

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570161

研究課題名（和文） クロモキネシン Kid による分裂後期コンパクションの分子メカニズムと意義に関する研究

研究課題名（英文） Molecular mechanism of Kid-mediated anaphase chromosome compaction

研究代表者

大杉 美穂（OHSUGI MIHO）

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：00332586

研究成果の概要（和文）：

キネシン様モーター分子 Kid は分裂期を通して複数の役割をもつ。そのひとつが細胞分裂期に2つの娘細胞に分配された何十本もの染色体を、1つの核の中に収めるために一塊にする「分裂後期染色体コンパクション活性」の発揮である。本研究を通し、この活性には Kid の染色体結合能力が必須であり、また Kid のモーター活性、多量体を形成する能力、強い微小管結合能力の抑制が重要であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The chromokinesin Kid/kinesin-10 is a multifunctional mitotic motor protein. Kid mediates tight clustering of anaphase chromosomes, which is important for the formation of daughter nuclei that enclosed entire set of segregated chromosomes. In this study, we showed that DNA-binding activity is essential and motor and oligomerization activities are important for the Kid-mediated anaphase chromosome compaction.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：染色体分配、核形成、キネシンファミリー分子

1. 研究開始当初の背景

すべての染色体が分裂終期に1つの娘細胞核内に納まることは、ゲノムの維持に重要である。また、核膜や核の構造は遺伝子発現にも影響を与えることから、分化や細胞特性の維持という観点からも重要であると考えられている。研究開始当初は、分裂後期染色体

の凝集の維持や後期染色体コンパクション(anaphase chromosome compaction)と呼ばれる現象が、平滑な核膜を持つ正常な娘核形成に重要であることがわかってきていた。しかし、特に分裂後期染色体コンパクションを担う分子メカニズムやその生理的意義はほとんど不明であった。

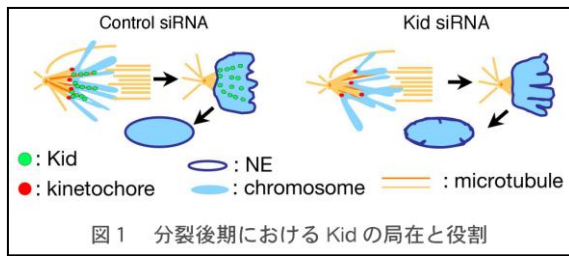


図1 分裂後期における Kid の局在と役割

クロモキネシン Kid/Kinesin-10 は染色体結合部位、微小管結合部位をもつプラス端指向性モーター分子である。分裂中期までは染色体腕全体および紡錘体微小管全体に局在し、染色体腕の中期板整列、紡錘体長（極間距離）の維持に寄与している。

研究開始当時、研究代表者らは HeLa 細胞を用いた RNAi による発現抑制実験の結果から、分裂後期の Kid は隣接する染色体の間隙に集積し、核膜形成時の分裂後期染色体コンパクションを担っていることを見出していた（図1）。更に、Kid 欠損マウスの作製・解析を行い、Kid 欠損による分裂後期染色体コンパクションの抑制は、体細胞分裂や減数分裂そのものには大きな影響を与えないが雌前核形成と、初めの数回の卵割分裂終期の娘核形成時にのみ高頻度に karyomere 様の多核化を引き起こし、多核化胚は桑実胚期に致死となることを見いだしていた（図2）。以上の研究成果は、分裂後期染色体コンパクションを担う分子の初めての同定であると共に、分裂後期染色体コンパクションの生理的意義を初めて明らかにしたものである。しかし、Kid がどのようにして分裂後期染色体コンパクションを引き起こすのか、そのメカニズムについては不明であった。

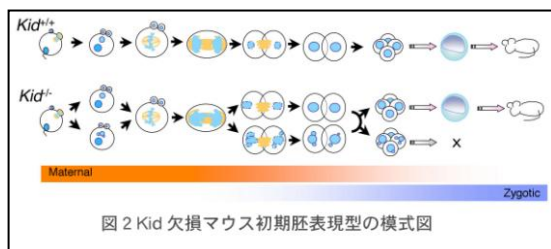


図2 Kid 欠損マウス初期胚表現型の模式図

2. 研究の目的

遺伝情報を正しく分裂後の娘細胞へと受け継ぐ為には、分配された1組の染色体すべてが1つの娘細胞核内に収まることが重要である。研究代表者は分裂期モーター、クロモキネシン Kid/Kinesin-10 が分裂後期染色体コンパクションと呼ばれる染色体の一塊化を担うことで、正常な核形成を保証していることを明らかにした。本研究は Kid が分裂後期染色体コンパクションを引き起こすメカニズム、すなわち、(1) Kid のどのような活性を利用して、(2) どのような染色体の動態を制御することで分裂後期染色体コンパクションを担っているのかを明らかにすることを通し、“染色体セットをすべて内包する核形成”を担う分子レベルでのメカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

RNAi により Kid を発現抑制した HeLa 細胞や、Kid 欠損マウスから得た MEF (マウス胎児繊維芽細胞) あるいは初期胚に対し、野生型および各種変異型 Kid を発現させるレスキュー実験を行うことにより、Kid による分裂後期染色体コンパクションが、Kid のどのような活性を利用しているのかを検討した。卵や初期胚へは polyA 付加 RNA をインジェクションすることにより、目的タンパク質を発現させた。また、Kid がどのような染色体の動態を制御することで担われているのか、を検討するため、マウス卵における減数第二分裂後期の染色体動態についてライブイメージング観察による詳細な解析を行った。

4. 研究成果

(1) Kid はどのような活性を利用して分裂後期染色体コンパクションを引き起こしているか

Kid はアミノ末端側にプラス端指向性キネシン様モーター領域を、カルボキシル末端側に DNA 結合領域を、中央部分にはコイルドコイル領域をもつ。モーター領域とコイルドコイル領域の間には、モーター領域とは独立に第二微小管結合領域が存在し、Kid 分子全体としての微小管結合能を高めている (図 3)。第二微小管結合領域の近傍にある Thr463 は、分裂前中期、中期においては Cdc2/cyclin B によりリン酸化されるが、このリン酸化は第二微小管結合領域の微小管結合能を抑制する。この抑制は Kid が分裂前中期、中期において正しく染色体局在し、polar ejection force (染色体を紡錘体極から紡錘体中央領域に向かって押す力) を発揮するために必須である。また、コイルドコイル領域に関しては、この領域を欠損しても Kid は微小管上を動くことが可能であること、またこの領域を介して多量体化し得ることを見出していた (一部未発表データ)。

そこで、Kid による分裂後期染色体コンパクション能に、a) モーターとしての運動能、b) Kid に高い微小管結合能を与える第二微小管結合部位 c) コイルドコイル領域を介した多量体化能 d) 染色体結合能、が必要かどうかを検討するため、Kid 欠損細胞に対しそれぞれの能力を欠損した変異体を発現させ、レスキュー能を検討した。



図3 Kidの模式図と各領域

まず、Kid を発現抑制した HeLa 細胞あるいは Kid 欠損マウス胚由来の MEF を用いた解析に

着手したが、外来性 Kid の発現量の制御が困難であり、また Kid の過剰発現は容易に細胞の核構造や微小管ネットワークに以上を引き起こすことから、信頼性のあるデータを得ることは難しいとの結論に至った。

