

平成 21 年 6 月 4 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2008

課題番号：19037026

研究課題名（和文）M 期チェックポイントシステムの機能制御ネットワークの解明

研究課題名（英文）Analysis of the signal network regulating the mitotic checkpoint

研究代表者

齋藤 成昭 (Saitoh Shigeaki)

久留米大学・分子生命科学研究所・准教授

研究者番号：30352123

研究成果の概要：

M 期チェックポイントは、細胞増殖過程における遺伝情報の安定な伝達に必要な細胞周期制御メカニズムです。今回、我々は、M 期チェックポイントには、2つの独立した制御経路が存在していることを明らかにしました。これらは、M 期チェックポイントの発動に関わるとともに、紡錘体と動原体の正常な結合を促すエラー訂正機構にも関与しているものと思われます。今回の結果は、染色体安定分配機構の分子基盤の一端を明らかとするとともに、染色体数異常に起因する疾患等に対する理解の一助となるものと期待出来ます。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	3,100,000	0	3,100,000
2008 年度	3,100,000	0	3,100,000
年度			
年度			
年度			
総計	6,200,000	0	6,200,000

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：染色体分配・動原体・紡錘体・細胞周期・チェックポイント

## 1. 研究開始当初の背景

M 期チェックポイントは、細胞増殖過程における遺伝情報伝達の正確性を保証するコントロールメカニズムです。真核生物では、遺伝情報は染色体としてまとめられています。複製されて倍加した染色体は、有糸分裂期(M 期)に、紡錘体と結合して子孫細胞へと分配されます。この時、紡錘体と染色体の結合に異常が生じると、遺伝情報が正しく娘細胞へと伝達されず、結果的に遺伝情報が不足した、あるいは過剰になった異数体が生じます。異数体は、さまざまな疾患の原因である

ことが分かっており、また悪性度の高い癌細胞では、異数体が高い頻度で発生することが知られています。M 期チェックポイントは、紡錘体と染色体の結合状態を監視しており、正しい結合状態が確立するまで、M 期の進行を一時的に止める細胞周期制御機構です。このチェックポイントには Mad2 や Bub1 という分子が関与しており、また、紡錘体との結合インターフェースである動原体が、重要な役割を担っていることが知られていました。しかしながら、動原体と紡錘体の結合異常が、どのような仕組みで感知されて M 期チ

チェックポイントの活性化へと結びつくのか、また感知された異常を修復するメカニズムとチェックポイントがどのように連携しているのかについては、不明な点が多く残されていました。

研究代表者らは、分裂酵母をモデルとしたこれまでの研究で、動原体の構成因子である「Mis6 タンパク質」、動原体と紡錘体の両方で機能する「DASH 複合体」が M 期チェックポイント機能に重要であること、また Mad2、Bub1 の動原体への局在化が細胞周期進行制御に重要であることなどを見出していました。

## 2. 研究の目的

上述のような背景に基づき、研究代表者は、M 期チェックポイント機構における、1)DASH 複合体、2)Mad2、3)Bub1、4)動原体(Mis6 タンパク質)、といった生体ナノシステム間の機能的相関関係を明らかにし、また M 期チェックポイントと、動原体 紡錘体の結合異常を修正する「修復機構」との連携様式を解き明かすことを目指しました。これらの研究により、遺伝情報の安定な継承を保證する生体機能ネットワークの一端が垣間見えるものと期待しました。

## 3. 研究の方法

本研究を進める上で、次のような仮説をたてました。

動原体と紡錘体の結合異常は a)姉妹動原体間の張力(tension)の不在、あるいは b)動原体と紡錘体構成微小管(キネトコアファイバー)の結合(attachment)の不全を指標として識別される。

DASH 複合体は attachment 不全を検出するセンサー機構であり、一方 Bub1 は tension の不在を感知するセンサーに関わっている。

M 期チェックポイントの活性化と連動して、動原体 紡錘体の結合異常を修正するエラー訂正機構が働く。

これらの仮説を検証するために、分裂酵母をモデル生物として、分子遺伝学および細胞生物学的解析を行いました。具体的には、以下のような解析を行いました。

- (1) 突然変異株、あるいは薬剤を利用して人為的に動原体と紡錘体の結合状態をコントロールできる実験系の作成。
- (2) 上記実験系を利用して、動原体 紡錘体の結合状態と、Mad2 タンパク質の細胞内

局在の関係性を、GFP 融合法などを用いて細胞生物学的に観察。

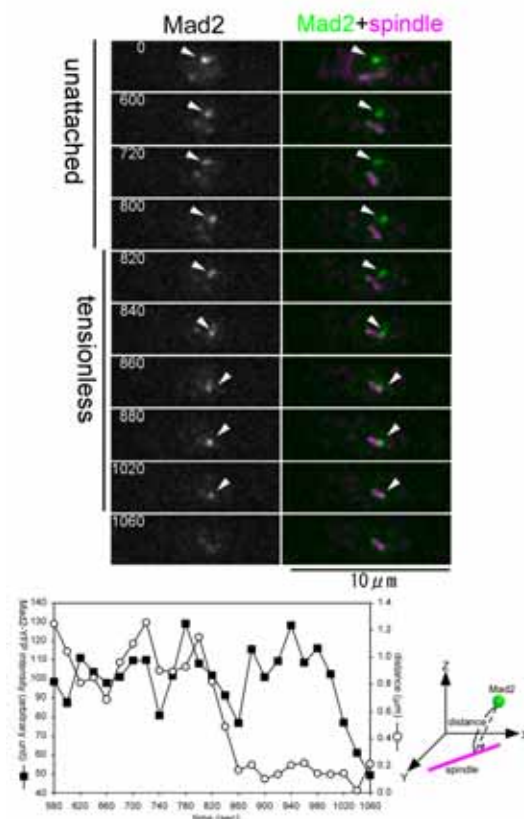
- (3) DASH 遺伝子や *bub1* 遺伝子を破壊した株で、(2)の観察を行い、これらの遺伝子が Mad2 の局在制御において果たす役割を探索した。
- (4) さらに、DASH 破壊株、*bub1* 破壊株における、M 期の紡錘体、動原体の運動を観察し、これらの遺伝子と、紡錘体 動原体結合異常との関連性について探索した。

これらの4つの解析を主軸として研究を進めました。

## 4. 研究成果

紡錘体の主成分である微小管を一時的に脱重合させて、紡錘体から完全に離脱した動原体を作り出しました。次いで、微小管を重合させて紡錘体の再構築を促したところ、一度離脱した動原体が再び紡錘体と結合しました。その過程を顕微鏡下でタイムラプス撮影することで、紡錘体と全く結合していない「unattached 動原体」、紡錘体と結合しているが張力を受けていない「tensionless 動原体」、そして紡錘体と正常に結合した「bioriented 動原体」を識別することが可能となりました。

この系を利用して Mad2 タンパク質の細胞内局在を観察したところ、下図のような結果が得られました。



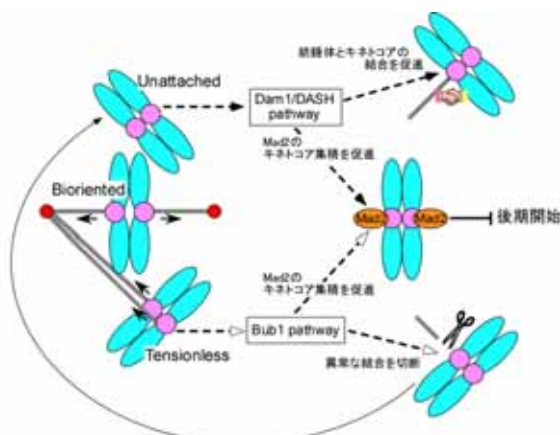
この図は、Mad2 タンパク質は、M 期になると「unattached 動原体」と「tensionless 動原体」に局在化するが、「bioriented 動原体」には局在化しない、ということを示していました。

