

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18770188
 研究課題名 (和文) 染色体の配置変化をもたらすセントロメア蛋白質の制御メカニズム

研究課題名 (英文) Spatial control of chromosomes by centromere proteins

研究代表者

浅川 東彦 (ASAKAWA HARUHIKO)
 大阪大学・生命機能研究科・助教
 研究者番号：70399533

研究成果の概要：セントロメア蛋白質の消失は染色体の配置変化をもたらす。本研究ではセントロメア蛋白質消失の分子機構について解析をおこない、セントロメア蛋白質群が染色体配置変化の際に複合体単位で異なる挙動をすること、セントロメア蛋白質の消失にはフェロモンシグナル伝達経路が必要であることを明らかにした。さらに、全遺伝子の発現プロファイルを解析しセントロメア蛋白質が局在消失する際にのみ発現する遺伝子群を同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,100,000	0	2,100,000
2007年度	700,000	0	700,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	210,000	3,710,000

研究分野：生物学

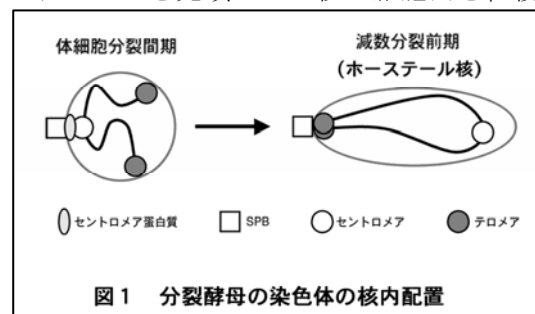
科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：核構造、減数分裂

1. 研究開始当初の背景

真核生物のゲノムは染色体に折りたたまれ細胞核に収納されている。細胞核はゲノム機能の発現のための物理的な足場を提供するが、一方で非常に動的な構造である。分裂酵母では、栄養増殖期と減数分裂期で核構造が劇的に変わることが知られており、核構造と細胞機能の連関を考える上で顕著なモデル実験系となる。分裂酵母の間期核ではセントロメアがスピンドル極体(SPB)の近くに集合しているが、減数分裂を誘導するとセント

ロメアは SPB から離れ、代りにテロメアが SPB 近くにクラスターを形成し、テロメアクラスターを先頭にして核が細胞内を往復



運動する (図 1)。その後起こる減数第一分裂では、姉妹動原体が体細胞分裂とは異なり一方向性の構造をもってスピンドル微小管と結合するために、姉妹染色分体が分離しないまま両極へ分配されるいわゆる還元分裂が起こる。これら一連の現象の中で、セントロメアが SPB から離れる際にセントロメア蛋白質の一群が減数分裂前期ではセントロメアから消失し、後に起こる減数第一分裂の直前に再出現する。興味深いことにこのセントロメア蛋白質の消失と再出現は減数第一分裂に必要な一方向性を持った動原体の構築と相関して起こる。これらの事実から、セントロメア蛋白質の消失・再出現と、セントロメアの核内配置変化および動原体形成を連係する機構の存在が示唆されるが、そのセントロメア蛋白質群の中でどの分子がどのような因子によって制御されるのかもわかっておらず、分子機構は不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的はセントロメア蛋白質の消失・再出現に必要な因子を同定し、セントロメアが SPB から解離する分子機構、さらには染色体の配置を定める分子機構を明らかにすることである。また、還元分裂に特異的な動原体形成への関与を明らかにすることによって、減数分裂における染色体配置変化と還元分裂に特異的な動原体形成をもたらす機構の解明にもつながるため、ゲノムの維持・継承原理の解明につながる減数分裂の分野においても有意義である。

3. 研究の方法

セントロメアが SPB から解離する機構を分子レベルで解明するため、セントロメア蛋白質群の動態を網羅的に解析すると同時にフェロモンシグナルの関与について検証しシグナル伝達経路の必要性を分子レベルで解析した。次にセントロメア蛋白質の局在消失に関わる遺伝子を同定するために、同調培養における全遺伝子の発現プロファイルを解析した。またセントロメアと SPB の解離を細胞内部の構造変化としてより高分解能で解析する目的でライブ CLEM 法の確立を目指し条件検討をおこなった。

(1) 分裂酵母セントロメア蛋白質群の動態解析

本研究の開始時点では様々な真核生物種でセントロメア蛋白質が網羅的に同定・報告されつつあり、どのようなセントロメア蛋白質がセントロメアと SPB の解離に関わっているのか明らかではなかった。そこでセントロメアが SPB から解離する際のセントロメア蛋白質の挙動を包括的に解析した。解析は生細胞蛍光イメージング法によっておこなった。試料としては GFP 融合遺伝子を染色体上に挿入した細胞株を用いた。

(2) フェロモンシグナルの関与

フェロモンシグナルの関与を検証するために、人工合成したフェロモン蛋白質の添加によってセントロメア蛋白質が消失し、セントロメアが SPB から解離するかを調べた。またフェロモンシグナルの伝達経路には MAP キナーゼのカスケードが関与することがわかっているため、MAP キナーゼ経路を遺伝子レベルで人為的に活性化して、セントロメア蛋白質が消失し、セントロメアが SPB から解離するかを調べた。さらに活性化した MAP キナーゼ経路をより下流の分子を遺伝子レベルで破壊することによって遮断することにより、MAP キナーゼ経路とセントロメア蛋白質の消失およびセントロメアと SPB の解離との因果関係を調べた。

(3) セントロメア蛋白質の局在消失を同調的に誘導する実験系の構築

DNA マイクロアレイによる全遺伝子の発現プロファイル解析をおこなうために、接合フェロモンのシグナルを活性化した細胞を使って、セントロメア蛋白質の消失を同調的に誘導できる遺伝的バックグラウンドをもった細胞株を構築した。この同調系でのセントロメア蛋白質の消失やセントロメアと SPB の解離の進行を解析した。

(4) セントロメア蛋白質の局在消失に関与する遺伝子のスクリーニング

(3) の同調系を用いて、フェロモンシグナルを活性化した細胞で特異的に発現する遺伝子を検索した。フェロモンシグナルを活性化した細胞と、活性化しない細胞から時間経過と共に細胞を回収して RNA を調製した。逆転写反応によって得られた cDNA を、分裂酵母の全 ORF をプローブにもつ DNA マイクロアレイによって解析した。マイクロアレイ解

析には独立行政法人情報通信研究機構・パイオ ICT グループが開発し所有する装置とプロトタイプを用いた。

(5) ライブ CLEM 法の開発

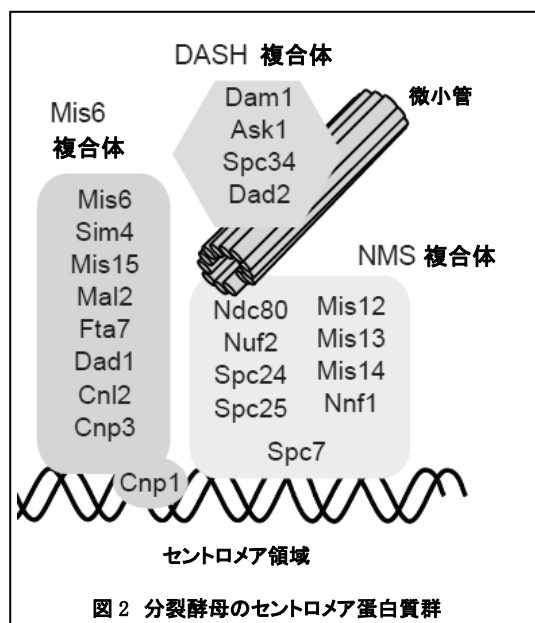
セントロメアの SPB からの解離を細胞内の構造変化として高分解能で観察する目的で、生細胞観察中の特定の細胞を電子顕微鏡でも観察する方法として、光学顕微鏡-電子顕微鏡相関解析法 (Correlative Light and Electron Microscopy) を分裂酵母の生細胞に適用することを試みた (ライブ CLEM 法)。蛍光顕微鏡で観察中の細胞を任意のタイミングでグルタルアルデヒドで固定し、脱水、樹脂包埋したのちに薄切し、透過型電子顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

セントロメア蛋白質の局在消失の分子機構について解析し以下の (1) から (4) の成果を得た。

(1) 分裂酵母セントロメア蛋白質群の動態解析

GFP 融合遺伝子を染色体上に直接挿入した細胞株を用いて 24 種類のセントロメア蛋白質の動態を解析した (図 2)。その結果、NMS 複合体と呼ばれる一群の蛋白質 (Mis13, Mis14, Nnf1, Spc7, Ndc80-Nuf2 複合体, Mis12) が、セントロメアが SPB から解離する時期に局在消失することがわかった。また、DASH 複合体と呼ばれる一群の蛋白質 (Dam1, Ask1, Spc34, Dad2) は体細胞分裂でも減数分



裂でも分裂中期までは出現しないことがわかった。また Mis6 複合体 (Mis6, Dad1, Fta7, Mal2, Mis15, Sim4, Cnp1, Cnp3, Cnl2) は、セントロメアが SPB から解離しているときにもセントロメアに局在していた。DASH 複合体は体細胞分裂においても分裂中期の頃からセントロメアに局在することから、キネトコアと微小管の結合に関与していることが想像されるが、NMS 複合体と Mis6/Sim4 複合体は体細胞分裂では挙動に大差がない。本研究によってセントロメアと SPB が解離する際には NMS 複合体が消失し Mis6/Sim4 がセントロメアにとどまることが明らかとなり、両者の機能分担が明らかとなった。また減数分裂特異的に発現するセントロメア蛋白質として Moa1, Sgo1 の動態解析もおこなった。減数第一分裂直前に局在消失していた NMS 蛋白質群はセントロメアに再び局在するが、NMS 複合体の中でも再局在化のタイミングは蛋白質種によって異なる。また Moa1 や Sgo1 は NMS 複合体に先立ってセントロメアに局在化する。再局在化のタイミングの違いはキネトコア形成の分子機構を反映していると考えられる。

(2) フェロモンシグナルの関与

先行研究により、フェロモンシグナル経路の活性化が、セントロメア蛋白質の局在消失をもたらすことが示唆されていた。フェロモンのシグナルは MAP キナーゼのカスケードを介して下流に伝わる。まず、人工合成したフェロモンを細胞培養液に添加し、セントロメア蛋白質が局在消失するか、またセントロメアが SPB から解離するのかを検証した。局在消失するセントロメア蛋白質として Nuf2、セントロメアのマーカーとして Mis6、SPB のマーカーとして Sad1 を用いて解析したところ、フェロモンを添加することにより、Nuf2 が局在消失し、セントロメアが SPB から離れて局在することがわかった。次に活性化型の MAP キナーゼキナーゼを強制的に発現させたところ、フェロモンを添加しなくてもセントロメア蛋白質が消失し、セントロメアが SPB から解離した。この現象はさらにその下流の MAP キナーゼキナーゼに依存した。これらのことから、フェロモンシグナルが下流の MAP キナーゼのカスケードを介して伝わることによって、セントロメアタンパク質の局在消失とセントロメアの SPB からの解離が

もたらされることが明らかとなった。

(3) セントロメア蛋白質の局在消失を同調的に誘導する実験系の構築

フェロモンシグナルがセントロメア蛋白質の消失をもたらす機構を解明するために、まず接合フェロモンのシグナルを活性化した細胞を使って、セントロメア蛋白質の消失を同調的に誘導できる遺伝的バックグラウンドをもった細胞株を構築した。セントロメア蛋白質の局在をモニターするために GFP 融合 *nuf2* 遺伝子または GFP 融合 *Mis13* 遺伝子をそれぞれ本来の遺伝子座に挿入して置き換えてある。この細胞を増殖培地から窒素源飢餓培地に移すと、*Nuf2*-GFP のシグナルをもった細胞の割合が 4 時間で 50%、8 時間で 10%にまで低下していた。GFP-*Mis13* をマーカーとしてもつ細胞でも同様であった。この実験系でのセントロメアの挙動を *Mis6* をマーカーとして観察したところ、*Nuf2* や *Mis13* のセントロメア局在がなくなると同時にセントロメアがクラスターした状態から核内に離散した状態になることがわかった。

(4) セントロメア蛋白質の局在消失に関する遺伝子のスクリーニング

(3) の同調系を用いて、フェロモンシグナルを活性化した細胞で特異的に発現する遺伝子を検索した。方法としては、接合フェロモンのシグナルを活性化した条件下で発現誘導される遺伝子群を DNA マイクロアレイによる発現プロファイル解析によって選んだ。フェロモンシグナルを活性化した細胞と、活性化しない細胞を窒素源飢餓培地に移し、時間経過と共に細胞を回収して RNA を調製した。逆転写反応によって得られた cDNA を、分裂酵母の全 ORF をプローブにもつ DNA マイクロアレイによって解析し、フェロモンシグナルを活性化した場合にのみ発現誘導される遺伝子を同定した。さらに同定した遺伝子群について、コントロール細胞との発現量の差異によってクラス分けをおこなった。コントロール株と比べて発現量が増加する遺伝子の中から、増殖に必須の遺伝子や代謝に関連する遺伝子を除いた 56 個の遺伝子を同定した。

(5) ライブ CLEM 法の開発

試験段階として減数分裂中の任意の細胞

を蛍光顕微鏡で観察し、任意のタイミングでグルタルアルデヒドで固定し、脱水、樹脂包埋したのちに薄切し、透過型電子顕微鏡で観察した。その結果、蛍光顕微鏡による観察像に相当する細胞を電子顕微鏡で観察でき、蛍光画像と関連した細胞内部構造を観察することができた。この方法を用いれば、蛍光色素による観察から出発して細胞の超微細構造までもが観察できるため、今後の細胞核構造の解析に役立つことが期待される。

以上の成果のうち、セントロメア蛋白質群の動態に関する成果を *Mol. Biol. Cell* 誌に、セントロメア蛋白質の局在消失の分子機構に関する成果を *Cell Division* 誌に、分裂酵母の減数分裂に関する成果を *Mol. Biol. Cell* 誌に投稿し、掲載された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- (1) Nakamura T, Asakawa H, Nakase Y, Kashiwazaki J, Hiraoka Y, Shimoda C. Live observation of forespore membrane formation in fission yeast. **Mol. Biol. Cell.** **19(8)**: 3544-3553. (2008) 査読有
- (2) Asakawa H, Haraguchi T, Hiraoka Y. Reconstruction of the kinetochore: a prelude to meiosis. **Cell Div.** **2**: article17 (online journal). (2007) 査読有
- (3) Hayashi A, Asakawa H, Haraguchi T, Hiraoka Y. Reconstruction of the kinetochore during meiosis in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Mol. Biol. Cell** **17**: 5173-5184. (2006) 査読有

[学会発表] (計 16 件)

国際会議

- (1) Asakawa H 他 2 名 Pheromone signal induces removal of centromere proteins in fission yeast. 8th European Meiosis Meeting in Japan (EMBO workshop on meiosis) (Sep.

13-18(14), 2007), Shonan Village, Hayama, Japan

- (2) Asakawa H他1名 Pheromone signal induces removal of centromere proteins in fission yeast. The fourth international fission yeast meeting Pombe 2007 (Jun. 13, 2007), Institute of Public Health, Copenhagen, Denmark
- (3) Asakawa H他3名 Dissociation of the Nuf2-Ndc80 complex releases centromeres from the spindle-pole body under mating pheromone signaling in fission yeast meiosis. The 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (Jun. 23, 2006), Kyoto International Conference Hall, Kyoto, Japan

国内学会発表

- (1) Hiraoka Y他4名「Chromatin and nuclear structures in fission yeast.」BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会) (2008年12月10日) 神戸ポートアイランド、神戸市
- (2) 浅川東彦他3名「分裂酵母における核膜孔複合体蛋白質の生細胞観察」BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会) (2008年12月9日) 神戸ポートアイランド、神戸市
- (3) 原口徳子他8名「Live CLEM法により明らかになった核膜と核膜孔複合体のダイナミクス」文部科学省科学研究費補助金 特定領域研究「細胞核ダイナミクス」第5回班会議 (2008年10月28日) 京都ガーデンパレス、京都市
- (4) 浅川東彦他3名「分裂酵母における核膜孔複合体蛋白質の生細胞観察」第60回日本細胞生物学会大会(2008年7月1日)、パシフィコ横浜、横浜市
- (5) 原口徳子他9名「Live CLEM法: 生細胞蛍光イメージングと電顕像の対応」第60回日本細胞生物学会大会 (2008年6月29日) パシフィコ横浜、横浜市
- (6) 浅川東彦他5名「ライブ CLEM法による分裂酵母の減数分裂期核膜の観察」日本

顕微鏡学会第64回学術講演会 (2008年5月21日)、国立京都国際会館、京都市

- (7) 浅川東彦他3名「分裂酵母の減数第二分裂で見られる核膜消失を伴わない核膜透過性の調節」第25回染色体ワークショップ (2008年1月31日) ウェルシテイ湯河原(湯河原厚生年金会館)、静岡県熱海市
- (8) 原口徳子他9名「テトラヒメナ大核と小核の機能分化に働く核膜孔複合体構造」第25回染色体ワークショップ (2008年1月30日) ウェルシテイ湯河原(湯河原厚生年金会館)、静岡県熱海市
- (9) 原口徳子他9名「増殖分裂と減数分裂における核膜と核膜孔複合体ダイナミクス」第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会大会・合同大会 (2007年12月13日) パシフィコ横浜・ヨコハマグランドインターコンチネンタルホテル、横浜市
- (10) Hayashi A他3名「Kinetochores reorganization during meiosis in fission yeast.」日本分子生物学会第7回春期シンポジウム (2007年4月23日) 淡路夢舞台国際会議場、淡路市
- (11) 林 亜紀他3名「減数分裂前期での分裂酵母セントロメア蛋白質の再構築」日本分子生物学会 2006 フォーラム (2006年12月7日) 名古屋国際会議場、名古屋市
- (12) 林 亜紀他3名「減数分裂前期での分裂酵母セントロメア蛋白質の再構築」第39回酵母遺伝学フォーラム研究報告会 (2006年7月16日) 東レ総合研究センター、三島市
- (13) 大西雅之他6名「分裂酵母の胞子形成時にセプチンが果たす役割」第39回酵母遺伝学フォーラム研究報告会 (2006年7月16日) 東レ総合研究センター、三島市

〔図書〕 (計2件)

- (1) 平岡 泰、浅川東彦、林 亜紀 (2007) 染色体ダイナミクス. 「酵母のすべて」(大隅良典、下田親 編) シュプリンガー・フェアラー東京 55-60.
- (2) 浅川東彦、平岡 泰 (2006) 減数分裂と染色体動態. 「細胞核の世界」(米田悦啓、木村宏、五十嵐和彦、中尾光善 編) 蛋白質核酸酵素 **51 (14)**: 2159-2164.

[その他]
ホームページ等
<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labo/35a.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浅川 東彦 (ASAKAWA HARUHIKO)
大阪大学・大学院生命機能研究科・助教
研究者番号：70399533

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし