

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2011

課題番号：23870005

研究課題名（和文） Bub1 キナーゼの動原体局在化機構

研究課題名（英文） Molecular mechanisms underlying the kinetochore localization of Bub1

研究代表者

山岸 有哉 (YAMAGISHI YUYA)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：30613096

研究成果の概要（和文）：Bub1 は、分裂期において動原体に局在し、正確な染色体分配に必要なキナーゼである。Bub1 がその機能を果たすためには、動原体へと局在化することが必須であるが、その動原体局在化機構は不明な点が多かった。本研究によって、Mps1 と呼ばれる進化的に保存されたキナーゼが、動原体の構成タンパク質である Spc7 をリン酸化し、そのリン酸化が Bub1 と Spc7 との相互作用を促進することで、Bub1 が動原体へと局在するということが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Bub1 is a conserved kinase which has roles in faithful chromosome segregation. Bub1 localizes at kinetochores in M-phase and this kinetochore localization is essential for its function. However the mechanisms underlying the kinetochore localization of Bub1 remained largely unknown. In this study, we showed that another conserved kinase Mps1 phosphorylates the kinetochore protein Spc7. This phosphorylation promotes the interaction between Bub1 and Spc7, resulting in the kinetochore localization of Bub1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
年度			
総計	1,300,000	390,000	1,690,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：分子生物学

キーワード：染色体分配、分裂酵母、紡錘体チェックポイント

1. 研究開始当初の背景

(1) Bub1 は、分裂期において動原体に局在する真核生物に広く保存されたキナーゼである。Bub1 は、動原体に局在することでセントロメア周辺のヒストン H2A をリン酸化し、それによって正確な染色体分配に必要なタンパク質シュゴシンのセントロメア局在を促す機能があることが知られていた。また、シュゴシン非依存にも、動原体と紡錘体微小

管の接着を制御したり、動原体と微小管が正しく接着するまで細胞周期の進行を阻害する紡錘体チェックポイントに寄与したりすることで、染色体分配を制御することも知られていた。いずれの機能を果たす際も Bub1 は動原体に局在している必要があると考えられるが、その動原体局在化機構は不明な点が多かった。

(2) Bub1 の動原体局在に必要な因子として Bub1 と複合体を形成する Bub3、動原体構成因子である Spc7、そして真核生物に広く保存されたキナーゼ Mps1 が知られていた。

(3) 研究代表者らのこれまでの研究から、分裂酵母の Mps1 ホモログ Mph1 が、*in vitro* で Spc7 をリン酸化し、そのリン酸化部位を非リン酸化型にした変異型 Spc7、*spc7-12A* 発現細胞では、Bub1 の動原体局在が失われることが分かっていた。

2. 研究の目的

上記した予備的結果を踏まえて、本研究では、Mph1 による Spc7 のリン酸化が Bub1 の動原体に果たす役割をより詳細に解明することを目的とした。具体的には、Spc7 が *in vivo* において分裂期特異的に Mph1 によるリン酸化を受けるかどうか、Mph1 によるリン酸化を受けた Spc7 が、Bub1 あるいは Bub3 と特異的に相互作用するかどうか、という点を明らかにし、さらに *spc7-12A* 発現細胞の染色体分配における表現型をより詳細に解析することで Mph1 によるリン酸化の意義を明確にすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) Spc7 の *in vivo* での Mph1 によるリン酸化の有無を明らかにするために、*in vitro* で同定した複数のリン酸化部位について、リン酸化特異的抗体を作製し、分裂期に停止させた細胞の抽出液を用いたウエスタンブロッティングによって、Spc7 のリン酸化を検討した。

(2) Spc7 のリン酸化によって、Spc7 と Bub1 あるいは Bub3 との相互作用が促進されるかどうかを調べるために、非リン酸化型 Spc7-12A、リン酸化模倣型 Spc7-12E、Bub1、Bub3 の各タンパク質を *in vitro* translation によって作製し、それらを用いてプルダウン実験を行った。

(3) *spc7-12A* 発現細胞の表現型について、微小管がない時のスピンドルチェックポイントの活性化の有無、GFP でラベルした 2 番染色体の分配様式などを観察することで、詳細に検討した。

4. 研究成果

(1) Mph1 は *in vivo* で分裂期特異的に Spc7 をリン酸化する。

Spc7 の *in vivo* でのリン酸化を検討するために、 α -Tubulin をコードする *nda3* の変異株を用いて、分裂前中期に停止させた分裂酵母細胞の抽出液を用い、Spc7 の 257 番目のスレオニンに対するリン酸化特異的抗体でウエスタン解析を行った。Spc7-T257 は、Mph1

によって *in vitro* でリン酸化される箇所として研究代表者が以前に同定した部位である。この解析の結果、Spc7 の T257 は、分裂期特異的にリン酸化されることが明らかになった (図 1)。このことから、実際に生体内で Spc7 が Mph1 によって分裂期特異的にリン酸化されていることが示唆された。

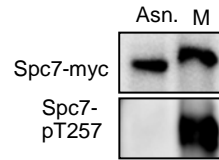


図 1 :非同調 (Asn) と分裂期に同調 (M) した細胞の抽出液を用いたウエスタン解析

(2) Mph1 による Spc7 のリン酸化は、Spc7 と Bub1-Bub3 複合体との相互作用を促進する。

Mph1 による Spc7 のリン酸化が Bub1 の動原体局在に必要なことは分かっていたが、その具体的な分子機構は不明であった。そこで、*in vitro* translation したタンパク質を用いてプルダウン実験を行った。その結果、リン酸化模倣型 Spc7-12E タンパク質は、Bub1 および Bub3 単独とは相互作用しないが、Bub1-Bub3 複合体と特異的に相互作用することが分かった。このような結果は、非リン酸化型 Spc7-12A タンパク質を用いた実験では得られなかったことから、Spc7 は、Mph1 によってリン酸化されると Bub1-Bub3 複合体と相互作用できるようになるということが示唆された。これらの結果から、Spc7 は Mph1 によってリン酸化されることで Bub1-Bub3 複合体と結合し、その結果 Bub1-Bub3 複合体の動原体局在が促進されると考えられた (図 2)。これらの結果は、染色体分配における Bub1 の多彩な機能を支える動原体局在化機構を明らかにしたものであり、この分野の研究者に与えるインパクトは非常に大きい。

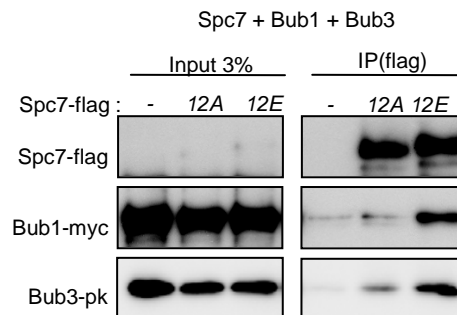


図 2 :Spc7, Bub1, Bub3 の各タンパク質を用いたプルダウンアッセイ

(3) Mph1 による Spc7 のリン酸化は、紡錘体チェックポイントの活性化に必要である

Bub1 および Mph1 は共に紡錘体チェックポイントの活性化に必須な因子として知られている。そこで Mph1 による Spc7 リン酸化依存的な Bub1 の動原体局在の意義を検討するために、まずこのリン酸化が紡錘体チェックポイントの活性化に必要であるかどうかを調べた。ここでは、前述した *nda3* の変異株を用いた。この変異株では制限温度において、紡錘体微小管が形成されないために、通常細胞は紡錘体チェックポイントによって分裂前中期に停止する。ところが、非リン酸化型 *spc7-12A* 発現細胞においては、この分裂前中期の停止が観察されなかった。この異常は、Bub1 を強制的に動原体に局在化させることで抑圧された。このことから、Mph1 による Spc7 のリン酸化に依存した Bub1 の動原体局在が、紡錘体チェックポイントの活性化に必要であることが明らかになった。

さらに、*spc7-12A* 発現細胞では、分裂期に Mad1、Mad2、Mad3 といった紡錘体チェックポイント因子の動原体局在が失われることが分かった。これらは、リン酸化模倣型 *spc7-12E* 発現細胞では、動原体に局在できたこと、およびこれらの因子の破壊株では Bub1 の動原体局在は正常であることから、Bub1 の動原体局在が Mad1、Mad2、および Mad3 の動原体局在の上流に位置することが明らかになった。この結果は、紡錘体チェックポイント因子の動原体局在化経路の大枠を明らかにしたものであり、動原体に依存した紡錘体チェックポイントの活性化機構を理解する上で非常に重要な成果である。

(4) Bub1 の動原体局在は染色体の 2 方向性結合に必要である。

Bub1 は、紡錘体チェックポイントの活性化の他に染色体の 2 方向性結合を促進する働きがあることが知られている。この機能に Mph1 による Spc7 のリン酸化依存的な Bub1 の動原体局在が必要であるかを検討するために、2 番染色体を GFP でラベルし、その分配様式を観察した。染色体の 2 方向性結合に異常があると、姉妹染色体が同一方向に分配される mis-segregation が観察される。この結果、*spc7-12A* 発現細胞では、*bub1* 破壊株や、*mph1* 破壊株同様、染色体の mis-segregation が高頻度で観察された (図 3)。そして、この mis-segregation は、リン酸化模倣型 *spc7-12E* 発現細胞では観察されなかった。このことから、Mph1 による Spc7 のリン酸化に依存した Bub1 の動原体局在が染色体の 2 方向性結合を促進するということが明らかになった。

これらの結果から、Mph1 依存的に動原体に局在した Bub1 は紡錘体チェックポイントと染色体の 2 方向性結合双方に重要な役割を果たしていることが明らかになった。

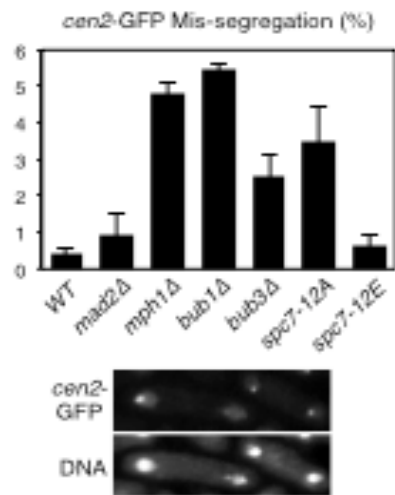


図 3: 種々の変異体における 2 番染色体 mis-segregation の頻度

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 2 件)

(1) Yuya Yamagishi, Ching-Hui Yang, Yuji Tanno, Yoshinori Watanabe

MPS1/Mph1 phosphorylates the kinetochore protein KNL1/Spc7 to recruit SAC components

Nature Cell Biology, in press, 2012, 査読有, doi:10.1038/ncb2515

(2) Ayano Kagami, Takeshi Sakuno, Yuya Yamagishi, Tadashi Ishiguro, Tatsuya Tsukahara, Katsuhiko Shirahige, Koichi Tanaka, Yoshinori Watanabe

Acetylation regulates monopolar attachment at multiple levels during meiosis I in fission yeast

EMBO Reports, 12, 1189-1195, 2011, 査読有, doi: 10.1038/embor.2011.188.

[学会発表] (計 3 件)

(1) Yuya Yamagishi, Yoshinori Watanabe
Mps1/Mph1 kinase recruits SAC components to kinetochores through phosphorylation of KNL1/Spc7

Annual meeting of American Society for

Cell Biology (ASCB), Denver(USA), 2011 年
12月6日、7日

(2) 山岸 有哉、渡邊 嘉典

Mps1/Mph1 は、キネトコアタンパク質
KNL1/Spc7 のリン酸化を介して紡錘体チェッ
クポイント因子をキネトコアへと局在化さ
せる

染色体ワークショップ、仙台、2012年1月
25日

(3) Yuya Yamagishi, Yoshinori Watanabe

Mps1/Mph1 kinase recruits SAC
components to kinetochores through
phosphorylation of KNL1/Spc7

グローバル COE リトリート、山梨、2012年
3月3日、4日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山岸 有哉 (YAMAGISHI YUYA)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：30613096