

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770001

研究課題名(和文)減数第一分裂期におけるコヒーシンを介したセントロメア接着機構の解析

研究課題名(英文)Analysis for the mechanisms of the centromeric cohesion by cohesin complex at meiosis I

研究代表者

作野 剛士 (Sakuno, Takeshi)

東京大学・分子細胞生物学研究所・講師

研究者番号：10504566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：減数第一分裂期における姉妹動原体の融合過程に必須な因子であるMoa1とPolo like kinase (Plo1)が相互作用することを明らかにし、さらにPlo1は自身のリン酸化酵素活性を通じてコヒーシンを介した姉妹動原体の融合を制御することが明らかになった。また、出芽酵母の還元分配に必要で、Polo like kinase (CDC5)と結合するSP013を、分裂酵母moa1破壊株に発現させた結果、還元分配が均等分配へとシフトする表現型が有意に抑圧されることが分かった。よって、配列上の相同性は有さないMoa1とSP013は機能的なホモログである可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that Moa1, which is indispensable factor to establish fusion of sister kinetochores during meiosis I, can bind to Polo like kinase (Plo1). Through several analyses, I showed that Plo1 plays crucial role to make sister kinetochores fusion state via its kinase activity. In addition, I found that SP013 gene, which has been shown to be required for reductional segregation in budding yeast and acts with Polo like kinase (CDC5), could suppress equational segregation phenotype in moa1 delta cells. This suggests that although they do not share the sequence homology, SP013 is functional homolog of Moa1 in budding yeast.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：減数分裂 一方向性結合 Polo like kinase 分裂酵母

1. 研究開始当初の背景

複製された姉妹染色分体ペアが分裂期で分配されるためにはセントロメア上に形成される姉妹動原体とそれを引っ張る”紐”である紡錘体微小管との結合が必須である。体細胞分裂期では、姉妹動原体は両極からのびた紡錘体微小管によってそれぞれ捉えられる”二方向性結合”が確立される結果、姉妹染色分体ペアは互いに両極へと分配される(均等分配)。一方、減数第一分裂において姉妹染色分体ペアは同じ極からのびたスピンドルによって捉えられる”一方向性結合”が確立される結果、姉妹染色分体ペアではなく、減数分裂期組み換えによって生じたキアズマを介して物理的に繋がっていた相同染色体ペアが互いに両極へと分配される(還元分配)。姉妹染色分体ペアが両極へと均等分配される体細胞分裂とは異なり、還元分配過程では姉妹染色分体ペアは同一極へ分配される(下図)。

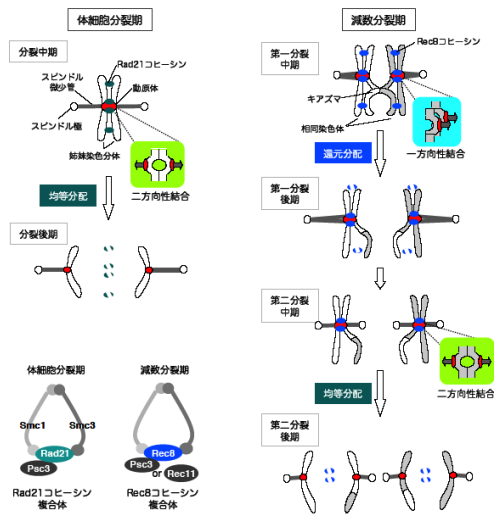


図1. 体細胞分裂期・減数分裂での染色体分配様式とコヒーシン複合体

本申請者らのこれまでの解析から、モデル生物である分裂酵母の場合、還元分配を保証する為には姉妹動原体がコヒーシン複合体の機能を介して融合することが必須であることを明らかにしてきた。この姉妹動原体の融合機構に必須な因子として、コヒーシンの他に Moa1 という、減数分裂期特異的に発現し動原体へと局在化する因子が同定されていた。しかし、Moa1 の機能はこれまで不明であり、減数第一分裂期にのみ履行される”還元分配”を行うために必要な分子機構を明らかにする上で、Moa1 の分子機能の解明は喫緊の課題であるといえる。また、これまでに早期流産やダウン症といった先天性異常の多くは減数第一分裂期における染色体分配のミスに起因すると考えられている。実際に姉妹動原体間の接着が形成されないと減数第一分裂期における還元分配が均等分配へとシフトすることから、姉妹動原体の接着欠損に起因した染

色体分配のミスは、異数体配偶子形成の要因となる。よって、減数第一分裂期における染色体分配制御機構を明らかにしようとする本研究課題は基礎生物学的理解を深めるだけでなく、臨床応用的に有益な知見を提供しうる研究課題であると考えられる。

2. 研究の目的

減数分裂期では最終的に染色体数を半減させた一倍体の配偶子が形成されるが、その過程の根幹を担うのが減数第一分裂期にのみ履行される”還元分配”である。本研究では、減数第一分裂期における染色体分配制御機構の解明、特にセントロメアにおけるコヒーシン複合体を介した姉妹動原体の融合が如何にして達成されるのか、その分子機構の解明を目的とした。そこで、減数分裂期特異的な動原体因子であり、姉妹動原体の融合に必須な役割を果たす Moa1 に着目し、その機能解析を行った。これまでの解析から、体細胞分裂期では発現がみられない Rec8 コヒーシンと Moa1 を強制的に体細胞分裂期に発現させると、両者は動原体またはセントロメア周辺に集積するにもかかわらず姉妹動原体の融合は観察されないことがこれまでに明らかになっていた。よって、減数分裂期特異的な他の因子、または制御機構によって、Moa1 の機能が発揮されると想定し、Moa1 の相互作用因子を探索することで、その因子または制御機構を明らかにすることを目指した。また、出芽酵母において還元分配に機能することが明らかとなっている因子と Moa1 との機能的な保存性について明らかにすることで、減数第一分裂期における”還元分配”の制御機構が真核生物に普遍的かどうかについて検証することも合わせて本研究の目的とした。

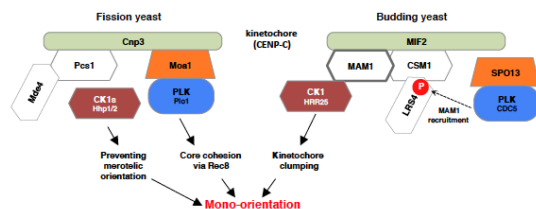
3. 研究の方法

まず、分裂酵母の還元分配に必須な因子である Moa1 に相互作用する因子の単離を目的に、two-hybrid スクリーニングや、Moa1 と共免疫沈降する因子群の同定を試みた。具体的には、two-hybrid スクリーニングでは、減数分裂期の細胞から調製した cDNA ライブラリーを用いて減数分裂期特異的な相互作用因子の同定を試みた。また、免疫沈降実験では、様々な tag を付加して、もっとも免疫沈降効率が良いモノを探索し、減数第一分裂期の細胞から Moa1 相互作用因子の網羅的単離を試みた。また、相互作用因子の単離後は、その機能解析を行い、減数第一分裂期における染色体分配制御機構への寄与、さらには Moa1 との機能的な相互作用の解析をおこなった。また、出芽酵母の還元分配に必要な SPO13 や CK1 それぞれと機能的に相同な因子が分裂酵母に存在するか、その可能性を解析した。具体的には、SPO13 遺伝子が分裂酵母 Moa1

の機能ホモログである可能性を念頭に、SPO13 遺伝子を分裂酵母細胞内で発現させ、moa1 破壊株表現型の相補実験を行った。また、CK1 の分裂酵母ホモログについて、減数分裂期特異的な発現抑制変異株を作製し、moa1 破壊株と同じ表現型ができるのかについて検証を行った。

4. 研究成果

まず、Polo like kinase (Plk1)が Moa1 と相互作用する因子として同定され、Plk1 は Moa1 との結合依存的に動原体へと局在化した。また、moa1 破壊株で失われる Plk1 の動原体局在を強制的に復活させた結果、Plk1 は自身のリン酸化酵素活性を通じてコヒーシを介した姉妹動原体の融合を制御することが明らかになった。よって、Moa1 は Plk1 との相互作用を通じて減数分裂期特異的に Plk1 を姉妹動原体へと局在化させるために必要な足場因子として機能することが示された。しかしながら、Plk1 を介した姉妹動原体融合の確立に必須となるリン酸化基質については未同定であり、その同定および機能解析が今後の課題である。また、出芽酵母の還元分配に必要な因子の一つである SPO13 も Polo like kinase (CDC5)と結合し、機能することがこれまでに報告されていたことから、SPO13が Moa1 の機能的なホモログである可能性を検証するために、分裂酵母 moa1 破壊株に出芽酵母 SPO13 を発現させ動原体へと局在化させた結果、moa1 破壊株でみられる還元分配が均等分配へとシフトする表現型が有意に抑圧されることが分かった。さらに、CDC5 と結合できない SPO13 の変異型ではその抑圧効果の減弱が観察された。よって、配列上の相同性は有さないものの、Moa1 と SPO13 は機能的なホモログである可能性が示唆された。また、出芽酵母の還元分配に必要な CK1 の分裂酵母ホモログは、コヒーシを介した姉妹動原体の融合には機能しないことも明らかになった。しかしながら、CK1 の変異株では正しい還元分配が起こらず、特定の条件下では還元分配が均等分配へとシフトする表現型を示すことが明らかになった。よって、CK1 はコヒーシを介した姉妹動原体の融合とは別の機構を通じて正しい還元分配の制御に機能する可能性が示唆された(下図)。



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)

Yamagishi Y, Sakuno T, Goto Y, Watanabe Y. Kinetochore composition and its function: lessons from yeasts. *FEMS Microbiol Rev.* **38**, 185-200 (2014) 査読有り

Yao J, Liu X, Sakuno T, Li W, Xi Y, Aravamudhan P, Joglekar A, Li W, Watanabe Y, He X. Plasticity and epigenetic inheritance of centromere-specific histone H3 (CENP-A)-containing nucleosome positioning in the fission yeast. *J Biol Chem.* **288**, 19184-19196 (2013) 査読有り

[学会発表](計2件)

演題: Casein kinase 1 regulates kinetochore-microtubule attachment during meiosis I through Aurora B and meiotic recombination.

発表者: 作野剛士

学会名: International fission yeast meeting 2013

期間: 2013年6月24日~29日

場所: ロンドン

演題: Casein kinase 1 regulates kinetochore-microtubule attachment during meiosis I through Aurora B and meiotic recombination.

発表者: 作野剛士

学会名: 第22回 DNA複製・組換え・修復ワークショップ meeting 2013

期間: 2013年11月20日~22日

場所: 秋保温泉

[図書](計1件)

作野剛士 他、染色体と細胞核のダイナミクス(化学同人) 2014、236ページのうち15ページ

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

6. 研究組織

(1)研究代表者

作野 剛士 (SAKUNO, Takeshi)
東京大学・分子細胞生物学研究所・講師
研究者番号：10504566