

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20370027

研究課題名 (和文) 光誘導タンパク質機能阻害法による染色体微細構造の顕微解析

研究課題名 (英文) Microscopic analyses of chromosomal structure by functional knockdown using a photosensitizer

研究代表者

松永 幸大 (MATSUNAGA SACHIHIRO)

大阪大学・工学研究科・准教授

研究者番号：40323448

研究成果の概要 (和文)：

染色体微細構造において機能するタンパク質の *in vivo* 機能解析をライブイメージングと光刺激の融合技術を開発した。特定の波長を持つ光を照射することにより活性酸素 ROS を発生する光活性化タンパク質を用いて、微細構造特異的に染色体タンパク質を機能阻害し、その相互作用を時空間的に明らかにした。これにより、光誘導タンパク質機能阻害法を用いて、染色体形成初期の微細構造構築に寄与するタンパク質機能を同定することを示すことができた。

研究成果の概要 (英文)：

The photosensitizer is a fluorescence protein that efficiently generates reactive oxygen species (ROS) in the-expressing cells upon intense green light illumination. The functional knockdown method using the photosensitizer was developed in this project.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2009年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：分子細胞形態学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態構造

キーワード：染色体、細胞分裂

1. 研究開始当初の背景

染色体は細胞内の生命継承構造体であるが、その微細構造の構築メカニズムは未解明である。このメカニズムをタンパク質のレベルから解析するために、まず中期染色体プロテオーム解析により、染色体タンパク質のカタログを作成した (J.Biol.Chem.280, 16994-17004, 2005)。また、そのタンパク質群のモノクローナル抗体を網羅的に作成して、免疫染色法によるタンパク質マッピングを実施して局在解析を推進した。その結果、中期染色体は微細構造特異的なタンパク質

群 (動原体タンパク質、表層タンパク質、周辺部タンパク質、構造タンパク質、繊維状タンパク質、テロメアタンパク質) により構築されることを示し、中期染色体構造モデルを提唱するに至った (Genes to Cells12, 269-284, 2007)。この中から機能未知の染色体タンパク質をリストアップし、RNAi によるノックダウン解析やライブセルイメージングによる動態解析を進め、新規染色体タンパク質の機能を明らかにしてきた。特に、核小体タンパク質であるヌクレオリンやヒストン H1X が染色体動原体構築に関与を証明

(J.Cell Sci.120, 2091-2105, 2007)、染色体 X 字型構造を作るタンパク質 ASURA の発見 (Curr.Biol. 17, 1356-1361, 2007) など、国内外の染色体構造研究をリードしてきた。

このように個々の染色体タンパク質の染色体全体構造における機能は序々に明らかにされつつあるが、染色体の微細構造におけるタンパク質群の *in vivo* 機能の実態は不明である。これは染色体タンパク質の解析が、クロマチン免疫沈降法に代表されるような生化学的解析により *in vitro* 重点的に進められてきたからである。生化学的手法は阻害剤で特定の細胞周期にある材料を調製することで、時間的な相互作用情報は得られるが、空間的な情報を得ることはできない。また、複数の染色体タンパク質抗体を用いた免疫染色法により、染色体微細構造における局在を可視化はできるが、顕微鏡の分解能の問題や固定した細胞を用いるため *in vivo* の機能を反映しない場合もある。さらに、GFP を代表例とする蛍光タンパク質を用いた動態解析では、生細胞を反映した染色体構造全体の動態を明らかにできるが、特定の微細構造を解析することはできなかった。

2. 研究の目的

染色体構造構築に関与する染色体タンパク質群に光活性化タンパク質 (KillerRed) が融合したタンパク質を発現する培養細胞システムを作成する。KillerRed は 540-580nm の緑色光によって活性酸素 (ROS) を発生する。これにより、*in vivo* における融合タンパク質の正確な機能不活性化が可能である (Bulina *et al. Nat.Prot.* 2, 947-953)。同時に、染色体微細構造の指標となるマーカータンパク質を蛍光タンパク質 (GFP) と融合させたタンパク質も共発現させる。この GFP マーカーを指標にタンパク質阻害部位を特定して、KillerRed による染色体微細構造特異的な機能阻害を実施する。特に、染色体の X 字型構造構築に注目して、動原体タンパク質、周辺部タンパク質、構造タンパク質を前期もしくは前中期における染色体の動原体部位特異的に機能阻害して、中期染色体構造への影響をライブセルイメージングで解析する。この動態解析結果を基盤に、各染色体タンパク質との相互作用候補タンパク質の RNAi、免疫染色を実施して、*in vivo* における現象を最も反映する形で染色体構造維持に必須な微細構造の構築メカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

平成 20 年度は培養細胞を用いて KillerRed 標識・染色体タンパク質と GFP 標識・染色体微細構造マーカータンパク質を共発現させた細胞システムを構築する。この細胞システムを用い

て、GFP を標識に微細構造特異的に光照射して、KillerRed による染色体構造特異的なタンパク質機能阻害を実施する。これにより、染色体構造構築における染色体タンパク質の *in vivo* 機能を明らかにする。平成 21 年度以降は、RNAi を組み合わせて染色体タンパク質の機能阻害実験を実施するとともに、時空間特異的な染色体タンパク質ネットワークを明らかにし、染色体構造構築のモデルを微細構造レベルから確立する。

平成 20 年度はヒト子宮頸ガン培養細胞 HeLa を用いて発現株を構築する。本申請課題にある顕微解析を実施するには、形状が明瞭な、比較的大きい染色体持つ細胞を使用することが実験的に有利である。HeLa 細胞の染色体はその有利性を持ち、顕微解析に優れている他、申請者を含めて多くの染色体研究グループが活用している最適な研究材料である。

Gateway システムを用いた発現ベクター構築を進め、KillerRed-染色体タンパク質と GFP-染色体マーカーが共発現する動植物細胞システムを薬剤耐性で選抜して確立する。染色体プロテオーム解析で作成した染色体タンパク質カタログから選抜した動原体タンパク質、周辺部タンパク質、構造タンパク質を解析対象とする。具体的には、申請者らが染色体タンパク質として報告した、ヌクレオリン、ASURA、ヒストン H1X の他、コンデンシン、オーロラキナーゼなどの染色体タンパク質を用いる。解析対象とするタンパク質群はいずれも既に申請者グループで蛍光タンパク質による動態解析を実施している。このため、蛍光タンパク質との融合により生じる実験上のアーティファクトや過剰発現による細胞活性低下の懸念は払拭されている。また、KillerRed の発現も既に、解析対象とする動植物細胞で確認しており、発現細胞株構築における障害はない。

構築した細胞株を申請者が保持するライブセルイメージング顕微システムに本申請で備品として購入する 2 波長励起光源システムを装着し、光誘導によるタンパク質機能阻害を実施する。そこで前期、前中期、中期に相当する染色体を見つけ、GFP-染色体マーカーを指標にして、染色体微細構造領域に存在する KillerRed 融合タンパク質に波長 540-580nm の強い緑色光を照射する。この通常の観察時に用いる緑色光よりも強い緑色光 (を KillerRed 局在部位に照射させることで、KillerRed から ROS が発生して、微細構造特異的なタンパク質機能阻害される。

4. 研究成果

染色体微細構造において機能するタンパク質の *in vivo* 機能解析をライブイメージングと光刺激の融合技術を確立した。特定の波長を持つ光を照射することにより活性酸素

ROS を発生する光活性化タンパク質を用いて、微細構造特異的に染色体タンパク質を機能阻害し、その相互作用を時空間的に明らかにした。染色体動態に重要な役割を果たす RNA 結合タンパク質にキラーレッドタンパク質を融合させて発現させた。光刺激システムを工夫して構築し、細胞周期特異的に RNA 結合タンパク質を阻害させることに成功した。その結果、キラーレッドから放出された ROS が DNA 損傷を引き起こすことがわかり、S/G2 期チェックポイントが活性化され、特異的に S 期の細胞が蓄積することは判明した。これにより、光誘導タンパク質機能阻害法を用いて、染色体形成初期の微細構造構築に寄与するタンパク質機能を同定することができた。この研究成果により、ROS を発生する光活性化タンパク質を用いた光誘導タンパク質機能阻害法を確立すると共に、細胞周期や染色体構築を制御するタンパク質の機能解析に新しい方法を開拓した。特に、今回、機能同定した RNA 結合タンパク質は従来の RNAi 法やノックアウト法では機能を特定することが困難なタンパク質であったが、ライブイメージングと光刺激の融合した本開発技術により、特定することができた。

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 17 件)

1. Adachi, S., Minamisawa, K., Okushima, Y., Inagaki, S., Yoshiyama, K., Kondou, Y., Kaminuma, E., Kawashima, M., Toyoda, T., Matsui, M., Kurihara, D., Matsunaga, S. and Umeda, M. (2011) Programmed induction of endoreduplication by DNA double-strand breaks in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, in press. 査読有
2. Kurihara, D., Matsunaga, S., Omura, T., Higashiyama, T. and Fukui, K. (2011) Identification and characterization of plant Haspin kinase as a histone H3 threonine kinase. *BMC Plant Biol.* **11**, 73. 査読有
3. Noda, M., Uchiyama, S., McKay, A. R., Morimoto, A., Misawa, S., Yoshida, A., Shimahara, H., Takinowaki, H., Nakamura, S., Kobayashi, Y., Matsunaga, S., Ohkubo, T., Robinson, C. V. and Fukui, K. (2011) Assembly states of the nucleosome assembly protein 1 (NAP-1) revealed by sedimentation velocity and non-denaturing mass spectrometry. *Biochem. J.* **436**, 101-112. 査読有
4. Ma, N.*, Matsunaga, S.*, Morimoto, A.*,

Sakashita, G., Urano, T., Uchiyama, S. and Fukui, K. (2011) The nuclear scaffold protein SAF-A is required for kinetochore-microtubule attachment and contributes to the targeting of Aurora-A to mitotic spindles. *J. Cell Sci.* **124**, 394-404. *These authors equally contributed to this work. 査読有

5. Sato, S., Hirakawa, H., Isobe, S., Fukai, E., Watanabe, A., Kato, M., Kawashima, K., Minami, C., Muraki, A., Nakazaki, N., Takahashi, C., Nakayama, S., Kishida, Y., Kohara, M., Yamada, M., Tsuruoka, H., Sasamoto, S., Tabata, S., Aizu, T., Toyoda, A., Shin-I, T., Minakuchi, Y., Kohara, Y., Fujiyama, A., Tsuchimoto, S., Kajiyama, S., Makigano, E., Ohmido, N., Shibagaki, N., Cartagena, J. A., Wada, N., Kohinata, T., Atefeh, A., Yuasa, S., Matsunaga, S. and Fukui, K. (2011) Sequence Analysis of the Genome of an Oil-Bearing Tree, *Jatropha curcas* L. *DNA Res.* **18**, 65-76. 査読有
6. Matsunaga, S. and Fukui, K. (2010) The chromosome peripheral proteins play an active role in chromosome dynamics. *BioMol. Con.* **1**, 157-164. 査読有
7. Nishiyama, R., Ishii, K., Kifune, E., Kazama, Y., Nishihara, K., Matsunaga, S., Shinozaki, K. and Kawano, S. (2010) Sex chromosome evolution revealed by physical mapping of *SIAP3X/Y* in the dioecious plant, *Silene latifolia*. *Cytologia* **75**, 319-325. 査読有
8. Kosetsu, K., Matsunaga, S., Nakagami, H., Colcombet, J., Sasabe, M., Soyano, T., Takahashi, Y., Hirt, H. and Machida, Y. (2010) The MAP kinase MPK4 is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **22**, 3778-3790. 査読有
9. Hayashihara, K., Uchiyama, S., Shimamoto, S., Kobayashi, S., Tomschik, M., Wakamatsu, H., No, D., Sugahara, H., Hori, N., Noda, M., Ohkubo, T., Zlatanova, J., Matsunaga, S. and Fukui, K. (2010) The middle region of an HP1-binding protein, HP1-BP74, associates with linker DNA at the entry/exit site of nucleosomal DNA. *J. Biol. Chem.* **285**, 6498-6507. 査読有
10. Matsunaga, S. (2009) Junk DNA promotes sex chromosome evolution. *Heredity* **102**, 525-526. 査読有
11. Gambe, A.E., Matsunaga, S., Takata, H., Ono-Maniwa, R., Baba, A., Uchiyama, S. and Fukui, K. (2009) A nucleolar protein RRS1 contributes to chromosome congression. *FEBS*

Lett. **583**, 1651-1956. 査読有

12. Watanabe, W., Matsunaga, S., Fukui, K. and Itoh, K. (2009) Intracellular manipulation by nonlinear microscopy. *J. Innov. Opt. Health Sci.* **2**, 1-8. 査読有

13. Amin, M.A., Matsunaga, S., Uchiyama, S. and Fukui, K. (2008) Nucleophosmin is required for chromosome congression, proper mitotic spindle formation, and kinetochore-microtubule attachment in HeLa cells. *FEBS Lett.* **582**, 3839-3844. 査読有

14. Amin, M.A., Matsunaga, S., Uchiyama, S. and Fukui, K. (2008) Depletion of nucleophosmin leads to distortion of nucleolar and nuclear structures in HeLa cells. *Biochem. J.* **415**, 345-351. 査読有

15. Kurihara, D., Matsunaga, S., Uchiyama, S. and Fukui, K. (2008) Live cell imaging reveals plant Aurora kinase has dual roles during mitosis. *Plant Cell Physiol.* **49**, 1256-1291. 査読有

16. Watanabe, W., Matsunaga, S., Higashi, T., Fukui, K. and Itoh, K. (2008) In vivo manipulation of fluorescently-labelled organelles in living cells by multi-photon excitation. *J. Biomed. Opt.* **13**, 31213-31221. 査読有

17. Kazama, Y. and Matsunaga, S. (2008) The use of repetitive DNA in cytogenetic studies of plant sex chromosomes. *Cytogenet. Genet. Res.* **120**, 247-254. 査読有

[学会発表] (計 5 件)

1. 松永幸大、栗原大輔、大村知広、浅田拓也、福井希一、日本植物学会、2010年9月9日、中部大学・春日井

2. Sachihiro Matsunaga Functional analysis of a chromosomal protein responsible for sister chromatid cohesion. 第4回アジア染色体コロキウム国際会議、2010年10月11日、中国・北京

3. 松永幸大、馬楠、森本晃弘、内山進、福井希一核内スキャホールドタンパク質による微小管ダイナミクス制御、第81回日本遺伝学会大会、2009年9月16日、信州大学理学部(長野県松本市)

4. Sachihiro Matsunaga, Hideaki Takata, Akihiro Morimoto, Daisuke Kurihara, Susumu Uchiyama and Kiichi Fukui. 分子生物学会、2009年12月11日、パシフィコ国際会議場(横浜)

5. 松永幸大、染色体動態を制御するタンパク質の解析、日本環境変異原学会、2008年5月31日、青山学院大学青山キャンパス

[図書] (計 5 件)

1. Takata, H., Matsunaga, S. and Maeshima, K. (2011) The organisation of genomic DNA in mitotic chromosomes: a novel view. "Molecular Biology and Evolution of the Plant Genome" edited by Greilhuber, J., Leitch, I., Wendel, J. and Dolezel, J. Springer Verlag (Heidelberg, Germany), in press.

2. Kazama, Y. and Matsunaga, S. (2011) The role of repetitive sequences in plant sex chromosome evolution. "New Insights on Plant Sex Chromosomes" edited by Navajas R. Nova Scientific Publisher (New York, USA) in press.

3. 藤本聡、松永幸大 (2010) 「遺伝情報の格納庫」PhotoBook 植物細胞の世界(西村幹夫監修) 化学同人 p. 18-19.

4. 松永幸大 (2009) 「植物のかたち・核」植物の辞典(岩槻邦男、矢原徹一、和田正三他編集) 朝倉書店 p. 161-162.

5. 黒岩常祥、三角修己、高野博嘉、伊藤竜一、松永幸大 (2008) 細胞(基礎分子生物学シリーズ3) 朝倉書店 全頁数 164 頁

[産業財産権]

○出願状況(計 1 件)

名称: ヤトロファ由来の NF-YB をコードするポリヌクレオチドおよびその利用

発明者: 松永幸大、小日向務、福井希一、田畑哲之

権利者: 大阪大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-90618

出願年月日: 2010年4月9日

国内外の別: 国内

○取得状況(計 1 件)

名称: Evaluating cells, comprises acquiring images reflecting state of chromosome in cells, calculating parameter

発明者: Matsunaga, S., Uchiyama, S. and Fukui, K.

権利者: 大阪大学

種類: 特許

番号: 第 4521572 号

取得年月日: 2010年6月4日

国内外の別: 国外

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松永 幸大 (MATSUNAGA SACHIHIRO)

大阪大学・工学研究科・准教授

研究者番号：40323448