

令和元年6月5日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14672

研究課題名(和文) in vitro構築系を用いた動原体-微小管結合インターフェイスの1分子視覚化

研究課題名(英文) Single-molecule visualisation of kinetochore-microtubule interface using the in vitro reconstitution system

研究代表者

登田 隆 (Toda, Takashi)

広島大学・先端物質科学研究科・特任教授

研究者番号：50197894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：生命現象の根幹である遺伝物質の均等分配過程をin vitro系で再構成・可視化するのが、本研究の目標であった。まず分裂酵母を用いた遺伝学、細胞生物学的解析から、微小管ポリメラーゼDis1が動原体タンパク質Ndc80と相互作用するとの結果を得た。次に、精製タンパク質を用いた解析から、Ndc80、Dis1に加え、もう一つの微小管結合タンパク質Mal3/EB1を加えることによって、in vitroでNdc80の微小管結合能、とりわけ微小管プラス端との相互作用が観察された。すなわち微小管と動原体結合のインターフェイスはNdc80、微小管ポリメラーゼ、Mal3/EB1のみで再構成できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

染色体の娘細胞への均等分配は、生命の継承、生物の生存にとって最も重要なプロセスである。染色体不分離、非均等分配が起こると、生殖細胞では流産あるいはダウン症候群、常細胞では、細胞ガン化が惹起される。本研究により、染色体分配には3つのタンパク質が必要最小限であることが、明らかになった。この成果により、基礎生命科学分野において長年の謎であった染色体分配機構の全容解明への道程が示された。一方、医学、医療分野に対しては、3つのタンパク質をターゲットとする活性小分子の開発、創薬を可能とし、ヒト疾患の予防、治療に寄与する。よって本研究成果は、学術的、社会的意義、両面から重要な知見を提供したと云える。

研究成果の概要(英文)：Equal partition of genetic material (chromosomes) lies at the heart of cell reproduction. The kinetochore is a large proteinaceous structure formed on the chromosome. The microtubule is a major component of division apparatus. For each pair of chromosomes to segregate equally, the microtubule captures and pulls the kinetochore towards each pole. The aim of this program was the in vitro reconstitution of the interface that recapitulates the kinetochore-microtubule interaction. Using fission yeast, we first showed that Ndc80 (a core kinetochore component) and Dis1 (a microtubule polymerase) genetically interact. The following in vitro study indicated that these two proteins do not interact directly; instead, the third component, the third protein Mal3/EB1 is necessary for Ndc80 to interact with Dis1. These result have suggested that three factors, namely Ndc80, Dis1 and Mal3, comprise the minimal requirement for the in vitro reconstruction of the kinetochore-microtubule interface.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：染色体 紡錘体微小管 in vitro再構成 微小管ポリメラーゼ 微小管結合タンパク質 全反射照明蛍光顕微鏡 動原体 分裂酵母

1. 研究開始当初の背景

ゲノム情報-染色体の子孫細胞への均等分配は、生命にとって根幹事象である。染色体分配は、まず染色体上のセントロメア領域上に形成される動原体（キネトコア）とスピンドル微小管が強固に接着し、次に微小管の脱重合を介したスピンドル極への引力により引き起こされる。この微小管によるキネトコア捕獲の分子機構（図1、左）は、ゲノム安定性を保証する非常に重要な問題であるにもかかわらず、長く謎であった。染色体分配過程において、キネトコアと微小管がいかに相互作用するか、すなわちキネトコア-微小管結合インターフェイスに関する知見は乏しく、とりわけ結合インターフェイスの *in vitro* 再構成の試みは、3年前は世界でもほぼ皆無と言っていい状況であった。申請者はモデル生物、分裂酵母を用いた遺伝学的及び細胞生物学的研究から、キネトコア構成タンパク質のひとつである Ndc80 とある少数の微小管結合タンパク質、特に微小管ポリメラーゼ（Alp7, Alp14, Dis1）を共に混合すれば、微小管存在下において *in vitro* で、キネトコア-微小管結合インターフェイスを再現できるのではないかとこの着想を得、本申請に至った（図1、右）。

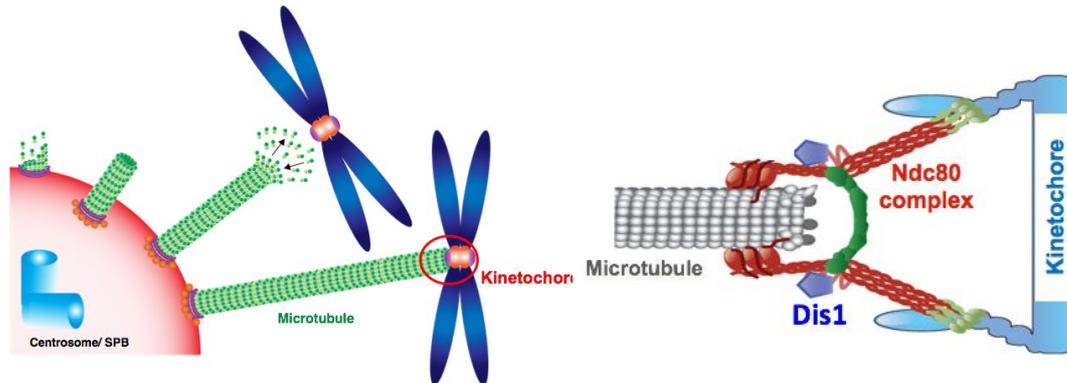


図1：動原体（Kinetochore）と微小管（Microtubule）のインターフェイス
微小管は中心体（Centrosome/SPB）から重合し、そのプラス端がキネトコアと結合する（左）。Ndc80、Dis1 を介したキネトコア-微小管結合インターフェイスの想像図（右）。

2. 研究の目的

本研究では、純粋 *in vitro* 系でのキネトコア-スピンドル微小管結合反応の可視化を目指した。このプロジェクトは世界でまだどのグループも成功していなかった。その理由の一つは構成タンパク質の多さ、形態の複雑さによる-キネトコア構造体は少なくとも50種以上のタンパク質から構成される高次機能装置である。本申請では最小機能単位構成タンパク質因子のみを選択し（具体的には Ndc80, Alp17, Alp7, Dis1 タンパク質）それら大腸菌内で発現、精製後、*in vitro* 系で微小管存在下、再構築し、全反射照明蛍光顕微鏡 (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy: TIRF) を駆使し、キネトコア-微小管相互作用のインターフェイスの一分子レベルでの視覚化を目的とした。

3. 研究の方法

本研究目的を計画期間内で達成するため、以下の4つの具体的実験プログラムを設定した。

- (1) 大腸菌での GFP を連結した Ndc80 複合体、Dis1, Alp7, Alp14 タンパク質の発現と精製（図2、左、中）
- (2) Dis1, Alp7, Alp14 の微小管結合能と微小管伸長に及ぼす影響の生物物理学的解析。
- (3) GFP-Ndc80 複合体+Dis1、GFP-Ndc80 複合体+Alp7+Alp14 を混合し、GFP シグナルの微小管上での挙動を全反射照明蛍光顕微鏡（TIRF）観察（図2、右）
- (4) 機能欠損変異型 Ndc80 複合体(GFP 連結)の挙動、野生型との相違を査定。

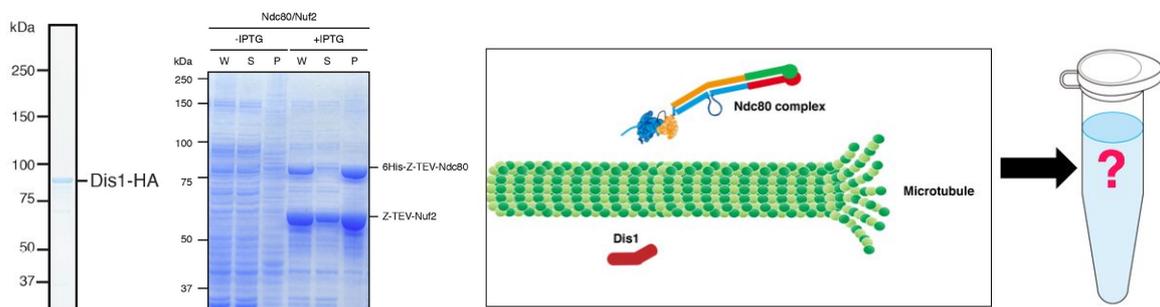


図2：Dis1 (左)、Ndc80 (=Nuf2)(中)の大腸菌からの精製と *in vitro* 混合実験 (左)

4. 研究成果

生命現象の根幹である遺伝物質の均等分配過程を *in vitro* 系で再構成・可視化するのが、本研究の目標であった。キネトコアは巨大なタンパク質複合体 (> 50 種以上のタンパク質を含む) から構成されており、どの構成因子が微小管と結合するのか、*in vitro* 系を構築するにあたり、その因子を探し出すのが、第一の問題であった。

まず分裂酵母を用いた遺伝学、細胞生物学的解析から、動原体タンパク質 Ndc80 がその候補であることが明らかになった (Hsu and Toda, 2014)。一方、微小管を構成するタンパク質に関しては、我々が得た結果から (Matsuo et al., 2016)、微小管ポリメラーゼ Dis1 が動原体と相互作用することが示唆された。そこで、本研究では、Ndc80、Dis1 を大腸菌で発現・精製し (Matsuo et al., 2017)、微小管と混合して、Ndc80-Dis1-微小管の結合が再現できるか検討した。ところが結果は *negative* であった。

次に、Dis1 と結合するもう一つの微小管結合タンパク質 Mal3/EB1 に着目して (Matsuo et al., 2016)、Dis1、Mal3、Ndc80 と微小管を混合したところ、興味深いことに、Ndc80 タンパク質が微小管のプラス端と相互作用することが示された (図 3)。

以上の結果から、微小管と動原体結合のインターフェースは Ndc80、微小管ポリメラーゼ、Mal3/EB1 が必要最小限因子であることが示唆された (図 4)。

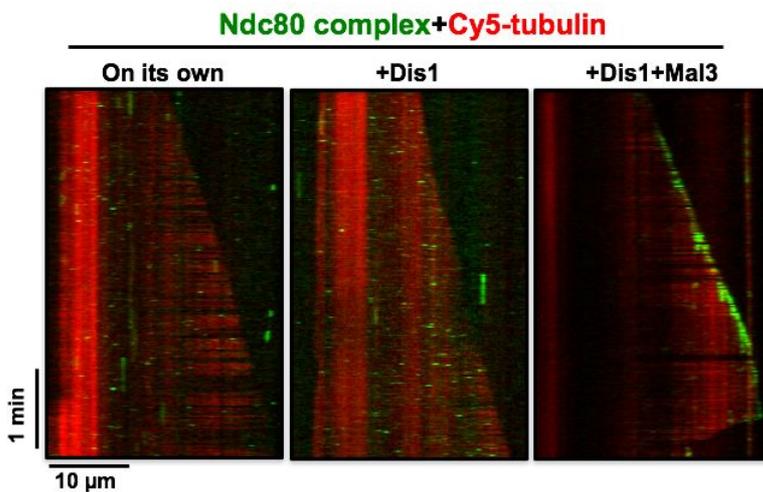


図 3 : Ndc80 (緑) Dis1、Mal3 を微小管 (赤) と混合することにより、Ndc80 と微小管プラス端との結合が *in vitro* で再構築・可視化できた。観察には、全反射照明蛍光顕微鏡 (Total Internal Reflection Fluorescence Microscopy: TIRF) を用いた。

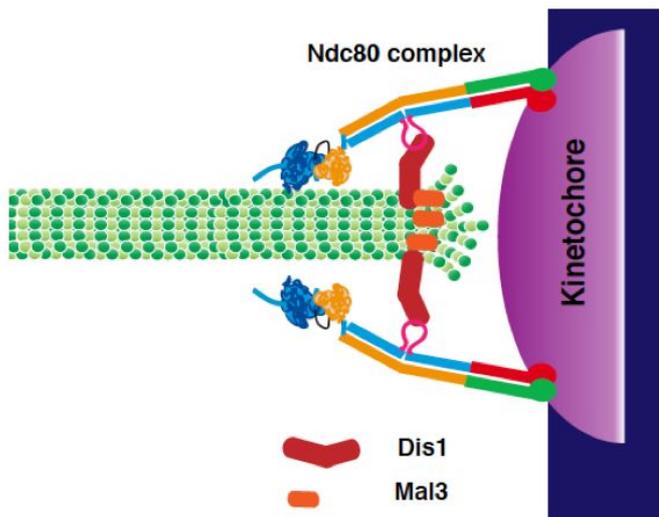


図 4 : 動原体と微小管の結合インターフェースの模式図。Dis1-Mal3 複合体は、微小管のプラス端と直接相互作用する。Dis1 は Ndc80 タンパク質の中央部に存在するループ領域とも結合する。細胞周期 M 期中期において、Dis1、微小管ポリメラーゼとして機能し、動原体の Ndc80 を捕獲する。後期に入ると、Dis1 のポリメラーゼ活性が抑制され、そのため微小管は脱重合し、その際発生する引力のため、動原体-染色体は細胞末端方向へ引っ張られ、娘細胞へと均等分配される。図を単純化するため、染色体分体の一方のみを示している。

< 引用文献 >

- Hsu, K.S., and Toda, T. (2011). Ndc80 internal loop interacts with Dis1/TOG to ensure proper kinetochore-spindle attachment in fission yeast. *Curr Biol* 21, 214-220.
- Matsuo, Y., Maurer, S.P., Surrey, T., and Toda, T. (2017). Purification and characterisation of the fission yeast Ndc80 complex. *Protein expression and purification* 135, 61-69.
- Matsuo, Y., Maurer, S.P., Yukawa, M., Zakian, S., Singleton, M.R., Surrey, T., and Toda, T. (2016). An unconventional interaction between Dis1/TOG and Mal3/EB1 in fission yeast promotes the fidelity of chromosome segregation. *J Cell Sci* 129, 4592-4606.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Yukawa, M., Yamada, Y., and Toda, T. (2019). Suppressor analysis uncovers that MAPs and microtubule dynamics balance with the Cut7/Kinesin-5 motor for mitotic spindle assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *G3 (Bethesda)* 9, 269-280. 査読有り

Yukawa, M., Kawakami, T., Okazaki, M., Kume, K., Tang, N.H., and Toda, T. (2017). A microtubule polymerase cooperates with the kinesin-6 motor and a microtubule cross-linker to promote bipolar spindle assembly in the absence of kinesin-5 and kinesin-14 in fission yeast. *Mol Biol Cell* 28, 3647-3659. 査読有り

Matsuo, Y., Maurer, S.P., Surrey, T., and Toda, T. (2017). Purification and characterisation of the fission yeast Ndc80 complex. *Protein expression and purification* 135, 61-69. 査読有り

Matsuo, Y., Maurer, S.P., Yukawa, M., Zakian, S., Singleton, M.R., Surrey, T., and Toda, T. (2016). An unconventional interaction between Dis1/TOG and Mal3/EB1 in fission yeast promotes the fidelity of chromosome segregation. *J Cell Sci* 129, 4592-4606. 査読有り

〔学会発表〕(計 37 件)

登田 隆, Ahmed Shakil, 栗澤尚瑛, 木村賢一, 湯川格史

分裂酵母を用いたヒト 14 型キネシン阻害剤の探索. 第 51 回 酵母遺伝学フォーラム, 福岡, 9 月, 2018.

登田 隆

スピンドル微小管はいかに形成されるのか-基礎研究から応用まで. 第 22 回 酵母合同シンポジウム, 福岡, 9 月, 2018.

Toda T., Okazaki M., Yamauchi T., Yamada Y., Kawakami T., Teratani Y., Oishi M., Yukawa M.

Exploring the molecular pathways leading to bipolar spindle formation. Joint Annual Meeting of 51st JSDB and 70th JSCB (第 70 回細胞生物学会・第 51 回発生生物学会合同大会), Tokyo, Japan, June, 2018.

登田 隆

細胞骨格から眺める酵母ゲノム安定性とその制御機構. 第 83 回酵母研究会講演会, 京都, 9 月, 2017.

登田 隆

スピンドル微小管はいかに形成されるのか-基礎研究から応用まで. 第 34 回 染色体ワークショップ, 上総, 7 月, 2017.

Corinne Pinder and Takashi Toda

Exploring the Mitotic Roles of Kinesin-8 in Fission Yeast. *Pombe2017:9th International Fission Yeast Meeting*, Banff, May, 2017.

Masashi Yukawa and Takashi Toda

Exploring the molecular mechanism of mitotic spindle assembly and chromosome segregation. 14th International Commission on Yeasts, 淡路市. 9 月, 2016 年.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://mccb.hiroshima-u.ac.jp/>

<http://hiha.hiroshima-u.ac.jp/>

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：湯川 格史

ローマ字氏名：Masashi Yukawa

所属研究機関名：広島大学

部局名：大学院先端物質科学研究科

職名：特任助教

研究者番号（8桁）：50403605

(2)研究協力者

研究協力者氏名：松尾 祐児

ローマ字氏名：Yuzy Matsuo

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。