

機関番号：14401
 研究種目：基盤研究(A)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20247021
 研究課題名(和文) フェロモンに応答して作られる減数分裂期のクロマチン構造と染色体核内配置の解析
 研究課題名(英文) Pheromone-responsive reorganization of chromosomes in meiosis

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

研究成果の概要(和文)：

本研究課題においては、分裂酵母を用いて、体細胞分裂期から減数分裂期への移行に伴って、染色体核内配置がどのように変化するか、その分子機構の解析を行った。減数分裂に特異的に形成されるタンパク質複合体を蛍光顕微鏡観察で検索するとともに、分子遺伝学的解析によって機能解析を行った。その結果、核膜上において染色体核内配置を変化させる複合体や相同染色体対合に関わる複合体を見いだした。

研究成果の概要(英文)：

We are trying to understand molecular mechanisms for reorganization of chromosomes during the transition from mitosis to meiosis using fission yeast. Toward this end, we searched for meiosis-specific protein complexes within the nucleus by fluorescence microscopy in conjunction with molecular genetic analysis. We identified protein complexes that mediate chromosome reorganization and that mediate homologous chromosome pairing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	18,600,000	5,580,000	24,180,000
2009年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2010年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
年度			
年度			
総計	34,000,000	10,200,000	44,200,000

研究分野：細胞生物学、生物物理学

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、ゲノム、可視化、細胞・組織、染色体構築・機能・分配、減数分裂

1. 研究開始当初の背景

分裂酵母では、通常は減数分裂に進行しない条件からでも、接合フェロモン応答性 MAPキナーゼを活性化するだけで、減数分裂に誘導でき、セントロメアとテロメアが減数分裂型に変化する。このことから、接合フェロモンの作用のもとで作られるセントロメアやテロメアの構造が正常な減数分裂を保障するための鍵となっていることが予想された。しかし接合フェロモンの標的となる因子に

ついては全く分かっておらず、その下流で作られる減数分裂期特有のセントロメア構造やテロメア構造についても包括的な理解は成されていなかった。

2. 研究の目的

本研究課題は、分裂酵母を用いて、接合フェロモンの作用がどのようにクロマチン構造と染色体核内配置を変化させるか、その分子機構を解明することを目的とする。分裂酵

母で見られる減数分裂期の染色体空間配置の変化は、ヒトや高等動物の減数分裂にも共通にみられ、正常な減数分裂の進行に必須である。そのため、この分子基盤の解明は、ヒトや植物などの高等真核生物の減数分裂過程を理解する上でも重要な基盤研究となる。これによって、ヒトをはじめとする真核生物に普遍的な減数分裂の仕組みの解明を目指す。

3. 研究の方法

減数分裂を強制誘導した時に、接合フェロモンの作用がある時とない時で変動するタンパク質を、DNA マイクロアレイによる発現量の解析と蛍光イメージングによる局在解析によりゲノムワイドにスクリーニングし、網羅的に検討するものである。特に、セントロメア、テロメア、キアズマなど、減数分裂で顕著な特徴を示す染色体構造に注目し、フェロモン応答により変動する構成タンパク質を蛍光イメージングで検索し、そのクロマチン構造と染色体配置における役割を分子遺伝学的に解する。また、セントロメアやテロメアが相互作用する細胞構造として核膜に注目し、核膜タンパク質とセントロメアまたはテロメアタンパク質の相互作用について詳しく検討する。

4. 研究成果

ゲノムワイドイメージングによる減数分裂特異的クロマチンタンパク質の検索

細胞核または染色体に局在する分子を網羅的に検索する目的のために、分裂酵母の全遺伝子 5000 個の中から構造タンパク質をコードすると考えられる遺伝子を選択し、各遺伝子に GFP 遺伝子をそれぞれ融合した細胞株約 1000 種類を作製し、細胞内局在に基づいて分類した (Hayashi et al., Genes Cells, 2008)。この GFP 融合ライブラリーは、染色体上の遺伝子を GFP 融合遺伝子で置換しているために、本来のプロモーターから GFP 融合タンパク質が発現しており、減数分裂に特異的に発現するタンパク質についても生理的な条件下で細胞内局在を解析できる点が大きな特長である (Asakawa and Hiraoka, Methods Mol. Biol. 2009)。このようなゲノムワイドの検索により、細胞分裂周期や減数分裂において細胞核機能に関わる紡錘極体複合体 (Masuda et al., Mol. Biol. Cell, 2011; Yamamoto et al., J. Cell. Biol., 2008)、およびセントロメア・テロメア複合体 (Asakawa and Hiraoka, Methods Mol. Biol. 2009; Chen et al., Nat. Struct. Mol. Biol., 2011)。

相同染色体対合に関わる複合体

相同染色体対合に関わる染色体領域として *sme2* 遺伝子領域を発見し、この領域が相同染色体の相互認識に関わるというモデルと提案した (Ding et al., FEBS J., 2010)。さらに、この相同染色体対合に関わる減数分裂特異的な非コード RNA 配列を同定し (Ding et al., 論文投稿中)、この RNA 配列と結合するタンパク質の同定を進めている。

核膜と染色体の相互作用に関わる複合体

減数分裂期のテロメアクラスターに欠損を示す変異株を検索した中から、テロメアを核膜につなぎ止める新規のタンパク質を 2 つ発見し、Bqt3 および Bqt4 と名付けた (Chikashige et al., J. Cell Biol., 2009)。また、減数分裂期に特有に核膜のタンパク質透過性が一過的に変化する現象を見いだした。胞子形成に障害を示す変異株ではこの現象が見られないことから、減数分裂制御に何らかの関係があることが示唆された (Asakawa et al., Curr. Bio. 2010)。減数分裂の進行における核膜の役割については、まだわからないことが多く、今後の課題となっている。

染色体空間配置を決定する基本原理の提唱

前述のような染色体の配置転換は、細胞質のタンパク質モーターが核膜越しに核内の染色体を駆動することによって起こることがわかった (Chikashige et al, 2006, Cell; Chikashige et al, 2009, J. Cell Biol.)。おもしろいことに、このようなテロメアとセントロメアの配置転換は、相同染色体の組換えにも影響を与えることがわかっており、テロメアクラスターが形成されないと相同染色体の組換え頻度が低下し、胞子の生存率が低下する (Ding et al., 2004, Dev. Cell; J. Cell Biol.; Ding et al., 2010, FEBS J.)。さらに、この仕組みは高等動物でも普遍的にみられ、発生過程での形態形成など広範な高次生命現象に関わることがわかり、核内で染色体を駆動する基本原理を提唱することができた (Hiraoka and Dernburg, 2009, Dev. Cell)。

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 33 件)

1. Y. Chen, R. Rai, Z. R. Zhou, J. Kanoh, C. Ribeyre, Y. Yang, H. Zheng, P. Damay, F. Wang, H. Tsujii, Y. Hiraoka, D.

- Shore, H. Y. Hu, S. Chang, M. Lei (2011) A conserved motif within RAP1 has diversified roles in telomere protection and regulation in different organisms. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 213-221 査読有
2. H. Masuda, C.S. Fong, C. Ohtsuki, T. Haraguchi, Y. Hiraoka (2011) Spatio-temporal regulations of Wee1 at the G2-M transition. *Mol. Biol. Cell*, 22, 555-569. 査読有
 3. E.A. Osborne, Y. Hiraoka, J. Rine (2011) Symmetry, asymmetry, and kinetics of silencing establishment in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by single-cell optical assays. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 108, 1209-1216. 査読有
 4. T. Nakano, J. Shuai, T. Koujin, T. Suda, Y. Hiraoka, T. Haraguchi (2010) Biological Excitable Media Based on Non-excitable Cells and Calcium Signaling. *Nano Communication Networks*, 1, 43-49. 査読有
 5. S. Kawai-Noma, C.-G. Pack, T. Kojidani, H. Asakawa, Y. Hiraoka, M. Kinjo, T. Haraguchi, H. Taguchi, and A. Hirata (2010) In vivo evidence for the fibrillar structures of Sup35 prions in yeast cells. *J. Cell Biol.* 190, 223-231 査読有
 6. M. Iwamoto, H. Asakawa, Y. Hiraoka and T. Haraguchi (2010) Nucleoporin Nup98: a gatekeeper in the eukaryotic kingdoms. *Genes Cells* 15, 661-669. 査読有
 7. S. Ito, L.-J. Tan, D. Andoh, T. Narita, M. Seki, Y. Hirano, K. Narita, I. Kuraoka, Y. Hiraoka and K. Tanaka (2010) MMXD, a TFIID-independent XPD-MMS19 protein complex involved in chromosome segregation. *Mol. Cell*, 39, 632-640. 査読有
 8. H. Asakawa, T. Kojidani, C. Mori, H. Osakada, M. Sato, D.-Q. Ding Y. Hiraoka, T. Haraguchi (2010) Virtual breakdown of the nuclear envelope in fission yeast meiosis. *Current Biology*, 20, 1919-1925. 査読有
 9. Y. Chikashige, T. Haraguchi, Y. Hiraoka (2010) Nuclear envelope attachment is not necessary for telomere function in fission yeast. *Nucleus*, 1, 481-486. 査読有
 10. S. Kobayashi, T. Kojidani, H. Osakada, A. Yamamoto, T. Yoshimori, Y. Hiraoka, and T. Haraguchi (2010) Artificial induction of autophagy around polystyrene beads in nonphagocytic cells. *Autophagy* 6, 36-45. 査読有
 11. D.-Q. Ding, T. Haraguchi, Y. Hiraoka (2010) Alignment and recognition of homologous chromosomes in meiosis. *FEBS Journal* 277, 565-570. 査読有
 12. M. Iwamoto, C. Mori, T. Kojidani, F. Bunai, T. Hori, T. Fukagawa, Y. Hiraoka, and T. Haraguchi (2009) Two Distinct Repeat Sequences of Nup98 Nucleoporins Characterize Dual Nuclei in the Binucleated Ciliate *Tetrahymena*. *Current Biology* 19, 843-847. 査読有
 13. H. Asakawa, Y. Hiraoka (2009) Live-cell fluorescence imaging of meiotic chromosome dynamics in *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in Molecular Biology* 558, 53-64. 査読有
 14. H. Ogawa, T. Komatsu, Y. Hiraoka, and K. Morohashi (2009) Transcriptional Suppression by Transient Recruitment of ARIP4 to Sumoylated Nuclear Receptor Ad4BP/SF-1. *Mol. Biol. Cell* 20, 4235-4245. 査読有
 15. Y. Chikashige, M. Yamane, K. Okamasa, C. Tsutsumi, T. Kojidani, M. Sato, T. Haraguchi, Y. Hiraoka (2009) Membrane proteins Bqt3 and -4 anchor telomeres to the nuclear envelope to ensure chromosomal bouquet formation. *J. Cell Biol.* 187, 413-427. 査読有
 16. T. Murai, Y. Nakase, K. Fukuda, Y. Chikashige, C. Tsutsumi, Y. Hiraoka and T. Matsumoto (2009) Distinctive Responses to Nitrogen Starvation in the Dominant Active Mutants of the Fission Yeast Rheb GTPase. *Genetics* 183, 517-527. 査読有
 17. Y. Hiraoka and A. Dernburg (2009) The SUN rises on meiotic chromosome dynamics. *Developmental Cell* 17, 598-605. 査読有
 18. T. Nakano, T. Koujin, T. Suda, Y. Hiraoka, T. Haraguchi (2009) A Locally-Induced Increase in Intracellular Ca²⁺ Propagates Cell-to-Cell in the Presence of Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase Inhibitors in Non-excitable Cells. *FEBS Letters* 583, 3593-3599. 査読有
 19. Y. Hiraoka, K. Kawamata, T. Haraguchi and Y. Chikashige (2009) Codon usage bias is correlated with gene expression levels in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* 14, 499-509. 査読有
 20. A. Hayashi, D.-Q. Ding, C. Tsutsumi, Y. Chikashige, H. Masuda, T. Haraguchi, Y. Hiraoka (2009) Localization of gene products using a chromosomally-tagged GFP-fusion library in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*.

- Genes Cells 14, 217-225. 査読有
21. A. Yamamoto, K. Kitamura, D. Hihara, Y. Hirose, S. Katsuyama, and Y. Hiraoka (2008) Spindle checkpoint activation at meiosis I advances anaphase II onset via meiosis-specific APC/C regulation. *J. Cell Biol.* 182, 277-288. 査読有
 22. T. Nakamura, H. Asakawa, Y. Nakase, J. Kashiwazaki, Y. Hiraoka, C. Shimoda (2008) Live Observation of Forespore Membrane Formation in Fission Yeast. *Mol. Biol. Cell* 19, 3544-3553. 査読有
 23. T. Haraguchi, T. Kojidani, T. Koujin, T. Shimi, H. Osakada, C. Mori, A. Yamamoto, and Y. Hiraoka (2008) Live cell imaging and electron microscopy reveal dynamic processes of BAF-directed nuclear envelope assembly. *J. Cell Sci.* 121, 2540-2554. 査読有
 24. K. Ishii, Y. Ogiyama, Y. Chikashige, S. Soejima, F. Masuda, T. Kakuma, Y. Hiraoka, K. Takahashi (2008). Heterochromatin integrity affects chromosome reorganization after centromere dysfunction. *Science* 321, 1088-1091. 査読有
 25. T. Nakano, T. Suda, T. Koujin, T. Haraguchi, and Y. Hiraoka (2008) Molecular Communication through Gap Junction Channels. *Springer Transactions on Computational Systems Biology X*, 5410, 81-99. 査読有
- [学会発表] (計 140 件)
1. Y. Hiraoka, Y. Chikashige The Cell Nucleus: A Physicochemical Field for Genetic Activities of the Chromosome. International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities (Jan. 26, 2011) The Westin Awaji Island, Japan
 2. Y. Chikashige, Y. Hiraoka M phase-specific regulations of telomere. International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities (Jan. 24, 2011) The Westin Awaji Island, Japan
 3. Y. Hiraoka The Nuclear Pore Complex Determines Nuclear Differentiation in Ciliate *Tetrahymena thermophila*. International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities (Jan. 24, 2011) The Westin Awaji Island, Japan
 4. D.-Q. Ding, Y. Hiraoka Non-coding RNA mediates robust pairing of homologous chromosomes in meiosis. The American Society for Cell Biology Annual Meeting (Dec. 12, 2010) Philadelphia Pennsylvania Convention Center, USA
 5. Y. Chikashige, Y. Hiraoka Regulations of Telomere at M phase. The EMBO Conference Series "Telomeres and the DNA damage response" (Sep. 16, 2010) Marseille, France
 6. Y. Hiraoka Nuclear membrane properties in mitosis and meiosis. Gordon Research Conferences "Meiosis" (Jun. 16, 2010) Colby-Sawyer College, USA
 7. Y. Hiraoka, Y. Chikashige, D.-Q. Ding, H. Asakawa 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, Japan
 8. D.-Q. Ding and Y. Hiraoka A hot spot of homologous chromosome pairing in fission yeast. The EMBO Conference on Meiosis (Sep. 21, 2009) Isle sur la Sorgue, France
 9. H. Asakawa, Y. Hiraoka Live CLEM: A new approach for observing molecular dynamics in high resolution. 6th International Symposium on Electron Microscopy in Medicine and Biology 2009 (Sep. 17, 2009) Centennial Hall, Kobe University, Japan
 10. Y. Hiraoka Nup98 nucleoporins bearing different types of repeat sequence characterize nucleus-specific nuclear pore complexes in *Tetrahymena thermophila*. FASEB Summer Research Conferences "Ciliate Molecular Biology" (Jul. 24, 2009) Vermont Academy, USA
 11. H. Asakawa, Y. Chikashige, Y. Hiraoka Live CLEM: A New Approach for Observing Molecular Dynamics in High Resolution. The 9th NIBB-EMBL Symposium "Functional Imaging from Atoms to Organisms" (Apr. 20, 2009) Okazaki Conference Center, Japan
 12. Y. Hiraoka, H. Asakawa, Y. Chikashige Correlative light and electron microscopy for observing molecular dynamics in living cells 39th NIPS International Symposium & 7th OIB Symposium "Frontiers of Biological Imaging: Synergy of the Advanced Techniques" (Nov. 10, 2008) Okazaki Conference Center, Japan
 13. Y. Hiraoka, H. Asakawa, Y. Chikashige Correlative light and electron microscopy for observing molecular

- dynamics in living cells. 9th Asia-Pacific Microscopy Conference (Nov. 4, 2008) ICC Jeju, Korea
14. Y. Chikashige, Y. Hiraoka Inner nuclear membrane proteins required for the chromosomal bouquet arrangement in *Schizosaccharomyces pombe*. EMBO CONFERENCE SERIES "Telomeres and the DNA damage response" (Sep. 15, 2008) Villars-sur-Ollon, Switzerland
 15. Y. Hiraoka Role of Wee1 protein kinase at the S. pombe spindle pole body: Implication for the regulation of G2-M transition and spindle function. First EMBO Conference on Centrosomes and Spindle Pole Bodies (Sep. 14, 2008) EMBL, German
 16. Y. Hiraoka A group of proteins that work for telomere positioning in fission yeast. 2008 FASEB Summer Research Conferences "Yeast Chromosome Structure, Replication & Segregation" (Jun. 23, 2008) Carefree Resort, USA.
 17. Y. Hiraoka Movements of homologous chromosomes in fission yeast meiosis. Gordon research Conferences "Meiosis" (Jun. 11. 2008) Colby-Sawyer College, USA
 18. Y. Hiraoka Distinct Nucleoporins Determine Nuclear Identity in the Binucleated Ciliate Tetrahymena. International Symposium on Chromosome Dynamics in Ise (May 29. 2008) Hotel Kintetsu Aquavilla Ise-Shima, Japan
 19. Y. Chikashige, Y. Hiraoka Cytoskeletal forces span the nuclear envelope to move chromosomes. International Symposium on Chromosome Dynamics in Ise (May 29. 2008) Hotel Kintetsu Aquavilla Ise-Shima, Japan

[図書] (計1件)

1. D.-Q. Ding, and Y. Hiraoka, (2008) Nuclear Movement Enforcing Chromosome Alignment in Fission Yeast—Meiosis Without Homolog Synapsis. *In* Genome Dynamics & Stability (Dirk-Henner Lankenau, ed). Springer. 231-247.

[産業財産権]

○出願状況 (計2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)情報通信研究機構
種類: 特許権
番号: 特願 2009-155028
出願年月日: 2009年6月30日

国内外の別: 国内

2. 名称: Nuf2 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)情報通信研究機構
種類: 特許権
番号: 特願 2008-133885
出願年月日: 2008年5月22日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/hiraoka/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

なし

(3) 連携研究者

浅川 東彦 (ASAKAWA HARUHIKO)

大阪大学・生命機能研究科・助教

研究者番号: 70399533

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

丁 大橋 (DING DA-QIAO)

(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: 50359080