

## 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25年 6月 4日現在

機関番号：14401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2008～2012

課題番号：20114002

研究課題名（和文） 遺伝情報継承のメカニズム

研究課題名（英文） Functional Organization of the Genome

研究代表者

平岡 泰 (HIRAOKA YASUSHI)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：10359078

研究成果の概要（和文）：遺伝情報の正確な継承を保證する細胞核構造を解析するために、独自に開発した蛍光タンパク質ライブラリーや、生細胞蛍光イメージング法、DNA マイクロアレイ、分子遺伝学的な手法を用いて、分裂酵母の減数分裂の過程を解析し、遺伝情報継承に関与する分子や仕組みを明らかにした。また、ヒト細胞を用いて核構造を解析し、遺伝情報の継承場として働く仕組みの一端を明らかにした。ヒト細胞を用いて核構造を解析し、核膜と染色体の相互作用が遺伝情報の継承に働く仕組みについて新しい知見を得た。

研究成果の概要（英文）：In order study nuclear structures that ensure correct transmission of chromosomes to offspring, we developed a library of fluorescent proteins, DNA microarray and live-cell imaging technologies. Using these tools, we examined nuclear structures during meiosis in fission yeast and have revealed molecular mechanisms for transmission of chromosomes. We also examined nuclear structures in human cells, and obtained new insights into mechanisms how the nuclear envelope affects genetic activities of chromosomes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	38,900,000	11,670,000	50,570,000
2009年度	49,900,000	14,970,000	64,870,000
2010年度	45,700,000	13,710,000	59,410,000
2011年度	50,800,000	15,240,000	66,040,000
2012年度	40,600,000	12,180,000	52,780,000
総計	225,900,000	67,770,000	293,670,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：分子細胞生物学

### 1. 研究開始当初の背景

体細胞分裂で染色体の正確な継承を保證する仕組みは、生物が自己複製をするために重要なプロセスである。また、減数分裂では、全く同じゲノムを継承するのではなく、一部を組み替えた変化させたゲノムを継承する。

このような変化が、次世代にゲノムを継承するために重要である。申請者らは、分裂酵母を用いた研究から、体細胞分裂から減数分裂に移行すると、染色体配置が、セントロメアが束ねられた構造からテロメアが束ねられた構造へと、核内で劇的に変化することを発

見し、体細胞分裂と減数分裂で染色体配置が全く異なることを明確に示した (Chikashige et al., Science 1994)。その後、ヒトや出芽酵母などでも同様の構造変化が起こることが相次いで発見され、このような変化がヒトを含めた多くの生物種の生殖において、世代を超えた遺伝情報の継承に重要なプロセスとして認識されてきた。しかし、このプロセスに必須な分子やメカニズムの解析は部分的にしか為されておらず、次世代へ遺伝情報を継承するための「場」の実体については全く不明であった。

## 2. 研究の目的

遺伝情報の正確な継承を保證する時空間「場」の特性を明らかにし、継承のメカニズムを分子レベルで理解することを目的としている。特に、遺伝情報であるゲノムDNAを次世代（子孫）へ継承するメカニズムとして、減数分裂過程に注目し、ゲノム継承に役割を果たす「場」の実体を分子レベルで明らかにするものである。

## 3. 研究の方法

遺伝情報を継承する仕組みとして、主に、申請者が独自に開発した3つの解析方法（ゲノムワイド分裂酵母蛍光タンパク質ライブラリー、蛍光生細胞イメージング法、DNA マイクロアレイ）を用いて解析する。主に、分裂酵母の減数分裂過程に着目し、次世代へゲノム情報を継承する仕組みを検討する。まず、分裂酵母蛍光タンパク質ライブラリーとDNA マイクロアレイ解析から減数分裂過程で働く因子群を同定する。同定した因子に対して、さらに、蛍光生細胞イメージング法や分子遺伝学的な解析を行い、変異体や欠質変異体の表現形などから、遺伝情報継承場に関わる分子やメカニズムを明らかにする。さらに、分裂酵母で得られた因子について、ヒトなどの高等動物と共通するものについては、培養細胞において局在解析や機能解析を行い、普遍化を試みる。異なる因子については、進化的な観点から機能を検討する。

## 4. 研究成果

体細胞分裂から減数分裂へ移行する際には、セントロメアが束ねられたセントロメアクラスター配置からテロメアが束ねられたテロメアクラスター配置へと、染色体の核内配置が劇的に変化する。本研究課題では、この核内配置の仕組みや相同染色体を対合させる仕組みについて蛍光イメージング技術やDNA マイクロアレイ、分子遺伝的な手法を併用して解析し、分裂酵母のテロメアクラスター配置を決定する仕組みを分子レベルで明らかにした。また、相同染色体対合に noncoding RNA (非コード RNA) が必要である

ことを明らかにした。これらの成果は、遺伝情報の継承場として働く因子や仕組みを明らかにしたものである。

## 遺伝情報場を可視化するためのイメージング技術の開発

イメージング技術の高度化として、生きた細胞での分子ダイナミクス解析とナノメートルオーダーの空間分解能を実現できるナノイメージング技術を開発した。これは、細胞試料を蛍光顕微鏡で連続的に観察し、それを化学固定したのちに、同じ細胞を電子顕微鏡で観察するものである (Asakawa et al., *in* “Current microscopy contributions to advances in science and technology”, 2012)。この方法を用いて、分裂酵母の減数分裂期の染色体、核タンパク質、核膜の挙動を解析した。その結果、後述するように、分裂酵母の減数第2分裂後期に起こる“バーチャル核膜崩壊” (virtual nuclear envelope breakdown; V-NEBD) が起こることを発見した (Asakawa et al., *Curr. Biol.*, 2010)。また、分裂酵母の核内膜タンパク質の機能 (Hiraoka et al., *Genes Cells*, 2011) や出芽酵母のプリオン凝集体の構造を明らかにした (Kawai-Noma et al., *J. Cell Biol.*, 2010)。

蛍光イメージング法の空間分解能を上げるために3次元 Structured Illumination 顕微鏡法 (3D-SIM) を開発した。これを用いて、減数分裂期の染色体構造を明らかにした (Matsuda and Hiraoka, 未発表)。また、フランスのグループによって開発されたノイズ除去アルゴリズムを応用し、既存の蛍光画像からノイズを除去ことに成功した (Hamasaki et al., *Nature*, 2013)。

## 遺伝情報継承に関与するタンパク質群の検索

遺伝情報継承場として働く因子を解明するために、遺伝情報継承に関わるタンパク質群の検索を行った。まず、独自に作製した分裂酵母の蛍光タンパク質ライブラリー (Hayashi et al., *Genes Cells*, 2009) から、その局在に基づいて、核タンパク質を選出した。このライブラリーは、染色体上の本来の遺伝子に GFP 遺伝子を融合させてあるので、GFP 融合タンパク質が生理的な条件で発現しているという特長がある。この核タンパク質群から、遺伝情報継承に関わる遺伝子群を絞り込むために、DNA マイクロアレイでそれぞれの発現量を解析し、減数分裂の誘導に伴って発現量が増加するものを候補遺伝子として選んだ。候補遺伝子の遺伝子産物の減数分裂期での細胞内局在を蛍光イメージング法で検討し、核膜および染色体タンパク質に局在するものを選別した。これらのタンパ

ク質の遺伝子について、遺伝子破壊などの分子遺伝的改変を行い、遺伝情報  
 収納や継承にどのように影響するか、体細胞期と減数分裂期の染色体構造や動態を生きた細胞で観察することによって検討した。これらの解析により、後述するように、細胞核の構造と機能に関わる一群のタンパク質を同定した。

#### 減数分裂でのゲノム継承に必要なテロメアクラスター配置の仕組みの解明

検索で得られた候補タンパク質の遺伝子破壊株について、テロメアの位置が核膜から離脱するものを蛍光顕微鏡観察で調べ、テロメアを核膜につなぎとめるタンパク質として Bqt3 と Bqt4 を新たに同定した (図1; Chikashige et al., *J. Cell Biol.*, 2009)。すでに同定していた Bqt1 と Bqt2 と共に、これでテロメアを核膜に結びつける因子のほぼ全てを明らかにしたものと考えている。この結果に基づいて、分裂酵母のテロメアクラスター配置を決める仕組みを明らかにし (Chikashige et al., *Nucleus*, 2009)、染色体を核膜に繋ぎ止める普遍的な仕組みを提唱した (Hiraoka and Dernburg, *Dev. Cell*, 2009)。

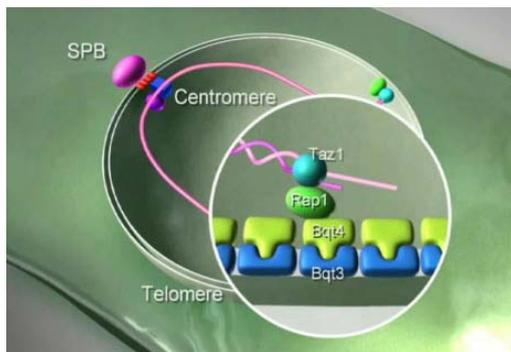


図1 テロメアを核膜につなぎ止める因子

これらの核膜タンパク質がテロメアクラスターを引き起こす仕組みを分子構造の観点から理解するために、Bqt1-Bqt2 タンパク質の結晶構造解析を目指した。その第一歩として、Bqt1-Bqt2 タンパク質複合体を大量に作製し精製する法を開発し、その生化学的特性を報告した (Ichikawa et al., *Protein Expr. Purif.*, 2013)。

#### 減数分裂でのゲノム継承に必要な相同染色体対合の仕組みの解明

染色体の特定領域を蛍光ラベルした分裂酵母の細胞株を多数作成し、生細胞イメージング法を用いて減数分裂過程を観察した結果、第2染色体の sme2 遺伝子領域において高頻度で相同染色体が対合することを発見した。sme2 遺伝子領域を欠損させると対合の

頻度が低下し、sme2 遺伝子領域を染色体の別の領域に移動させると、その領域の対合頻度が上昇した。さらに、sme2 からは非コードRNA が合成され、これが sme2 遺伝子領域に蓄積されて、対合が起こることを明らかにした (図2)。この研究成果は、非コードRNA が相同染色体の認識に関与することを、世界で初めて示した画期的なものである (Ding et al., *Science*, 2012)。減数分裂における相同染色体の対合は、有性生殖を行う真核生物にとってゲノムを子孫に継承するために普遍的で重要なプロセスであり、そのメカニズムの解明は生物学的に重要な課題である。また、その失敗は卵子や精子の異常による不妊やダウン症に代表されるトリソミー症候群につながるために、医学的にも重要な発見である。

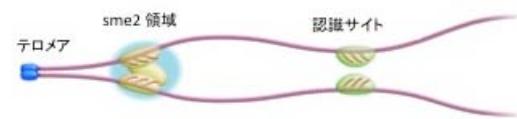
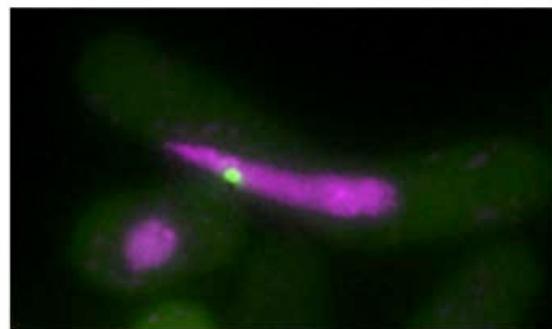


図2 相同染色体の相互認識に関与する非コードRNA (上段: 緑色の輝点、下段: sme2 領域)

#### 体細胞分裂における染色体の異数性とゲノムの安定性の関係の発見

正常な細胞が2倍体の染色体構成を持つのと対照的に、多くのガン細胞で染色体の異数性が見られる (染色体数に過不足がある)。この染色体の異数性と、細胞のがん化や悪性化にどのような関係があるかは長く不明であった。この関係を明らかにするために、出芽酵母および分裂酵母において様々な異数性細胞を作成し、ゲノムの継承という観点からその細胞の特徴を解析した。異数体細胞では、DNA 二重鎖切断の蓄積と DNA 損傷修復の低下が見られ、これに伴って突然変異や染色体の分配異常が亢進した (Sheltzer et al., *Science*, 2011)。この結果は、異数体細胞では、染色体の再編が起りやすく、ゲノムの不安定性が増していることを示している。これによって、長らく謎であった、染色体の異数性がゲノムの安定性に影響する仕組みが明らかとなった。ガン化や悪性化の仕組みを

理解する上でも重要な発見である。

### 遺伝情報継承に対する核膜・核膜タンパク質の役割の理解

ゲノムの維持に核膜の存在が必須であることは明白であるが、その時の核膜タンパク質の機能については明らかではなかった。我々は、分裂酵母を用いて遺伝情報継承に対する核膜・核膜タンパク質の役割を解析した。まず、核膜タンパク質をGFPライブラリーから検索し、3つの核膜タンパク質 Imal, Lem2, Man1 を抽出し、その機能や動態を解析した。その結果、これらのタンパク質は、それぞれ相互に作用しながら核膜構造を維持し、ゲノム継承に対してそれぞれ異なる役割を果たすことを明らかにした (Hiraoka et al., *Genes Cells*, 2011)。

減数分裂期の核膜構造を解析し、第2減数分裂期後期の非常に短い時間(2分)だけ、核膜が物理的に存在するにも関わらず、まるで崩壊したかのように核膜のバリア機能が低下することを発見した。この新規な現象を、バーチャル核膜崩壊(virtual nuclear envelope breakdown; V-NEBD)と名付けた (Asakawa et al., *Curr. Biol.*, 2010; Asakawa et al., *Nucleus*, 2011)。

染色体末端テロメアに結合するタンパク質 Rap1 の分子構造を明らかにした (Chen et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2011)。さらに、体細胞分裂周期でテロメアと核膜の結合が制御される仕組みを解析し、テロメアタンパク質 Rap1 のリン酸化・脱リン酸化によって、それぞれ核膜との結合・離合が起こることを明らかにした (Fujita et al., *Curr. Biol.*, 2012)。

### 体細胞分裂における核膜と染色体の相互作用と転写制御の理解

ヒト培養細胞を用いた研究において、クロマチンリモデリング因子 ARIP4 が細胞内局在制御を介して転写抑制する仕組みについて明らかにした (Ogawa et al., *Mol. Biol. Cell*, 2009)。また、転写因子 Sox9 の転写抑制の仕組みについての解析を行い、制御タンパク質として Exp4 を発見した (Tsuchiya et al., *PLoS ONE*, 2011)。

さらに、転写制御における核膜の役割を明らかにするために、核膜と染色体の相互作用について解析を行った。その結果、ヒトの核内膜タンパク質 Lamin B Receptor (LBR) がヒストン H4 の特殊な翻訳後修飾(20番目のリジンのメチル化)に結合することを明らかにし、核膜近傍でクロマチンの凝縮が起こる分子モデルを提唱した(図3; Hirano et al., *J. Biol. Cell*, 2012)。

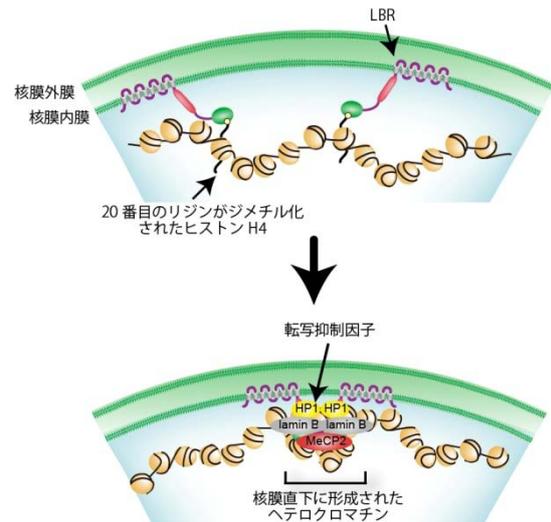


図3 LBRによるヘテロクロマチン形成のモデル  
核内膜タンパク質LBRはH4K20me2クロマチンを認識して結合し、核膜直下のヘテロクロマチン形成を行う

### 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48件)

1. Ichikawa Y, Kagawa W, Saito K, Chikashige Y, Haraguchi T, Hiraoka Y, Kurumizaka H. (2013) Purification and characterization of the fission yeast telomere clustering factors, Bqt1 and Bqt2. *Protein Expr. Purif.* 88, 207-213. doi: 10.1016/j.pep.2013.01.006. (査読有)
2. Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Oomori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Yoshimori T, Amano A. (2013) Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* 495, 389-393. doi: 10.1038/nature11910 (査読有)
3. Ding DQ, Okamasa K, Yamane M, Tsutsumi C, Haraguchi T, Yamamoto M, and Hiraoka Y. (2012) Meiosis-specific non-coding RNA mediates robust pairing of homologous chromosomes in meiosis. *Science* 336, 732-736. doi: 10.1126/science.1219518 (査読有)
4. Fujita I, Nishihara Y, Tanaka M, Tsujii H, Chikashige Y, Watanabe Y, Saito M, Ishikawa F, Hiraoka Y, Kanoh J. (2012). Telomere=Nuclear Envelope Dissociation Promoted by Rap1 Phosphorylation Ensures Faithful

- Chromosome Segregation. *Curr. Biol.* 22, 1932–1937. doi: 10.1016/j.cub.2012.08.019. (査読有)
5. Hirano Y, Hizume K, Kimura H, Takeyasu K, Haraguchi T, Hiraoka Y. (2012) Lamin B receptor recognizes specific modification of histone H4 in heterochromatin formation. *J. Biol. Chem.* 287, 42654–42663. doi: 10.1074/jbc.M112.397950. (査読有)
  6. Asakawa H, Hiraoka Y., Haraguchi T. (2011) Physical breakdown of the nuclear envelope is not necessary for breaking its barrier function. *Nucleus* 2, 523–526. doi:10.4161/nucl.2.6.16117 (査読有)
  7. Tsuchiya M, Ogawa H, Suzuki T, Sugiyama N, Haraguchi T Hiraoka Y.. (2011) Exportin 4 interacts with Sox9 through the HMG box and inhibits the DNA binding of Sox9. *PLoS ONE* 6, e25694. doi:10.1371/journal.pone.0025694 (査読有)
  8. Hiraoka Y., Maekawa H, Asakawa H, Chikashige Y., Kojidani T, Osakada H, Matsuda A, Haraguchi T. (2011) Inner nuclear membrane protein Imal is dispensable for intranuclear positioning of centromeres. *Genes Cells* 16, 1000–1011. doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01544.x (査読有)
  9. Sheltzer JM, Blank HM, Pfau SJ, Tange Y, George BM, Humpton TJ, Brito LL, Hiraoka Y., Niwa O, Amon A. (2011) Aneuploidy drives genomic instability in yeast. *Science* 333, 1026–30. doi:10.1126/science.1206412 (査読有)
  10. Chen Y, Rai R, Zhou ZR, Kanoh J, Ribeyre C, Yang Y, Zheng H, Damay P, Wang F, Tsujii H, Hiraoka Y., Shore D, Hu HY, Chang S, Lei M. (2011) A conserved motif within RAP1 has diversified roles in telomere protection and regulation in different organisms. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 213–21. doi: 10.1038/nsmb.1974 (査読有)
  11. Asakawa H, Kojidani T, Mori C, Osakada H, Sato M, Ding DQ, Hiraoka Y., Haraguchi T. (2010) Virtual breakdown of the nuclear envelope in fission yeast meiosis. *Curr. Biol.* 20, 1919–1925. doi: 10.1016/j.cub.2010.09.070. (査読有)
  12. Chikashige Y., Haraguchi T, Hiraoka Y. (2010) Nuclear envelope attachment is not necessary for telomere function in fission yeast. *Nucleus* 1, 481–486. doi: 10.4161/nucl.1.6.13113. (査読有)
  13. Kawai-Noma S, Pack C-G, Kojidani T, Asakawa H, Hiraoka Y., Kinjo M, Haraguchi T, Taguchi H, Hirata A. (2010) In vivo evidence for the fibrillar structures of Sup35 prions in yeast cells. *J. Cell Biol.* 190, 223–231. doi: 10.1083/jcb.201002149. (査読有)
  14. Chikashige Y., Yamane M, Okamasa K, Tsutsumi C, Kojidani T, Sato M, Haraguchi T, Hiraoka Y. (2009) Membrane proteins Bqt3 and Bqt4 anchor telomeres to the nuclear envelope to ensure chromosomal bouquet formation. *J. Cell Biol.* 187, 413–427. doi: 10.1083/jcb.200902122. (査読有)
  15. Hiraoka Y., Dernburg AF. (2009) The SUN rises on meiotic chromosome dynamics. *Dev. Cell* 17, 598–605. doi: 10.1016/j.devcel.2009.10.014. (査読有)
  16. Ogawa H, Komatsu K, Hiraoka Y., and Morohashi K. (2009) Transcriptional Suppression by Transient Recruitment of ARIP4 to Sumoylated Nuclear Receptor Ad4BP/SF-1. *Mol. Biol. Cell* 20, 4235–4245. doi: 10.1091/mbc.E08-12-1247. (査読有)
  17. Hayashi A, Ding, DQ, Tsutsumi C, Chikashige Y., Masuda H, Haraguchi T and Hiraoka Y. (2009) Localization of gene products using a chromosomally tagged GFP-fusion library in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* 14, 217–225. doi: 10.1111/j.1365-2443.2008.01264.x. (査読有)
- [学会発表] (計 205 件)
1. Hiraoka Y., Haraguchi T. Live correlative light and electron microscopy of mammalian and yeast cells. ICHC Kyoto2012 (国際組織細胞化学会) 14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry (Aug. 27, 2012) Kyoto International Conference Center, Kyoto, Japan (招待講演)
  2. Hiraoka Y. The Nuclear Envelope in Meiosis. The 20th Jerusalem School in Life Sciences “Nuclear Organization, Dynamics and Activity” (Jul. 23, 2012) Israel Institute for Advanced Studies at the Hebrew University, Israel (招待講演)
  3. Hiraoka Y. Meiosis-specific

- non-coding RNA in homologous chromosome pairing. Gordon Research Conference “Meiosis” (Jun. 6, 2012) Colby-Sawyer College, USA (招待講演)
4. Hiraoka Y. Meiosis-specific non-coding RNA mediates pairing of homologous chromosomes in meiosis. Gordon Research Conference “Chromatin Structure & Function” (May. 9, 2012) Colby-Sawyer College, USA
  5. Hiraoka Y., Ding D-Q, Haraguchi T. Meiosis-specific non-coding RNA mediates robust pairing of homologous chromosomes in meiosis. The EMBO Conference on Meiosis (2<sup>nd</sup>) (Sep. 19, 2011) Capaccio/Paestum, Italy (招待講演)
  6. Hiraoka Y. Meiosis-specific non-coding RNA mediates robust pairing of homologous chromosomes in meiosis. Gordon Research Conference “Chromosome Dynamics” (Jul. 13, 2011) Mount Snow Resort, USA (招待講演)
  7. Hiraoka Y., Ding D-Q, Haraguchi T. Pairing and recognition of homologous chromosomes in meiosis. Pombe2011 The 6th International Fission Yeast Meeting (June 29, 2011) Boston, U. S. A (招待講演)
  8. Hiraoka Y. Nuclear membrane properties in mitosis and meiosis. Gordon Research Conferences “Meiosis” (Jun 16, 2010) Colby-Sawyer College New London, USA (招待講演)
  9. Hiraoka Y., Chikashige Y., Ding D-Q, Asakawa H, Maekawa H, Haraguchi T. Large-scale localization of protein components of nuclear structures in fission yeast. The 5th International Fission Yeast Meeting (Oct. 30, 2009) National Olympics Memorial Youth Center, Tokyo, Japan (招待講演)

[図書] (計2件)

1. Asakawa H, Hiraoka Y., Haraguchi T. (2012) Live CLEM imaging: an application for yeast cells In “Current microscopy contributions to advances in science and technology”, vol. 1; 478-485. A. Méndez-Vilas (Ed.) Formatex Research Center
2. 平岡 泰 (2009) 遺伝情報の時空間場の理解に向けて. 実験医学 増刊 細胞核—遺伝情報制御と疾患 27, 2708-2714. 羊土社

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

- ① 名称: Vrk1 蛋白質抗体とその製造方法、抗原、検知方法  
 発明者: 原口徳子、荒神尚子、平岡泰  
 権利者: 独立行政法人 情報通信研究機構  
 種類: 特許権  
 番号: 特願2009-155028  
 出願年月日: 平成21年6月30日  
 国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

[http://www.genofield.osaka-u.ac.jp/pfga\\_index.html](http://www.genofield.osaka-u.ac.jp/pfga_index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平岡 泰 (HIRAOKA YASUSHI)  
 大阪大学・生命機能研究科・教授  
 研究者番号: 10359078

(2) 研究分担者

近重 裕次 (CHIKASHIGE YUJI)  
 (独) 情報通信研究機構・未来 ICT 研究所・主任研究員  
 研究者番号: 60359081

(3) 連携研究者

なし