次に、Kid 欠損雌マウス由来の未受精卵を用いたアッセイ系の確立に着手した。Kid 欠損雌マウス由来 1 細胞期胚では高頻度に雌性前核が多核化することから、Kid 欠損未受精卵を Sr^{2+} 処理により人工的に活性化し、雌性雌性前核形成および第二極体放出を誘導したところ、精子核の関与がなくても雌性前核が高頻度に多核化することを見出した。この過程を HistoneH2B-mRFP1 を発現させ、染色体を可視化した卵を用い、スピニングディスク共焦点顕微鏡下において 5 分おきのタイムラプス観察を行ったところ、野生型卵ではすべての胚が 1 核の雌性前核を形成したのに対し、Kid 欠損卵では 75%以上が雌性前核の多核化を示した。従って、多核化の抑制を見ることにより、外来性の変異型 Kid によるコンパクション能を測ることが可能な系であることが明らかとなった。また、EGFP を付加した Kid を発現させ、EGFP の強度を指標に RNA 濃度を調節することで外来性 Kid の発現量の制御が可能であった。EGFP を付加した野生型 Kid を Kid 欠損卵に発現させ、雌性前核多核化抑制能を指標に発現量を検討したところ、多核化する卵を 1.7%にまで抑制することが可能な条件を確立できた。その結果、Kid の染色体結合領域は必須であること、またモーター領域は必須であるが、モーターとしての運動活性は重要であるものの必須ではないことが明らかとなった。更に、Kid は分裂前中期、中期には polar ejection force を発揮しているが、polar ejection force が発揮されたままの場合、分裂後期の染色体分配運動が阻害されることが明らかとなった。

すなわち、polar ejection force は分裂後期に移行する際に抑制がかかる必要があり、その抑制にはKidの第二微小管結合領域の活性およびコイルドコイル領域が必須であることがわかった。これらの領域は、染色体コンパクションに対しても重要な領域であることが示唆されており、現在検討を続けている。

(2) Kid はどのような染色体の動態を制御することで分裂後期染色体コンパクションを担っているか

Kid による分裂後期染色体コンパクションメカニズムとして、a)染色体腕の短縮 b)隣接する染色体の接着の二つが主要な候補として考えられた。野生型および Kid 欠損卵に HistoneH2B-mRFP1 を発現させて染色体を可視化し、Sr²⁺処理によって減数第二分裂後期開始を誘起し、染色体動態のタイムラプス観察を行った。その結果、野生型では染色体分配後、前核形成が開始されるまでの間も染色体はコンパクトな一塊として存在していたが、Kid 欠損卵では分配直後の染色体のまとまりが悪いことに加え、前核形成前に染色体が個々に細胞質中へと散らばる様子が高頻度に観察された。従って、少なくとも卵減数第二分裂後期～全核形成に至る過程においては、b) の隣接する染色体の接着を担うというメカニズムが存在することが強く示唆された。

これらの結果から、Kid が分裂後期染色体コンパクションを担うメカニズムとして、分裂後期の染色体間隙に局在し、隣接する染色体の接着を担うことで染色体間距離を減少させ、一塊化を担うというものが示唆された。このはたらきには、コイルドコイル領域を介したKidの多量体化が重要であると考えられ

た。更に、Kid は分裂期を通して複数の役割を担う多機能分子であるが、各機能が適切な時期に発揮されるようリン酸化などを通して厳密に制御されていることが明らかとなった。以上の結果は更に詳細な解析を加えたのち論文として発表する予定であり、そのための準備を行っている。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計7件)

- ① 大杉美穂 マウス前核形成開始タイミングの特殊性 第51回日本哺乳動物卵子学会 2010/5/29 新潟
- ② 大杉美穂 マウス卵における減数第二分裂後期の染色体分配と前核形成の特性 第32回日本分子生物学会年会 2009/12/10 横浜
- ③ 大杉美穂 マウス初期胚における染色体分配と核形成の特性 第82回日本生化学会大会 2009/10/21 神戸
- ④ 大杉美穂 哺乳動物初期胚分裂期の特性 第21回高遠シンポジウム 2009/8/27 伊那
- ⑤ 大杉美穂 Kid-Mediated Anaphase Chromosome Compaction Safeguards Mouse Early Embryos Against Multinuclear Formation The 3rd Asian Chromosome Colloquium 2008 2008/12/3 大阪
- ⑥ 大杉美穂 クロモキネシン Kid による核膜形成制御 第67回日本癌学会学術総会 2008/10/28 名古屋
- ⑦ 大杉美穂 KID-MEDIATED ANAPHASE CHROMOSOME COMPACTION ENSURES MOUSE EARLY EMBRYOS AGAINST MULTINUCLEAR FORMATION 第3回遺伝研国際シンポジウム 2008/05/26 三島

[その他]

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/gannsig/member/ohsugi/MphaseGroup/TOP.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大杉 美穂 (OHSUGI MIHO)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：00332586