ず活性型 Aurora B 特異的なリン酸抗体を作成して Aurora B の活性の時空間制御を明らかにする。次いで、セパレーズのノックアウトマウス由来の線維芽細胞において Aurora B の活性化状態を解析する。更に、種々のセパレーズ変異体を導入して Aurora B の活性化に必要なセパレーズの機能ドメインを明らかにする。

III 研究成果

それぞれのサブ・プロジェクトの実施により、Aurora B キナーゼがいかんにして染色体の構築やその動態の制御に関わっているのかを明らかにすることができた。特に、動原体と微小管の結合という正確な染色体分配のかなめとなるポイントにおいて Aurora B の機能を分子レベルで明らかにしたことは染色体動態制御の理解に大きく貢献すると言える。

1) Aurora B による染色体構成分子の制御について

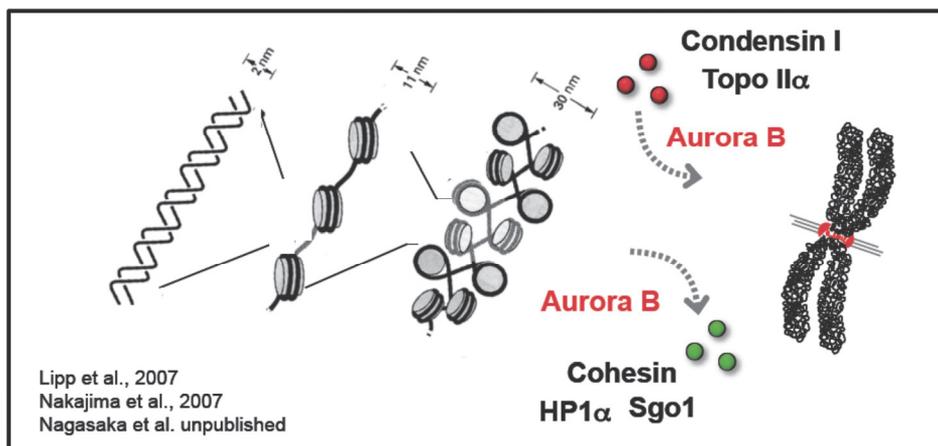
1-1) Aurora B によるコンデンシンの制御：Aurora B がどのように染色体構築に寄与するのか、染色体凝縮に重要な役割を持つと考えられているコンデンシン複合体（ヒト細胞はコンデンシン I 及び II の 2 種類を持つ）の取り込みという観点から検討した。コンデンシンを GFP 標識した細胞において、細胞質に広がっていたコンデンシン I が核膜崩壊を契機にクロマチンに取り込

まれていく様子が観察されたが、Aurora B を阻害またはロックダウンした細胞では、コンデンシン I の取り込みが強く抑制された。対照的に、コンデンシン II の動態は Aurora B 阻害により影響を受けなかった。また、既にコンデンシン I を取り込んでいる前中期の細胞に Aurora B の阻害剤を加えたところ、染色体のコンデンシン I の濃度が速やかに低下した。FRAP 解析によればコンデンシン I は迅速なターン・オーバーをすることを考慮すると (Gerlich et al., 2006)、コンデンシン I を染色体上に維持するためには持続的な Aurora B の活性を必要とすると解釈された (Lipp et al., 2007)。さらに、Aurora B が直接コンデンシンをリン酸化する可能性を生化学的に検討したところ、コンデンシン I のサブユニットが分裂期に Aurora B 依存性にリン酸化されていることが示唆されたので *in vitro* において Aurora B にリン酸化部位の同定を行った。細胞内での検討を行うべく、リン酸化特異抗体の開発を進めているが、非リン酸化型変異体は染色体に結合しないという観察が得られた。つまり、Aurora B はコンデンシン I のリン酸化によりクロマチン結合を促進することによって、染色体の構築に寄与することが明らかとなった。

1-2) Aurora B による姉妹染色分体の解離： 染色体の構築において、クロマチンの凝縮と並んで姉妹染色体の分離は重要な要素である。姉妹染色体の分離のためには、コヒーシンの解除とデ・カテネーション (絡みを解く) の双方が必要であるが、後者を評価する良い方法がないために、その制御についてはあまり多くは知られていない。我々は原子間力顕微鏡による染色体のナノスケールの観察を行い、Aurora B の活性がクロマチンのデ・カテネーション (絡みを解く) ために必要であることを見出した。Aurora B に結合するタンパク質を網羅的に探索した結果、トポイソメラーゼ II α (TopoII α) を同定した。その相互作用を生化学的に検討すると、TopoII α は Aurora B のリン酸化基質となり、かつ Aurora B の活性依存的に染色体に取り込まれることが判明した

(Nagasaka et al.未発表)。デ・カテネーションの解除に Aurora B による TopoII α の活性制御が少なからず重要であると思われる。また、Aurora B を阻害するとコヒーシンが染色体腕部に残留して姉妹染色分体の分離が妨げられることが示唆されていたが、これは Aurora B がコヒーシンの保護因子であるシュゴシンの染色体腕部からの解離を促進しているためであること見出た

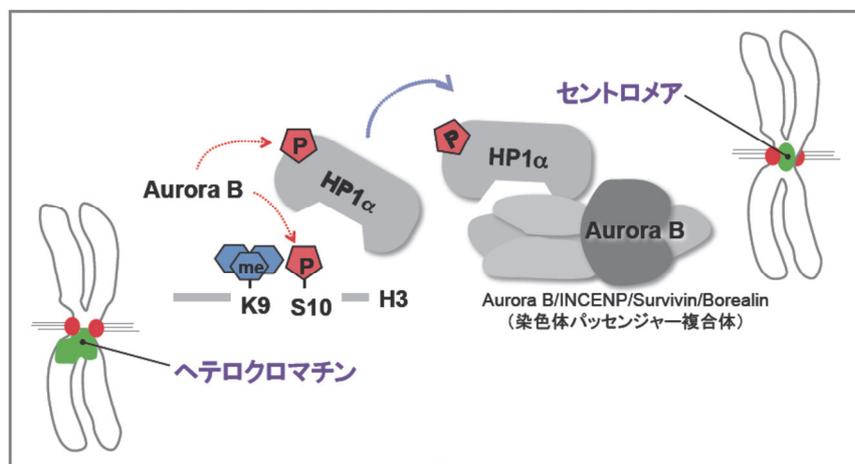
(Nakajima et al., 2007)。総じて捉えれば、染色体の構築とは、染色体の構成分子の動的な分子代謝に基づく過程であり、その分子動態は Aurora B によって制御されているというモデルを提唱することができる (下図)。



1-3) 染色体構築分子群のゲノム動態：染色体構築分子群に対する特異抗体を作成し、酵母で確立していた ChIP-chip 法を基本として、ヒトのゲノムを解析する方法論を確立した。現段階ではコヒーシンの局在についての解析が先行しているが、コヒーシンはほぼ全て、インシュレーター因子 CTCF の結合部位と一致することが判明した。それぞれのノックアウトを用いて検討したところ、CTCF の欠損では姉妹染色分体間接着確立の部分的欠損を引き起こし、コヒーシンのノックアウトでは、CTCF の部分的な脱落が示唆されるデータが得られ、コヒーシンが遺伝子の発現制御という側面においても機能していることが示唆された (Wendt et al., 2008)。ここで確立した方法論を用いて、現在、他の染色体構築分子の局在と、それらが Aurora B 活性によってどのような影響を受けるのかを検討している。

2) Aurora B による微小管・動原体相互作用の制御について

分裂期において Aurora B の活性依存的にクロマチンより解離する HP1 α の動態と機能を追究することによって、期せずして、動原体と微小管の正しい結合を保證する仕組みの中で Aurora B がいかに重要な役割を担っているのかということが発見することができた。まず、HP1 α は M 期特異的に Aurora B によってリン酸化を受けると、リン酸化サイトの一つが Ser92 であることが分かった。リン酸化 HP1 α の大部分は細胞質に存在したが、興味深いことに一部のリン酸化 HP1 α は Aurora B/染色体パッセンジャー複合体 (CPC) と相互作用し、その結果セントロメアに局在することが、免疫沈降法や免疫染色法によって判明した (図参照)。さらに HP1 α と Aurora B の結合は HP1 α Ser92 のリン酸化によって安定化することが FRAP 解析で示唆された。



セントロメアにおける HP1 α と Aurora B の相互作用の意義をノックダウン実験あるいは種々の変異体の補完実験を行って検討したところ、この相互作用はメロテリック結合 (一つの動原体に両極から延びた微小管が結合) のような動原体における微小管の誤接続を防ぐという特異な役割を担っていることを明らかにした。つまり、このような誤接続は Aurora B 依存性に M 期チェックポイントが維持されて、そして修復されると考えられていたが、これらの Aurora B の機能は HP1 α

との連携があって始めて可能となることが分かった。換言すれば、Aurora B は、HP1 α をセントロメアに引き込むことによって、微小管の誤接続を防ぎ、染色体の不均等分配を未然に防ぐことによって、染色体の安定した分配を保証していると言える (Takagaki et al., 未発表)。

3) Aurora B 活性を制御する経路について

われわれはセパレーズの条件的ノックアウトマウスを作成し、セパレーズはセントロメアの分離を担う唯一の酵素であり、生命の維持に不可欠であることを示した (Kumada et al., 2006)。このセパレーズのノックアウト細胞を調べると、Aurora B のセントロメア局在に異常はないものの、後期での微小管への移行が見られず、その際に起こる INCENP の脱リン酸化が阻害されていることが判明した。さらに INCENP の結合分子を探索したところ、脱リン酸化酵素の触媒ドメインを含むアミノ酸配列を持った新規のタンパク質を同定した (Kumada et al. 未発表)。総じて、中期から後期への移行時に「セパレーズ依存的に脱リン酸化酵素が活性化し Aurora B/CPC の局在および活性を制御する」経路の存在が示唆された。この経路によって後期特異的な微小管動態が制御されている可能性について鋭意解析を進めている。

IV 考察

本研究は、元をたどれば、分裂期の細胞に Aurora B の阻害薬を加えると、染色体が後期へと移行する途中で脱凝縮したクロマチンの塊と化してしまうことを、あるいは染色体が中期赤道面に整列できない形象を、私自身が見つけて非常な衝撃を受け、Aurora B の重要性を思い知らされたことに始まる。ここ 10 数年間の研究で、染色体を構築する分子群が同定され、染色体の形成から分配するまでの分子背景が解かれるようになってきた。染色体構築分子それぞれの動態に着目すると、「クロマチンに取り込まれる因子」と「クロマチンから取り除かれる因子」に大別できるが、本研究の成果に基づくと、これらの分子の結合と解離は Aurora B によって制御されているといえそうである。しかし、これで Aurora B の阻害による結果を説明できるようになったのであろうか？少なくとも本研究でクローズアップしたコンデンシや TopoII α が存在しなくとも、染色体の概形は大きく崩れないので、Aurora B によって制御を受けている染色体分子は未だ他に存在するはずである。あるいは、Aurora B によるヒストンのリン酸化は、HP1 α の解離を促進する以外にも、未知の意義を持っている可能性を、さらに追究しなくてはならない。

HP1 α は、コヒーシン同様に、Aurora B によってクロマチンから取り除かれる因子の一つであるが、除去された後に、今度は Aurora B と複合体を作ってセントロメアに局在し、正確な動原体と微小管の接続を保証するというのは驚きである。HP1 α がセントロメアから欠落すると、メロテリックな結合が多く起こるようになるが、その理由を追究することは、セントロメアの分子構造を解く重大な手掛かりとなると考えられる。つまり、動原体はセントロメアの外側に背合わせ構造をとって形成されるが、この構造がメロテリック結合の発生を空間的に防いでいる可能性、あるいは誤接続を修復する活性が低下している可能性、と少なくとも二通りのメカニズムを想定することができる。興味深いことに、このセントロメアにおける Aurora B の機能は、極めて低濃度の Aurora B 阻害薬に感受性があり、その結果、微小管の誤接続が頻発することが報告されたが

(Cimini et al., 2006)、本研究で見出した Aurora B と HP1 α との相互作用もこの低濃度の阻害薬によって抑えられることが判明している (Takagaki et al., 未発表)。HP1 α は分裂酵母でも正常な染色体分配に必須であることが知られていたことから、数多く存在するであろう Aurora B の関連分子の中でも特に重要で且つ普遍的な分子連係である可能性がある。

Aurora や Polo といった分裂期キナーゼは、がん遺伝子としての特性も有している。つまり、分裂期キナーゼをマウス線維芽細胞に過剰発現すると形質転換能を有するがん遺伝子としてふるまうことが示されている。実際に、分裂期キナーゼは様々なヒト癌組織において過剰発現することが知られ、その発現量が予後と相関している癌腫も報告されている。従って、分裂期キナーゼは癌の発生や進展に中心的な役割を担っていると考えられ、分子標的治療薬のターゲットとしても期待されているが、キナーゼの過剰発現がどのようにして細胞の悪性化に寄与するのか？という肝心なところは未だ分かっていない。分裂期の制御異常がもたらす染色体不安定性が細胞の形質転換と関与している可能性に加え、われわれは、がん細胞で分裂期以外の時期に、異所性に発現した Aurora キナーゼが、非生理的なタンパク質をリン酸化基質とし、その結果、細胞周期の回転を促進する可能性があることを報告した (Sasayama et al., 2005)。ごく最近、前立腺がんにおいて過剰なキナーゼの活性化によって過剰なヒストンのリン酸化が起こりうること、そしてその病的なヒストンのリン酸化が実際の癌腫の発生および進展の主因となっている可能性が示された

(Metzger et al., 2008)。このような例をみると、分裂期キナーゼの病理学的意義を考える場合には、非生理的な経路に依存して細胞が悪性化形質を獲得する可能性、すなわち、分裂期キナーゼ“アディクション”に陥って異常な増殖性を獲得している可能性を視野に入れることは重要であろう。

ゲノム学的解析によって得られたがんの遺伝子発現プロファイリング情報を俯瞰すると、がんは従来考えられていたように特定遺伝子の発現の亢進・抑制に起因しているというよりも、むしろ、その変化は多様性に富み、染色体全般で、生理的な遺伝子発現の“パターン”が崩壊した状態にあることが分かってきた。つまり、「細胞のがん化は遺伝子発現制御機構の破綻」という側面に着目すると、遺伝子発現を調節するエピジェネティクスが大々的に変化していると可能性がある。がん細胞ではゲノムの構造がどのように崩れているのかを解明することは、がんという疾患の病態を理解するための根本的な課題であると思う。エピジェネティクスは、現段階ではヒストンおよび DNA の化学修飾というレベルでの研究が盛んに進められているが、本研究で扱ったコンデンシン、コヒーシン、HP1 α といった「染色体構成因子群」は、ゲノムの構造変化をより広い範囲に波及しうる可能性がある。本研究で確立したヒト細胞におけるゲノム学的解析方法を適応すれば、“クロマチンの構造変化に基づいた遺伝子発現制御様式”の端緒が開かれることが期待される。そうなれば、がん細胞における分裂期キナーゼの質的量的異常が、クロマチン構造にいかなる異常をもたらすかを調べることも実現可能であるだろう。

本研究の最終的な狙いは、がんという疾患の本質を理解することにある。そのために、ここに得られた Aurora B による染色体の制御についての知見を基礎にして、Aurora B の関わる細胞の悪性化機構の解明、染色体不安定性と細胞がん化との関連性の解明、あるいは新たながんの分子診断法、分子標的治療法の開発に繋げなくてはならない。

最後に、本研究事業に貴重なご支援を賜りました、財団法人車両競技公益資金記念財団に深く感謝申し上げます。

V 研究成果の発表

<原著論文>

- 1) Gerlich, D., Hirota, T., Koch, B., Peters, JM., Ellenberg, J. (2006)
Condensin I stabilizes chromosomes mechanically through a dynamic interaction in living cells.
Curr Biol. 16: 333-344.
- 2) Kumada K, Yao R, Kawaguchi T, Karasawa M, Hoshikawa Y, Ichikawa K, Sugitani Y, Imoto I, Inazawa J, Sugawara M, Yanagida M, Noda T. (2006) The selective continued linkage of centromeres from mitosis to interphase in the absence of mammalian separase. *J Cell Biol.* 172: 835-846.
- 3) Ding, DQ., Sakurai, N., Katou, Y., Itoh, T., Shirahige, K., Haraguchi, T., Hiraoka, Y. (2006)
Meiotic cohesins modulate chromosome compaction during meiotic prophase in fission yeast.
J Cell Biol. 174: 499-508.
- 4) Gruber, S., Arumugam, P., Katou, Y., Kuglitsch, D., Helmhart, W., Shirahige, K., Nasmyth, K. (2006)
Evidence that loading of cohesin onto chromosomes involves opening of its SMC Hinge.
Cell. 127: 523-537.
- 5) Lengronne, A., McIntyre, J., Katou, Y., Kanoh, Y., Hopfner, KP., Shirahige, K., Uhlmann, F. (2006)
Establishment of sister chromatid cohesion at the *S. cerevisiae* replication fork. *Mol Cell.* 23: 787-799.
- 6) Nakajima, M., Kumada, K., Hatakeyama, K., Noda, T., Peters, JM., Hirota, T. (2007)
The complete removal of cohesin from chromosome arms depends on separase.
J Cell Sci. 120: 4188-96.
- 7) Lipp, JJ., Hirota, T., Peters, JM. (2007)
Aurora B controls the association of condensin I but not condensin II with mitotic chromosomes.
J Cell Sci. 120: 1245-1255.
- 8) Mori, S., Shirahige, K. (2007) Perturbation of the activity of replication origin by meiosis-specific transcription. *J Biol Chem.* 282: 4447-52.
- 9) Ström, L., Karlsson, C., Lindroos, HB., Wedahl, S., Katou, Y., Shirahige, K., Sjögren, C. (2007)
Postreplicative formation of cohesion is required for repair and induced by a single DNA break.
Science. 317: 242-5.
- 10) Munirajan AK, Ando K, Mukai A, Suenaga Y, Ohira M, Koda T, Hirota T, Ozaki T, Nakagawara A. (2008) KIF1Bbeta functions as a haploidinsufficient tumor suppressor gene mapped to chromosome 1p36.2 by inducing apoptotic cell death. *J Biol Chem.* 283: 24426-24434
- 11) Zhang D, Shimizu T, Araki N, Hirota T, Yoshie M, Ogawa K, Nakagata N, Takeya M, Saya H. (2008) Aurora A overexpression induces cellular senescence in mammary gland hyperplastic tumors developed in p53-deficient mice. *Oncogene* 27: 4305-4314.
- 12) Identification of cis-acting sites for condensin loading onto budding yeast chromosomes. (2008)
D'Ambrosio C, Schmidt CK, Katou Y, Kelly G, Itoh T, Shirahige K, Uhlmann F.
Genes Dev. 22: 2215-2227.

- 13) Condensin-dependent rDNA decatenation introduces a temporal pattern to chromosome segregation. (2008) D'Ambrosio C, Kelly G, Shirahige K, Uhlmann F. *Curr Biol.* 18: 1084-1089.
- 14) Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor. (2008) Wendt KS, Yoshida K, Itoh T, Bando M, Koch B, Schirghuber E, Tsutsumi S, Nagae G, Ishihara K, Mishiro T, Yahata K, Imamoto F, Aburatani H, Nakao M, Imamoto N, Maeshima K, Shirahige K, Peters JM. *Nature.* 451: 796-801.
- 15) Uchida, K.S.K., Takagaki, K., Kumada, K., Noda, T., Hirota, T. (2009) Kinetochores stretching inactivates the spindle assembly checkpoint. *J Cell Biol.* 184: 383-390.
- 16) Tanaka, K., Hirota, T. (2009) Chromosome segregation machinery and cancer. *Cancer Sci.* 100: 1158-1165.
- 17) Budding yeast Wpl1-Pds5 complex counteracts sister chromatid cohesion-establishing reaction. (2009) Sutani T, Kawaguchi T, Kanno R, Itoh T, Shirahige K. *Curr Biol.* 19: 492-497.
- 18) Ctf4 coordinates the progression of helicase and DNA polymerase alpha. (2009) Tanaka H, Katou Y, Yagura M, Saitoh K, Itoh T, Araki H, Bando M, Shirahige K. *Genes Cells.* In-press.
- 19) Ando, K., Ando, K., Ozaki, T., Bu, Y., Okoshi, R., Suenaga, Y., Hirota, T., Nakagawara, A. NFB1/MDC1 is phosphorylated by Plk1 and regulates G2/M transition in mammalian Cells. *Submitted.*
- 20) Takagaki, K., Uchida, K.S.K., Nakajima, M., Hirayama, Y., Hirota, T. Aurora B recruits heterochromatin protein 1 α to inner centromeres to promote biorientation in mitosis. *Submitted.*

<著書・和文総説>

- 1) 広田 亨 (2006) オーロラキナーゼによる染色体の制御. 細胞工学 25(5) 506-510
- 2) 広田 亨 (2006) ヒストンのリン酸化—動的エピジェネティクスをになう修飾. 実験医学 24: 1110-1116
- 3) Hoshi, O., Hirota, T., Kimura, E., Komatsubara, N., Ushiki, T. (2007) Immunocytochemistry for analyzing chromosomes. Chromosome Nanoscience and Technology pp.79-87
- 4) 榎本りま、広田 亨、園田英一朗、佐谷秀行 (2007) 細胞周期研究 細胞・培地活用反ドブック：特徴、培養条件、入手法などの重要データがわかる、東京、羊土社：pp20-27
- 5) 大石智一、清宮啓之、広田 亨 (2007) Aurora キナーゼによる分裂期微小管の制御. 細胞 39 (11) 482-486.
- 6) 広田 亨 (2007) 染色体の構築とその動態を制御する分裂期キナーゼ Aurora B. 実験医学 25: 704-711.
- 7) 中島真人、広田 亨 (2008) Aurora 阻害薬. 分子細胞治療 4 (6): 480-488.
- 8) 広田 亨, 進藤軌久 (2008) ヒストンのリン酸化によるクロマチンの制御. 実験医学 26: 1353-1358.
- 9) 進藤軌久、広田 亨 (2009) ヒストンの化学修飾：新たな標的エピジェネティクスを目指して. 臨床血液 50(4) 282-288.