

平成22年 5月27日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20770143

研究課題名（和文） 染色体一本化細胞を利用したキネトコア蛋白質の機能同定

研究課題名（英文） Functional analysis of kinetochore proteins by utilizing engineered fission yeast cells harboring a single chromosome.

研究代表者

齋藤 成昭 (SAITOH SHIGEAKI)

久留米大学・分子生命科学研究所・准教授

研究者番号：30352123

研究成果の概要（和文）：

キネトコアは染色体分配の要となる巨大分子複合体です。本研究では、全ゲノムを1つの染色体上に集約させた「染色体1本化細胞」を作成し、それを利用してキネトコアの構造や、構成タンパク質の機能を解析しました。有糸分裂期のキネトコアは、「ヘテロクロマチン」とよばれる部位を芯にして、その両端に中央領域が突き出したような構造をとっていました。この構造が、染色体を均等に分配するために重要であると考えられました。

研究成果の概要（英文）：

Kinetochore is a multi-protein complex essential for chromosome segregation. In this research, we constructed “single-chromosome fission yeast”, in which all the genomic information is put together on one chromosome. By utilizing this yeast strain, we found that mitotic kinetochore take a special architecture, in which the central domain of the centromere protrudes from the both sides of the “core” consisting of the heterochromatin. We speculate that this special architecture is vital for equal separation of replicated chromosomes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生命科学・分子生物学

キーワード：染色体、キネトコア、有糸分裂

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報を担う染色体はS期に複製され、M期（有糸分裂期）に娘細胞へと均等に分配されます。この染色体分配の過程において重

要な役割を担うのが、分配装置である紡錘体（スピンドル）と、動原体（キネトコア）です。動原体は、染色体上のセントロメアとよばれる部位に複数のタンパク質が集合して

形成される構造体であり、M期には紡錘体を構成する微小管と結合します。動原体は、いわば染色体と紡錘体をつなぐインターフェースです。動原体は、単なる微小管との接合部位ではなく、微小管にそって染色体を牽引する駆動装置であり、また染色体分配の均等性を保証する制御装置でもあります。

近年、出芽酵母や分裂酵母あるいはヒト培養細胞をもちいたプロテオミクスの解析により、キネトコアを構成するタンパク質群が網羅的に同定されてきました（たとえば、Cheeseman et al, 2002年, *Cell*, vol.111, 163-172）。それらの多くは、生物種を通じて保存されていることが明らかとなりましたが、それぞれの分子機能に関してはほとんど何もわかっていませんでした。

一方、我々は、分裂酵母を用いた遺伝学的・細胞学的解析により、Mis6 とよばれるキネトコア構成タンパク質を同定し、その変異体の解析より Mis6 が染色体の「均等」な分配に必須であることを明らかにしていました (Saitoh et al, 1997年, *Cell*, vol.90, 131-143)。mis6 変異細胞では、複製された染色体が不均等に娘細胞へと分配され、致死的な異数体が高頻度で生じます。しかしながら、驚くべきことに、この変異体中では、不均等にはなるものの、すべての染色体は紡錘体によっていずれかの娘核へと運ばれます。すなわち、mis6 変異細胞のキネトコアは、染色体分配の均等性を保証する制御機能は失っているものの、紡錘体微小管との付着部位としての機能や、あるいは駆動装置としての機能は失っていないものと推察されました。

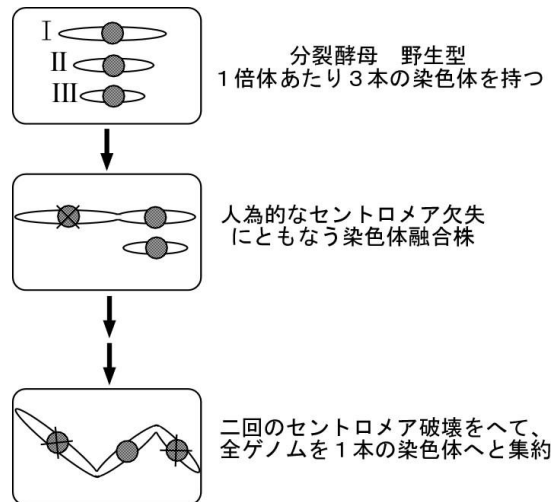
2. 研究の目的

キネトコアの必須機能を考慮すると、キネトコア構成タンパク質の大部分は、**A) 紡錘体との結合に必須か、B) 染色体の牽引に必須か、あるいは、C) 分配の均等性保証に必須か、**のいずれかに分類できるものと予想されました。そこで本研究では、それぞれのキネトコアタンパク質がA) ~C) のどの機能に関わっているかを解明するための新たなシステムを開発し、さらにそのシステムを用いて実際にキネトコアタンパク質の機能を解き明かすことを目指しました。

3. 研究の方法

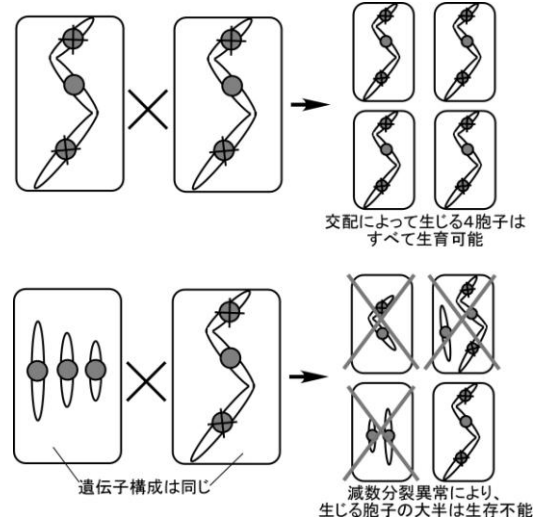
もし、あるキネトコアタンパク質が上述の**C) 染色体分配の均等性保証に関わっている**とすると、そのキネトコアタンパク質遺伝子を破壊すると、高頻度で異数体細胞が生まれるものと予想出来ます。実験モデルに用いた分裂酵母では、異数体の大半は致死的ですが、この致死性がタンパク質機能の詳細な解析を妨げていました。しかしながら、もしも酵母ゲノムを1本の染色体上に集約する

ことができれば、仮にその染色体が不均等に分配されたとしても、生存可能な倍体細胞が生じるだけで、異数体は決して生じないと考えられます。そこで、当研究室において見出されていた「人為的セントロメア破壊にともなう染色体融合」現象 (Ishii et al. *Science*, 321:1088-1091(2008)) を応用して、すべての染色体を融合して1本化することを試みました。さらに、その「染色体1本化酵母細胞」中で、キネトコア関連タンパク質を欠落させた場合にどのような異常が引き起こされるのかを解析しました。



4. 研究成果

研究はおおむね計画通りに進行しました。まず、「染色体1本化細胞」の樹立に成功しました。細胞学的観察およびパルスフィールド電気泳動によって、確かに染色体数が1であることを確認しました。驚くべきことに、染色体1本化細胞は、若干の細胞周期遅延を示すものの、おおむね正常に増殖しました。また、1本化細胞同士の交配では、減数分裂も正常に進行し、生育可能な孢子が形成されました。しかしながら、1本化細胞と通常細胞



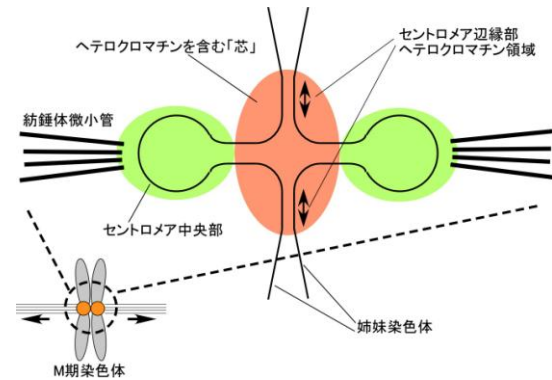
胞の交配で生じた胞子の生存率は極めて低下していました。この結果は、染色体構成の変化が、「遺伝的隔離」を引き起こすことをしめしています。なお、遺伝的隔離は生物進化の原動力であると考えられています。

次に、染色体一本化細胞中で、*mis6* 遺伝子を破壊しました。*Mis6* タンパク質は、進化的に保存されたキネトコア構成タンパク質で、「染色体分離の均等性保証」に関わっていると考えられています。当初、*mis6* 破壊染色体一本化細胞は生育可能だろうと予想していました。しかしながら、予想に反して致死となりました。致死表現型を解析したところ、M 期中期で停止している細胞が多く観察されました。この結果は、*Mis6* が、染色体分離の均等性保証以外にも、紡錘体と染色体の結合や、あるいは染色体の牽引といった過程にも関与していることを示唆していました。

mis6 とは対照的に、*swi6* あるいは *clr4* 遺伝子を破壊した染色体一本化細胞は生育可能でした。*Swi6* および *Clr4* は、セントロメア辺縁部のヘテロクロマチン構造の形成に関与していることが知られています。遺伝子破壊細胞の FACS 解析を行ったところ、興味深いことに、両遺伝子を破壊した一本化細胞では高頻度で 2 倍体、3 倍体細胞が生じていました。仮説に基づいて判断すると、これらのタンパク質は、「染色体分配の均等性保証」に関わっているだろうと推定できます。この結果は、セントロメア辺縁部ヘテロクロマチンの生理的役割を示唆しています。

研究の過程で、染色体一本化細胞は、キネトコア構造・動態の細胞学的観察にも最適であることに気づきました。キネトコアを細胞学的に観察する際には、GFP などキネトコア構成タンパク質を蛍光標識して、その蛍光像を解析します。通常の細胞では、複数のキネトコアがあるために、複数の蛍光シグナルが観察されることになり、染色体分離 (=キネトコア分離) のタイミングを正確に判定することが容易ではありません。しかしながら、一本化細胞にはキネトコアが 1 つしか存在しないため、そのような解析が極めて容易になります。この性質を利用して M 期におけるキネトコア動態を解析したところ、キネトコア中央部は、M 期のかかなり初期の段階から分離していることが分かりました。それに対して、ヘテロクロマチン領域は、M 期後期になるまで分離せず、姉妹染色体をしっかりと結びつけているようでした。したがって、M 期初期～中期においては、ヘテロクロマチンを“芯”にして、その両側にキネトコア中央部が飛びだしたような構造が観察されます。そのような構造が、染色体分配の均等性を保証する上で重要なのではないかと考えていま

す。



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 K. Maehara, K. Takahashi, S. Saitoh, CENP-A reduction induces a p53-dependent cellular senescence response to protect cells from executing defective mitoses, *Molecular and Cellular Biology*, 30; 2090-2104 (2010) 査読有り

② Y. Takayama, Y.M. Mamnun, M. Tricky, S. D. hunt, F. Masuda, H. Yamano, T. Toda, S. Saitoh, Hsk1- and SCF^{Pof3}-dependent proteolysis of S. pombe Ams2 ensures histone homeostasis and centromere function, *Developmental Cell*, 18;385-396 (2010) 査読有り

③ S. Saitoh, Y. Kobayashi, Y. Ogiyama, K. Takahashi, Dual regulation of Mad2 localization on kinetochores by Bub1 and Dam1/DASH that ensure proper spindle interaction, *Molecular Biology of the Cell*, 19;3885-3897 (2008) 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

① 齋藤成昭, 副島朗子、荻山友貴、石井浩二郎、高橋考太、「染色体一本化酵母を利用したキネトコア動態の解析」、第 26 回染色体ワークショップ、2009 年 1 月 26-28 日、兵庫県姫路市

② S. Saitoh, S. Soejima, Y. Ogiyama, K. Ishii, K. Takahashi, Construction of single-chromosome fission yeast, The 4th international fission yeast meeting, 2009 年 10 月 26-31 日、東京都

[その他]

ホームページ

http://www.lsi.kurume-u.ac.jp/cell_biology/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤成昭 (SAITOH SHIGEAKI)

久留米大学・分子生命科学研究所・准教授

研究者番号：30352123

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし