

平成21年 5月26日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570194
 研究課題名（和文）染色体核内配置関連因子の探索を目的とした分裂酵母核膜タンパク質の網羅的解析
 研究課題名（英文）Screening for nuclear membrane proteins in Schizosaccharomyces pombe to identify novel factors involved in chromosome arrangement
 研究代表者
 近重 裕次（CHIKASHIGE YUJI）
 （独）情報通信研究機構・未来 ICT 研究センター・バイオ ICT グループ・主任研究員
 研究者番号：60359081

研究成果の概要：染色体配置における核膜のはたす役割の分子機構を明らかにする目的で、本研究では、分裂酵母において、染色体の核内配置に関与する因子を探索し、新規の核膜タンパク質を2個同定し、それぞれ Bqt3, Bqt4 と命名した。両タンパク質は、核内膜において複合体を形成し、核内膜タンパク質としては、初めて、染色体末端と核膜との相互作用を介在する因子であることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・細胞生物学

キーワード：核構造

1. 研究開始当初の背景

染色体の安定な維持と機能発現にとって、核内における正確な染色体配置は不可欠である。分裂期染色体の整列、分配過程を除けば、転写や複製、組換えといった主要な染色体活性が実現されるのは、多く、核膜存在下であり、核膜の存在が、染色体配置とその機能発現に重要な役割を担っていることは、想像に

難くない。減数分裂における相同染色体の対合に重要な役割を担っていると考えられている bouquet 配置は、中心体（酵母では、SPB: Spindle Pole Body）近傍にテロメア（染色体末端部）がクラスターを形成する特徴的な染色体配置であるが、この形成においても核膜、及び核膜タンパク質の役割が重要であ

ることが分裂酵母を用いた我々の解析から明らかとなってきた。従来、いわゆる核ラミナを持たない酵母細胞では、核膜孔複合体を除けば、高等動物で知られているようなラミンやエメリンなどの非核膜孔複合体核膜タンパク質は、知られていなかった。しかし、我々は、分裂酵母の bouquet 配置形成機構の解析をすすめるうち、Sad1 という膜タンパク質が核内膜に局在し、核内膜にアンカーされているテロメアを集合させる上で重要な役割を担っていることを見出した。即ち、それまで、SPBに局在していた Sad1 タンパク質は、減数分裂の誘導に伴って、核膜上を移動し、我々が新たに見出した Bqt1/Bqt2 複合体を介してテロメアタンパク質 Rap1 と相互作用することにより、テロメアを捕捉し、再び SPB 近傍へ集合することによって bouquet 配置が完成することが明らかとなったのである (Chikashige et al., 2006, Cell, Vol. 125 pp59-69)。

2. 研究の目的

本研究では、染色体の核内配置のモデルケースとして、分裂酵母における bouquet 配置形成過程に着目し、bouquet 形成における核膜のはたす役割を明らかにする目的で、これに関与する核膜タンパク質を同定し、それらの染色体配置における分子機能を明らかにすることを目標とする。

「背景」で、分裂酵母 bouquet 形成過程において、核膜タンパク質 Sad1 が、Bqt1/Bqt2 複合体を介してテロメアを捕捉すると述べたが、Bqt1/Bqt2 複合体は、膜タンパク質ではなく、たまたま近接遭遇した Sad1 とテロメアを、連結するに過ぎない。核膜タンパク質 Sad1 がテロメアと近接遭遇するためには、テロメアが核膜近傍に配置していることが必要と考えられ、それには、なんらかの核膜タンパク質の関与が推察されるが、分裂酵母に

おいて、テロメアの核膜配置機構についてわかっていることはほとんどない。本研究をすすめる過程で、テロメアの核膜配置について、なんらかの理解が得られることが期待される。

3. 研究の方法

分裂酵母ゲノム中には、膜貫通ドメインを有することが予想されるタンパク質の遺伝子が 900 個余り含まれる。先に、我々は、接合フェロモンによって発現が誘導される遺伝子群を網羅的に破壊し、83 個の遺伝子についてその破壊株を取得した。これには、膜貫通ドメインを有すると予測される遺伝子が 19 個含まれていた。このうち、我々が bqt3 と名付けた遺伝子の破壊株では、減数分裂期の bouquet 配置形成に部分的な欠損が見出された。膜貫通ドメインを有し、かつ、bouquet 形成欠損を示すことから、Bqt3 タンパク質が、膜タンパク質として bouquet 配置形成に何らかの関わりがあるのではないかと考え、bqt3 遺伝子の機能解析、及び、その関連因子の探索を行った。酵母 2 ハイブリッド法による相互作用因子の探索により、Bqt3 タンパク質と相互作用するタンパク質 (bqt4 と命名) を同定した。Bqt4 も膜貫通ドメインを有することが予測された。以下のような解析を行い、これら遺伝子がテロメアの核膜配置にはたす役割を明らかとした。

(1) 細胞構造学的解析：蛍光タンパク質との融合遺伝子を作成し、蛍光顕微鏡による各タンパク質の細胞内局在の解析。

(2) 生化学的解析：Bqt4 について、抗 Bqt4 抗体を作成し、ウエスタンブロッティングによる分裂酵母細胞抽出液中での Bqt4 タンパク質の同定。

(3) 分子遺伝学的解析：各々の遺伝子破壊株、ならびに、部分的欠失変異導入株の表現型の解析。及び、酵母 2 ハイブリッド法によ

る相互作用の検証。

4. 研究成果

(1) 分裂酵母においてその破壊株が bouquet 配置形成欠損を示す2個の遺伝子を新たに同定した (bqt3, bqt4 と命名)。いずれの遺伝子産物にも膜貫通ドメインの存在が予想された。

(2) Bqt3、Bqt4 タンパク質は、互いに複合体を形成し、いずれも、N 末端側を核質側へむけて細胞核内膜に局在していた。

(3) テロメアと核膜の距離を計測し、bqt4 破壊株では、テロメアが核膜から乖離していることを見出した。さらに、減数分裂誘導時には、核膜から乖離したテロメアに Sad1 タンパク質の集積は、見られなかった。

(4) 酵母2ハイブリッド法により、Bqt4 タンパク質は、核膜局在に必須の膜貫通ドメインを含む C 末端側ドメインで Bqt3 タンパク質と、そして、核質側に局在している N 末端側ドメインでテロメアタンパク質 Rap1 と相互作用することを見出した。

これらの解析から、我々は、新たに同定した核内膜に局在する Bqt4 タンパク質と Rap1 タンパク質との相互作用によりテロメアが核膜へ付着していること、これによって、bouquet 形成における必須過程である Sad1 タンパク質によるテロメアの捕捉が核膜において可能となっていることを明らかとした

(以上の結果は、論文にまとめ Journal of Cell Biology 誌に投稿、査読に従って改稿中)。

テロメアと核膜との相互作用については、これまで出芽酵母における解析が主に報告されてきたが、本研究において、はじめて、分裂酵母において、テロメアと核膜との相互作用にかかわる因子を同定することができた。本研究で作成した bqt4 破壊株は、テロメアと核膜の相互作用が欠損した分裂酵母では最初の変異体であり、今後、この変異体、

およびその派生体を用いた解析を、従来の出芽酵母における知見と比較しながらすすめることにより、テロメアと核膜、ひいては、染色体と核膜との相互作用の持つより普遍的な生物学的意義についての理解が深まってゆくことが期待される。

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

Hiraoka Y, Kawamata K, Haraguchi T and Chikashige Y (2009) 査読有り

“Codon usage bias is correlated with gene expression levels in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*”

Genes to Cells. Vol.14, pp499-509

2

Chikashige Y, Tsutsumi C, Okamasa K, Yamane M, Nakayama J, Niwa O, Haraguchi T, Hiraoka Y. (2007) 査読有り

“Gene Expression and Distribution of Swi6 in Partial Aneuploids of the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*”

Cell Struct. Funct. Vol. 32(2):pp149-61

3

Chikashige, Y., Haraguchi, T., and Hiraoka, Y. (2007) 査読有り

“Another way to move chromosomes.”

Chromosoma Vol. 116(6):pp497-505.

[学会発表] (計 8 件)

1

近重 裕次、「核内膜タンパク質 Bqt3, Bqt4 は、テロメアを核膜へ繋ぎとめて、減数分裂期ブーケ配置形成を可能にする。」第 31 回日

本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会
大会 合同大会、2008 年 12 月 12 日、神戸・
日本

2

Yasushi Hiraoka, 「A group of proteins that
work for telomere positioning in fission
yeast」 Dynamic Organization of Nuclear
Function Cold Spring Harbor Meeting, 2008
年 9 月 18 日、Cold Spring Harbor ・USA

3

Yuji Chikashige, 「Inner nuclear membrane
proteins required for the chromosomal
bouquet arrangement in
Schizosaccharomyces pombe」 EMBO
CONFERENCE SERIES "Telomeres and the DNA
damage response", 2008 年 9 月 15 日、
Villars-sur-Ollon ・ Switzerland

4

近重 裕次, 「Inner nuclear membrane
proteins required for the chromosomal
bouquet arrangement in
Schizosaccharomyces pombe」 第 60 回日本細
胞生物学会大会、2008 年 6 月 29 日、横浜・
日本

5

近重 裕次, 「分裂酵母減数分裂期ブーケ形
成における核内膜タンパク質Bqt3, Bqt4 の機
能」 第 25 回染色体ワークショップ、2008 年
1 月 31 日、熱海・日本

6

Yuji Chikashige, 「Nuclear membrane
proteins required for meiotic
SPB-telomere cluster formation in

Schizosaccharomyces pombe」, 8th European
Meiosis Meeting、2007 年 9 月 15 日、葉山・
日本

7

Yuji Chikashige, 「Fission Yeast Genes
Involved in Meiotic SPB-Telomere Cluster
Formation」 4th International Fission Yeast
Meeting、2007 年 6 月 13 日、Copenhagen ・
Denmark

8

Yuji Chikashige, 「Fission yeast genes
involved in meiotic SPB-telomere cluster
formation」 第 40 回日本発生生物学会・第 59
回日本細胞生物学会、合同大会、2007 年 5 月
29 日、福岡・日本

〔その他〕
ホームページ等
[http://www2.nict.go.jp/w/w103/w131103/C
ellMagic/index.html](http://www2.nict.go.jp/w/w103/w131103/CellMagic/index.html)

6. 研究組織
(1) 研究代表者
近重 裕次 (CHIKASHIGE YUJI)
(独) 情報通信研究機構・未来 ICT 研究センタ
ー・バイオ ICT グループ・主任研究員
6 0 3 5 9 0 8 1

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし