

平成22年5月12日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17080002

研究課題名（和文） 染色体分配に必須な遺伝子群の網羅的機能解析

研究課題名（英文） Comprehensive functional analysis of genes involved in chromosome segregation

研究代表者

中世古 幸信 (NAKASEKO YUKINOBU)

京都大学・生命科学研究所・准教授

研究者番号：30231468

研究成果の概要（和文）：本研究では染色体分配を制御する遺伝子群の機能的ネットワークの探索と解析を行ない、染色体分配の制御機構の全体像の解明を試みた。具体的には、分裂酵母の高温感受性突然変異株ライブラリーを用いて、機能的相互作用を示す遺伝子を網羅的に検索した。またライブラリー中の全ての変異株について、変異遺伝子とサプレッサー遺伝子のクローン化を行なった。その結果、これまでに見いだされていなかった多くの遺伝子間機能相互作用が同定された。

研究成果の概要（英文）：We have analyzed functional interactions of gene clusters involved in chromosome segregation to elucidate the global image of the regulatory network of the chromosome segregation. Using the fission yeast temperature sensitive mutant library, we examined the effect for the growth by genes involved in chromosome segregation for all of the mutants. Also, we tried to clone genes responsible for their mutation and suppressor genes for all of the mutants in this library. As a result, many novel functional interactions have been identified among these genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	18,400,000	0	18,400,000
2006年度	18,400,000	0	18,400,000
2007年度	18,400,000	0	18,400,000
2008年度	16,400,000	0	16,400,000
2009年度	14,100,000	0	14,100,000
総計	85,700,000	0	85,700,000

研究分野：分子生物学

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：ゲノム機能・発現、染色体、染色体分配

1. 研究開始当初の背景

塩基配列決定法の急速な発展に伴い、大量の塩基配列が高速に解析可能となった。そして種々の生物の全ゲノム配列の決定がなされ、ポストゲノム解析と呼ばれる新たな分野が登場した。その中で遺伝子機能をゲノム規模で網羅的に解析する試みが多くの生物種で開始された。それには多種多様な技術が駆使されたが、一例として、個々の遺伝子について遺伝子機能を低下あるいは失失させ、その生物的影響を網羅的に解析する試みがなされ始めた。中でも酵母等の下等真核生物はモデル系として、最も早く解析が着手された。分裂酵母は遺伝学、生化学、分子生物学的手法が適用可能で、これまでに細胞周期、染色体研究について多くの成果が収められている。ヒトにおける機能未知の遺伝子を、酵母の相同遺伝子を解析することにより機能が解明された例も数多く報告されている。従って、ヒト遺伝子の解析系が複雑で困難な場合に、より簡素な系である酵母の系から新たな情報がもたらされることは十分に期待できる。また分裂酵母は、ポストゲノムの解析に必要な不可欠な全ゲノムの塩基配列が決定されており、全ての遺伝子の1次情報が明らかとなっていた。これらの事から、我々は分裂酵母を材料とした解析を進める事を考え、戦略的に新規な網羅的解析と古典的な変異株分離という2点を融合した新たなアプローチを考案し、本研究を開始した。また本研究の焦点となる染色体を制御する因子群については、個々の因子としての解析結果が数多く報告されていた。しかしながらこれらの因子が細胞内で単独で機能する事はまれであり、他の因子との相互作用についてはまだまだ不明な点が多かった。その点でも染色体を制御する既知、および未知の遺伝子間の機能的連携を探るためには今回行なったアプローチが最適であろうと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、染色体分配を制御する因子について、新規遺伝子の同定、ならびにそれら遺伝子群の機能的ネットワークの解析を網羅的に行ない、染色体分配制御機構の全体像の解明を目的とする。これまで染色体分配を制御する遺伝子は数多く同定され、それらの遺伝子の個々の機能が明らかにされつつあるが、遺伝子間の全体的な相互作用については不明な部分が多い。そこで個々の遺伝子の機能解析に加えて、複数の遺伝子間の機能相互作用を網羅的に解析し、染色体分配を制御する機構の全体像を明らかにするのが最終目

標である。また、これまでの解析から、これらの因子群は種を通じて保存されているものも多いことから、これら因子群の制御機構についても保存されている可能性が高い。この普遍性について検討するため、それらの相同遺伝子を探索し、個々の因子の機能について分裂酵母、ヒト、マウスを用いて解析する。

3. 研究の方法

基本的に分裂酵母をモデルとし、ランダムに分離した突然変異体ライブラリーを用いた網羅的解析を行なう。ランダムに分離した変異株ライブラリーの使用は本研究の大きな特色の一つで、これまで染色体分配に関連する変異として表現型を予測できなかった変異株をも網羅的に分離するための打開策となる。このライブラリーは約1000株の変異株から成り、分裂酵母の必須遺伝子は約900と予測されている事から必須遺伝子の多くはこのライブラリーでカバーされていると考えられる。具体的な解析は、以下の3段階に分かれる。

(1) ライブラリー全ての変異株について、染色体分配を制御する既知の遺伝子を形質転換により導入し、遺伝的相互作用を示す変異株を検索する。実際には形質転換株のすべてについて制限温度、準制限温度における生育の促進効果、あるいは許容温度における生育の阻害効果の有無を調べる。

(2) ライブラリーの全ての変異株について、分裂酵母ゲノム DNA ライブラリーを用いて、高温感受性を相補する DNA 断片を分離する。分離した DNA 断片の情報から、変異遺伝子ならびにサプレッサー遺伝子をクローン化する。この段階においては、分裂酵母の全ゲノム配列情報を用いる事で個々の遺伝子を特定可能となる。

(3) 上記2種の解析から得られる情報を集積、統合し、遺伝子間の機能的相互作用を見いだす。得られた遺伝子情報に基づき、再度別の遺伝子を導入し、対応付けを行なう。この繰り返しにより、機能的相互作用を示す新規遺伝子ならびに既知の遺伝子との新規相互作用の両方が見いだされ、対象とする一群の遺伝子群の機能的ネットワークが見いだされると期待される。

また染色体分配制御に関連する個々の因子の機能についてより詳細な解析として、分裂酵母におけるより詳細な解析、ならびにヒトあるいはマウスの相同遺伝子を含めた解析も行なう。この解析は同定された制御機構の生物種間の保存性の検討だけでなく、網羅

的解析の相補的な情報を得るものとして位置づけられる。また、より詳細な情報を得るため、染色体分配過程における重要な要素である染色体接着、ならびに動原体機能の2つに關与する遺伝子に焦点を絞った解析を行なう。

4. 研究成果

研究代表者（中世古）は分裂酵母の染色体分配を制御する因子について、關与する遺伝子群の機能的ネットワークの網羅的探索と解析を行なった。また研究分担者（池野、北島、田中、作野）は染色体分配の制御機構について、個々の因子に焦点を絞った解析を、分裂酵母、ヒト、マウスを材料として行なった。

(1) 代表者中世古は、染色体分配を制御する因子について、新規遺伝子の同定、ならびにそれら遺伝子群の機能的ネットワークの網羅的な解析を進めた。その結果これまでに見いだされていなかった多くの遺伝子間機能相互作用が同定された。主な結果を以下に述べる。

① ヒストンの転写調節因子についてヒストン H2B 自身を含む機能的ネットワークが見いだされた。このネットワークには H3, H4 等の他のヒストン遺伝子の關連が見いだされなかったことから H2B を含むヒストン遺伝子關連遺伝子の制御には他のヒストンとは独立した機構が存在すると考えられる。

② Rho3 を含む他の複数の新規のネットワークが新たに同定された。同定されたネットワークに存在する遺伝子のうち、機能がわかっているものは細胞質分裂に關与するものが複数含まれていた。この結果は、細胞質分裂と染色体分配の制御機構ネットワークが關連を持ち、新たな制御機構の存在を示唆している。

③ 2C 型たんぱく質脱リン酸化酵素 Ptc1 を中心とするネットワークの解析を進めた。その結果、Ptc1 と相互作用する遺伝子群として MAP キナーゼ Sty1/Spc1 關連因子（既知）、イソプレノイド転移酵素群（新規）、SMC5/6 複合体の構成因子 Spr18、（新規）の3種が同定された。中でも SMC5/6 は染色体分配、およびゲノム DNA の修復に必須であることが示されているため、Ptc1 が染色体分配制御に關与する可能性が初めて見いだされた。つまり、Ptc1 はこれまでの報告にあるストレス応答

（MAP キナーゼ経路）に關連したシグナル伝達以外にも、異なる制御ネットワークを通じて蛋白質の修飾（プレニル化）や染色体分配等の細胞機能制御に深く關与しているのではないかと考えられる。また、Ptc1 以外の 2C 型たんぱく質脱リン酸化酵素のいくつかも上記のネットワークに關与する事を見出した。一連の 2C 型たんぱく質脱リン酸化酵

素群は、たんぱく質の脱リン酸化反応を通じて染色体分配を制御している可能性が示され、興味深い結果となった。

④ Ptc1 と SMC5/6 複合体の機能解析を進めた。まず spr18 変異株中では SMC5/6 複合体の分子量が小さくなるが、Ptc1 を導入するとこの分子量が野生型のものと同様大きさに回復する事をゲル濾過解析により見出した。Ptc1 は細胞内で SMC5/6 複合体の安定性に寄与しているのかもしれない。次に、spr18 変異は Ptc1 だけでなく他の複数のたんぱく質脱リン酸化酵素（1 型、2A 型）によって相補される事を見出した。また、Ptc1 に脱リン酸化活性を欠失する点変異を導入したところ、spr18 変異に対する相補性が消失した。これらの結果は Spr18 の機能が酵素としての Ptc1 の脱リン酸化反応によって直接制御されている事を示唆している。さらに Spr18 の変異株が非制限温度でも成育できない因子としてタンパク質リン酸化酵素 Pka1 を新たに同定した。Pka1 も Ptc1 の場合と同様にリン酸化活性を欠失した点変異を導入したところ、spr18 変異に対する増殖阻害活性が消失した。以上の結果は SMC5/6 複合体の機能に直接リン酸化・脱リン酸化が關与する可能性を強く示唆している。SMC5/6 複合体は Spr18 のリン酸化・脱リン酸化修飾により染色体分配制御に關与しているのかも知れない。

(2) 分担者池野はヒトおよびマウス培養細胞におけるヒト人工染色体の系を用いて、安定な染色体分配機構を制御する因子の解析を行なった。実際には安定な人工染色体ベクター系の改良、ならびに、染色体分配に必須な動原体構成因子の機能解析、とりわけ CENP-A の機能解析を進めた。その結果、CENP-A のセントロメアへの局在化機構は生物種間で共通性が高いと考えられるが、ヒト CENP-A には局在化機構の特異性が存在することが示唆された。分担者北島は分裂酵母、ならびにヒト培養細胞を用いて染色体の安定な分配に必須な接着因子 Shugosin の制御機構の解析を進めた。その結果、Shugosin の染色体接着にはタンパク質脱リン酸化酵素 PP2A による制御を受ける事を明らかにした。分担者田中は分裂酵母を材料とし、ヒト動原体構成因子 CENP-C 相同遺伝子 Cnp3 を中心とした動原体と微小管の結合に關する制御機構の解析を進めた。その結果、分裂酵母 Cnp3 は Fta1 や Moa1 等の他の動原体構成因子を局在させる機能を持つ事が明らかとなった。分担者作野は分裂酵母の動原体 DNA の編成と染色体分配の方向性の解析を行ない、減数分裂期における動原体構造と染色体接着因子群の相互作用を分子レベルで詳細に検討した。その結果、動原体が形成されるセントロメア中央領域におけるコヒーシ複合体を介し

た接着は、一方向結合を保証する為に必要な姉妹動原体の配向を作り出す一方で、ヘテロクロマチン化した外側領域の接着は姉妹動原体が二方向性に捉えられやすい配向を生み出すことが明らかになった。

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 20 件)

1. Ishiguro T, Tanaka K, Sakuno T, Watanabe Y. Shugoshin-PP2A counteracts Casein Kinase 1-dependent cleavage of Rec8 by separase. *Nat. Cell Biol.* 査読あり 12:500-506, 2010
2. Suzuki N, Itou T, Hasegawa Y, Okazaki T, Ikeno M. Cell to cell transfer of the chromatin-packaged human beta-globin gene cluster. *Nucleic Acids Res* 査読あり 38:e33, 2010.
3. Tanaka K, Chang HL, Kagami A, Watanabe Y. CENP-C functions as a scaffold for effectors with essential kinetochore functions in mitosis and meiosis. *Dev Cell* 査読あり 17:334-343, 2009.
4. Sakuno T, Watanabe Y. Studies of meiosis disclose distinct roles of cohesion in the core centromere and pericentromeric regions. *Chromosome Res* 査読あり 17:239-249, 2009.
5. Sakuno T, Tada K, Watanabe Y. Kinetochore geometry defined by cohesion within the centromere. *Nature* 査読あり 458:852-858, 2009.
6. Sajiki K, Hatanaka M, Nakamura T, Takeda K, Shimanuki M, Yoshida T, Hanyu Y, Hayashi T, Nakaseko Y, Yanagida M. Genetic control of cellular quiescence in *S. pombe*. *J Cell Sci* 査読あり 122:1418-1429, 2009.
7. Saito A, Muro Y, Sugiura K, Ikeno M, Yoda K, Tomita Y. CENP-0, a protein localized at the centromere throughout the cell cycle, is a novel target antigen in systemic sclerosis. *J Rheumatol* 査読あり 36:781-786, 2009.
8. Irvine DV, Goto DB, Vaughn MW, Nakaseko Y, McCombie WR, Yanagida M, Martienssen R. Mapping epigenetic mutations in fission yeast using whole-genome next-generation sequencing. *Genome Res* 査読あり 19:1077-1083, 2009.
9. Ikeno M, Suzuki N, Hasegawa Y, Okazaki T. Manipulating transgenes using a chromosome vector. *Nucleic Acids Res* 査読あり 37:e44, 2009.
10. Hanyu Y, Imai KK, Kawasaki Y, Nakamura T, Nakaseko Y, Nagao K, Kokubu A, Ebe M, Fujisawa A, Hayashi T, Obuse C, Yanagida M. Schizosaccharomyces pombe cell division cycle under limited glucose requires Ssp1 kinase, the putative CaMKK, and Sds23, a PP2A-related phosphatase inhibitor. *Genes Cells* 査読あり 14:539-554, 2009.
11. Yamagishi Y, Sakuno T, Shimura M, Watanabe Y. Heterochromatin links to centromeric protection by recruiting shugoshin. *Nature* 査読あり 455:251-255, 2008.
12. Lee J, Kitajima TS, Tanno Y, Yoshida K, Morita T, Miyano T, Miyake M, Watanabe Y. Unified mode of centromeric protection by shugoshin in mammalian oocytes and somatic cells. *Nat Cell Biol* 査読あり 10:42-52, 2008.
13. Ito M, Ito R, Yoshihara D, Ikeno M, Kamiya M, Suzuki N, Horiguchi A, Nagata H, Yamamoto T, Kobayashi N, Fox IJ, Okazaki T, Miyakama S. Immortalized hepatocytes using human artificial chromosome. *Cell Transplant* 査読あり 17:165-171, 2008.
14. Kawashima SA, Tsukahara T, Langegger M, Hauf S, Kitajima TS, Watanabe Y. Shugoshin enables tension-generating attachment of kinetochores by loading Aurora to centromeres. *Genes Dev* 査読あり 21:420-435, 2007.
15. Hayashi T, Hatanaka M, Nagao K, Nakaseko Y, Kanoh J, Kokubu A, Ebe M, Yanagida M. Rapamycin sensitivity of the Schizosaccharomyces pombe tor2 mutant and organization of two highly phosphorylated TOR complexes by specific and common subunits. *Genes Cells* 査読あり 12:1357-1370, 2007.
16. Suzuki N, Nishii K, Okazaki T, Ikeno M. Human artificial chromosomes constructed using the bottom-up strategy are stably maintained in mitosis and efficiently transmissible to progeny mice. *J Biol Chem* 査読あり 281:26615-26623, 2006. 51:1809-1816, 2006.
17. Kitajima TS, Sakuno T, Ishiguro K, Iemura S, Natsume T, Kawashima SA, Watanabe Y. Shugoshin collaborates with protein phosphatase 2A to protect cohesin. *Nature* 査読あり 441:46-52, 2006.
18. Izuta H, Ikeno M, Suzuki N, Tomonaga T, Nozaki N, Obuse C, Kisu Y, Goshima N, Nomura F, Nomura N, Yoda K. Comprehensive

analysis of the ICEN (Interphase Centromere Complex) components enriched in the CENP-A chromatin of human cells. *Genes Cells* 査読あり 11:673-684, 2006.

19. Aoki K, Nakaseko Y, Kinoshita K, Goshima G, Yanagida M. CDC2 phosphorylation of the fission yeast *dis1* ensures accurate chromosome segregation. *Curr Biol* 査読あり 16:1627-1635, 2006.
20. Kitajima TS, Hauf S, Ohsugi M, Yamamoto T, Watanabe Y. Human Bubl defines the persistent cohesion site along the mitotic chromosome by affecting Shugoshin localization. *Curr Biol* 査読あり 15:353-359, 2005.

[学会発表] (計 10 件)

1. 池野正史、ヒト CENP-A のセントロメア局在機構の解析、第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 10 日、横浜市パシフィコ横浜
2. 池野正史、ヒトセントロメア構造形成の特異性と生物種共通性、染色体学会、2009 年 11 月 13 日、松江市くまびきメッセ
3. 田中 晃一、Linkage between homologs secures mono-orientation of sister kinetochores in meiosis I. 、第 5 回国際分裂酵母学会、2009 年 10 月 29 日、国立オリンピック記念センター
4. 作野剛士、Kinetochores geometry defined by cohesion within the centromere. 、第 5 回国際分裂酵母学会、2009 年 10 月 26 日、国立オリンピック記念センター
5. 池野正史、クロマチン構造の *in vivo* 再構築を利用した遺伝子の発現制御領域の解析、2008 年 12 月 10 日、神戸市ポートアイランド
6. 田中 晃一、分裂酵母 CENP-C (Cnp3) の機能解析、第 31 回日本分子生物学会年会、2008 年 12 月 10 日、神戸市ポートアイランド
7. 作野剛士、The orientation of kinetochores defined by cohesion within the centromere. 、第 31 回日本分子生物学会年会、2008 年 12 月 10 日、神戸市ポートアイランド
8. 田中 晃一、Cnp3 (CENP-C) plays an essential role in monopolar attachment by recruiting Moal onto centromeres at meiosis I. 、Asia-Pacific Regional *S.pombe* Meeting、2008 年 7 月 26 日、Singapore
9. 池野正史、Maintenance of human centromere structure. International symposium on chromosome dynamics. 、第 31 回日本分子生物学会年会、2008 年 5 月 30 日、三重県アキラビラ志摩
10. 中世古幸信、A brute force post-genome

approach using a randomly isolated mutant library of fission yeast toward comprehensive analysis of functional interaction of mitotic regulators. 、International symposium on chromosome dynamics. 、2008 年 5 月 30 日、三重県アキラビラ志摩

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中世古幸信 (NAKASEKO YUKINOBU)
京都大学・生命科学研究所・准教授
研究者番号：30231468

(2) 研究分担者

池野 正史 (IKENO MASASHI)
藤田保健衛生大学・総合医科学研究所・講師
研究者番号：80298546

北島 智也 (KITAJIMA TOMOYA)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号：00376641
(H17→H18)

田中 晃一 (TANAKA KOUICHI)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号：90282615
(H19→H21)

作野 剛士 (SAKUNO TAKESHI)
東京大学・分子細胞生物学研究所・特任助教
研究者番号：10504566
(H20→H21)