

## 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 24 年 6 月 12 日現在

機関番号：82636

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570212

研究課題名（和文）

分裂酵母における染色体セントロメア領域のSPBとの相互作用の分子機構の解明

研究課題名（英文）

Molecular mechanism of centromere clustering at SPB in the fission yeast

研究代表者

前川 裕美 (MAEKAWA HIROMI)

独立行政法人情報通信研究機構・未来 ICT 研究所バイオ ICT 研究室・専攻研究員

研究者番号：80399683

研究成果の概要（和文）：SPB 蛋白質 Sad1 は、減数分裂サイクルから増殖への回帰時に見られるセントロメア - SPB 間相互作用の再確立におけるキネトコア蛋白質の集積に重要な役割を果たすことが明らかになった。また、進化的に保存された核内膜蛋白質 Ima1 は、これまでの報告とは異なり、セントロメア - SPB 間の相互作用への関与は見られなかった。しかし、Ima1 蛋白質を欠失させると核膜の形態に著しい異常が見られることから、核膜構造の維持に重要な働きをしていることが明らかになった。また、Ima1 蛋白質は細胞周期進行の制御にも関わることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that N-terminal domain of Sad1, an SPB component in *S. pombe*, is required for efficient re-accumulation of kinetochore components when cells return to mitotic cycle from meiotic cycle and thereby facilitate re-establishment of the centromere clustering at SPB. We also showed that inner nuclear membrane protein Ima1 has no apparent role in the centromere-SPB interaction, but instead is required for the formation and maintenance of nuclear membrane structure and the cell cycle progression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2700000	810000	3510000
2010 年度	600000	180000	780000
2011 年度	600000	180000	780000
年度			
年度			
総計	3900000	1170000	5070000

研究分野：細胞生物

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：①遺伝子 ②シグナル伝達 ③発現制御 ④蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 多くの真核細胞種と同様に、分裂酵母においても 3 本の染色体のセントロメアは細胞増殖中の間期には集合体を形成し SPB 近

傍に位置しているが、その意義は良くわかっていなかった。

(2) セントロメアの SPB 近傍での集合には、セントロメア上に形成される微小管結合構造であるキネトコアの構成タンパク質 Ndc80 複合体が必須であることが報告されていた。また、Ndc80 依存的機構に加えて、セントロメアが SPB 近傍での核膜を補強するという機構が提案され、核内膜タンパク質 Ima1 がこの機構の構成因子として報告されていた (King MC, Drivas TG, Blobel G, 2008)。しかし、それぞれの機構の核となるタンパク質間相互作用の実体は不明であった。

## 2. 研究の目的

(1) 細胞増殖期にみられる染色体上のセントロメア領域の中心体相同器官 (SPB) 近傍への集合が細胞分裂の制御に果たす役割を明らかにする為に、セントロメア-SPB 間の相互作用を担う機構の分子実体を解明する。

(2) Ndc80 依存的機構と核内膜タンパク質 Ima1 に依存した機構が細胞周期でどのように制御されているか、またその細胞増殖制御における意義について明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 所属研究室の未発表データから、Ndc80 複合体中の Spc24 タンパク質と SPB 構成タンパク質 Sad1 が直接結合する可能性が考えられたことから、Sad1 蛋白質に注目した。Sad1 蛋白質の Spc24 蛋白質結合部位と考えられる領域を欠失させた *sad1* 変異株を構築し、SPB とセントロメアの挙動を観察することにより、セントロメア-SPB 間の相互作用を検討する。

(2) Ndc80 複合体非依存的機構に関与する因子を単離することを目指し、Ndc80 依存的機構に欠損があると予想される上記の *sad1* 部分欠失変異との二重変異により増殖が悪くなる変異株のスクリーニングを行う。

## 4. 研究成果

(1) N 末端の一部を欠失した *sad1-D100* 部分欠失変異株を作成した。この *sad1-D100* 変異株中での増殖サイクル中の SPB とセントロメアの位置を観察したところ、野生型との違いは認められなかった。しかしながら、減数分裂サイクルから増殖への回帰時 (図 1 参

照) に見られるセントロメア-SPB 間相互作用の再確立に欠損があることが分かった。この時、キネトコア蛋白質群のセントロメアへの再蓄積が遅延することが分かった (図 2)。このことから Sad1 蛋白質の N 末端領域はキネトコア蛋白質が正しい時期にセントロメア領域に集積するために重要な役割を果たしていることが明らかになった。

図 1 分裂酵母における減数分裂サイクルから増殖への回帰

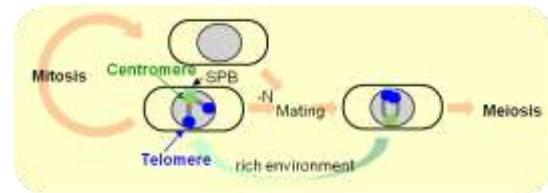
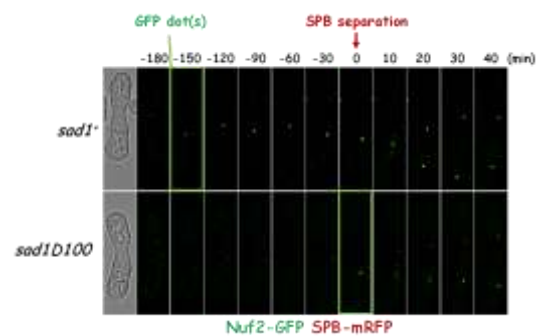
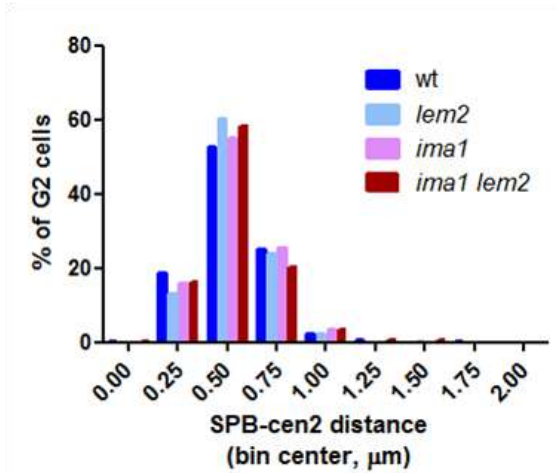


図 2 野生型株および *sad1-D100* 変異株中での増殖回帰におけるキネトコア蛋白質 Nuf2 の再蓄積



(2) セントロメア-SPB間の相互作用を介した核膜構造の維持を担う因子として報告された Ima1 蛋白質について、染色体との相互作用の分子機構を明らかにするために、研究代表者が研究に用いている株と遺伝的背景を同じくする *ima1* 破壊株を構築した。得られた *ima1* 破壊株を解析した結果、報告された実験結果とは異なり、セントロメア-SPB間の相互作用に著しい欠損は見られないことが分かった (図 3)。しかし、Ima1 蛋白質は SPB/核膜に局在する保存された核内膜蛋白質であり、核膜・SPB 機能に重要な因子であると考えられることから、Ima1 蛋白質の細胞増殖制御における機能を詳細に検討する必要性が認められた。

図3 SPB とセントロメア間の距離



(3) Ima1 蛋白質を欠失した株は野生型株と同様の栄養増殖速度を示したが、別の保存された核内膜蛋白質である Lem2 を同時に欠失した *ima1Δ lem2Δ* 二重破壊株は著しい増殖遅延が見られた。この時、核の形に異常がみられることが分かった。そこで、*ima1Δ lem2Δ* 二重破壊株の核膜の形態の電子顕微鏡観察を行った。その結果、野生型では均一な二重の膜構造であるのに対して *ima1Δ lem2Δ* 二重破壊株では核内膜が分枝した細胞や核内に異常な膜構造を持つ細胞が観察された (図2 および図3)。この表現型は *ima1Δ* 単独破壊株中でも低頻度ながら認められたことから、Ima1 蛋白質は正常な核膜構造の形成または維持に重要な役割を果たすことが示唆された。

図2 *ima1* 破壊株で見られる核膜の分枝

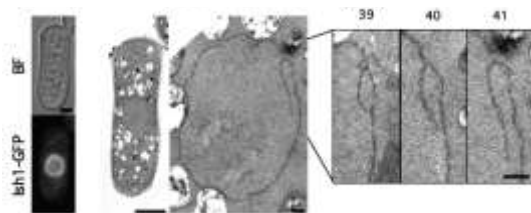
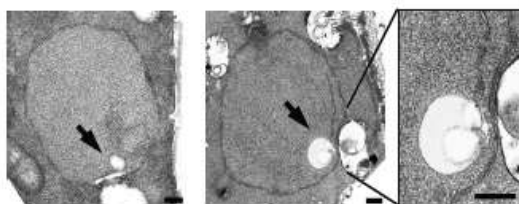
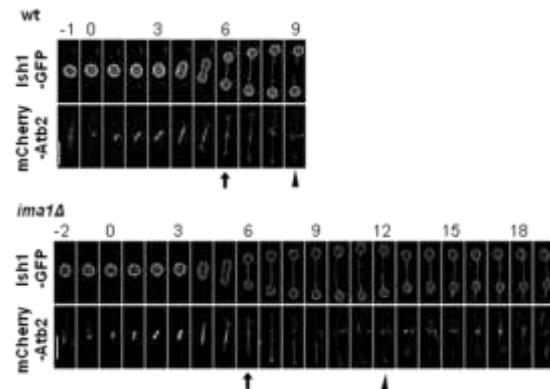


図3 *ima1* 破壊株で見られる核内膜構造



(4) *ima1* 破壊株における細胞分裂過程での核膜、SPB およびスピンドル微小管の挙動を観察した結果、M 期からの離脱が遅延することが分かった。また、低頻度ながら娘細胞核分離における核膜の分断の遅延が見られ (図4)、Ima1 蛋白質は核膜構造の維持と細胞周期進行の制御に関わる因子であることが明らかになった。

図4 野生型株および *ima1* 破壊株における分裂期の進行



(5) Ima1 蛋白質は細胞分裂期と同様に、減数第一及び第二分裂初期に SPB に集積することが分かった。そこで、Ima1 蛋白質が減数分裂期におけるセントロメア-SPB 間相互作用に関与するかを検討するために、*ima1* 変異株における減数分裂過程での染色体分配とセントロメアの核内配置を生細胞中で観察した。その結果、染色体分配とセントロメアの核内配置に顕著な異常は見られなかった。しかし、*ima1* 変異株ではスピンドル形成に伴って SPB のハーフブリッジの分断が野生型よりも高い頻度で観察された。このことから、Ima1 蛋白質は減数分裂期における SPB 構造の維持に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

## 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1件)

平岡泰、前川裕美、浅川東彦、近重裕次、糀谷知子、小坂田裕子、松田厚志、原口徳子  
 Inner nuclear membrane protein Ima1 is dispensable for intranuclear positioning of centromeres. Genes Cells.

(2011)16:1000-11.  
DOI: [10.1111/j.1365-2443.2011.01544.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2011.01544.x).

〔学会発表〕（計 4 件）

①前川 裕美 「Inner nuclear membrane proteins in the fission yeast」  
International Symposium Physicochemical Field for Genetic Activities  
2011年1月24日 淡路夢舞台国際会議場、兵庫県淡路市

②平岡 泰「Inner nuclear membrane proteins required for positioning chromosomes in the nucleus」  
第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会  
2010年12月9日 神戸ポートアイランド、神戸市

③前川 裕美 「分裂酵母の核内膜蛋白質の核構造維持における役割」  
酵母遺伝学フォーラム第43回研究報告会  
2010年9月9日 ならまちセンター、奈良市

④前川 裕美 「The inner nuclear membrane proteins influence nuclear envelope structure in the fission yeast」  
日本細胞生物学会第62回大会  
2010年5月21日 大阪国際会議場、大阪市

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

前川 裕美 (MAEKAWA HIROMI)

独立行政法人情報通信研究機構・未来 ICT  
研究所バイオ ICT 研究室・専攻研究員

研究者番号：80399683

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：