同様の解析を、*bub1* 遺伝子破壊株を用いて行ったところ、大変興味深いことに、Mad2 タンパク質は依然として「unattached 動原体」には局在したものの、「tensionless 動原体」には全く局在しなくなりました。この結果は、「tensionless 動原体」をチェックポイントが感知するためには Bub1 タンパク質が必要となることを強く示唆していました。

次いで、「unattached 動原体」への Mad2 局在化に必要な因子を探索したところ、DASH 複合体が、そのような因子であることを示唆する証拠が得られました。その結果と符合するように、*bub1* と DASH 複合体の両者を欠く変異株では Mad2 が動原体へと全く局在化出来ず、さらにはチェックポイント制御も機能しなくなるという結果を得ました。

さらに、DASH 破壊株の解析を進めたところ、この株では、動原体の「unattached」状態をうまく解消して「bioriented」状態へと移行することが出来なくなっていることを見出しました。先の結果と合わせると、DASH 複合体は「unattached 動原体」を感知して M 期チェックポイントを発動するとともに、その異常を修正して「bioriented 動原体」へと変換するためのエラー訂正機構の発動にも関わっているものと推察されます。同様に、Bub1 は、「tensionless 動原体」を感知して M 期チェックポイントを発動するとともにそのエラー訂正にも関与しているものと思われます。

以上の結果を総合したところ、次図に示すような制御ネットワークが明らかとなりました。



M 期チェックポイントは「unattached 動原体」と「tensionless 動原体」にตอบสนองして M

期後期の進行を抑制しますが、それぞれの応答に関わる分子経路は異なっています。これらの異常は、それぞれ相反するメカニズムによって解消されなければなりません、2つの異なる制御経路が存在することにより、「M 期進行停止」と「異常の解消」が、効率的に連携されているものと思われます。

以上の成果は、染色体分配の正確性をつかさどる分子基盤の一端を明らかにするのみならず、染色体分配異常に起因する様々な疾患等の分子的理解の一助にもなると期待されます。

## 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1件)

Saitoh S., Kobayashi Y., Ogiyama Y. and Takahashi K. Dual Regulation of Mad2 Localization on kinetochores by Bub1 and Dam1/DASH that ensure proper spindle interaction. *Molecular biology of the cell*, 19;3885-3897 2008 査読有り

[学会発表](計5件)

齋藤成昭、小林受世、荻山友貴、高橋考太 「M期チェックポイントタンパク質 Mad2 のキネトコア局在化を制御する2つの経路」, 第31回日本分子生物学会年会, 2008年12月(兵庫県)

齋藤成昭、小林受世、荻山友貴、高橋考太 “Dual Regulation of Mad2 Localization on kinetochores by Bub1 and Dam1/DASH that ensure proper spindle interaction”, 2<sup>nd</sup> international symposium on bio-nanosystems, 2008年10月(東京都)

齋藤成昭、小林受世、荻山友貴、高橋考太 「M期チェックポイントタンパク質 Mad2 のキネトコア局在化を制御する2つの経路」, 酵母遺伝学フォーラム第41回研究報告会, 2008年9月(北海道)

齋藤成昭、小林受世、荻山友貴、高橋考太 「M期チェックポイントタンパク質 Mad2 のキネトコア局在化を制御する2つの経路」, 第25回染色体ワークショップ, 2008年1月(静岡県)

齋藤成昭、小林受世、高橋考太 “The bub1 checkpoint pathway and the DASH complex regulate the kinetochore localization of Mad2”, Fourth international fission yeast meeting, 2007年6月(デンマーク)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 成昭 (Saitoh Shigeaki)

久留米大学・分子生命科学研究所・准教授

研究者番号：30352123

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し