

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 12 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770192

研究課題名(和文)新規モデル生物を用いた核膜動態の研究

研究課題名(英文)Analyses of nuclear envelope dynamics using a novel model fission yeast

研究代表者

青木 敬太(AOKI, KEITA)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助教

研究者番号：20620884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝情報であるDNAの継承には、DNAを包む膜(核膜)も正常に継承される必要がある。我々ヒトなどの高等真核細胞の核膜は、継承時に崩壊と再形成が伴うが(開放型)、下等な酵母などの核膜は、崩壊せずに伸縮により継承される(閉鎖型)。この違いの生理的意義や機構は未解明だった。

研究には、半開放型の膜継承が起こる*S. japonicus*分裂酵母を用いた。人為的にDNAに傷を入れ、核膜の継承に関わる遺伝子を探索したところ、タンパク質分解に働くAPC/Cyclosome複合体と膜成分を作る脂肪酸合成酵素が関わる事を見つけた。DNAの継承には、タンパク質分解を介した核膜量の制御が必要だというモデルを提案した。

研究成果の概要(英文)：For the inheritance of genetical information, a nuclear membrane, surrounding DNA, has to be inherited to daughter cells correctly. Higher eukariotic cells like human have 'open' mitosis system accompanying breakdown and regeneration of nuclear membrane. On the other hand, lower eukariotic cells like yeasts have 'closed' mitosis system accompanying shrinkage of nuclear membrane. The significance and mechanism of the difference has not been understood so far.

For our study, a fission yeast *S. japonicus*, which has 'semi-open' mitosis, was used. Searching genes relating to inheritance of nuclear membrane by genetical screening, it was found that APC/Cyclosome and fatty acid synthase function for the inheritance of nuclear membrane. Because APC/Cyclosome is a key factor in the protein degradation pathway, and fatty acids are important for constructing membrane, we proposed a model that regulation of level of nuclear membrane via protein degradation is necessary for the inheritance of DNA.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：核膜動態 核膜崩壊 分裂期制御 細胞周期 *S. japonicus*

1. 研究開始当初の背景

(1) 染色体の分離機構に関わるシス・トランス因子は広く研究されていたが、核膜を含む脂質二重膜の分離もしくは動態を制御するメカニズムの研究は進んでいなかった。

(2) ヒトなどの高等真核細胞では、核膜の崩壊と再形成を伴う開放型の核分裂が起こるが、酵母などの下等真核細胞では、一般的に核膜の崩壊は起こらず、閉鎖型の核分裂が進行する事がわかっていた。また、申請者らは、分裂酵母の一種である *Schizosaccharomyces japonicus* (*S. japonicus*) において、核膜の一部が崩壊する半開放型の核分裂が起こる事を報告していた。

2. 研究の目的

(1) 高等真核細胞の核膜崩壊では、分裂期前期に、核膜孔複合体の核膜からの消失が起こり、その後、核膜が断片化し、崩壊する事がわかっていた。*S. japonicus* を用いた以前の研究から、半開放型核分裂でも核膜孔複合体の崩壊面からの消失は観察されていたので、*S. japonicus* を用いた核膜動態の研究は、高等真核細胞の良いモデルになると考えられた。そこで、申請者は、*S. japonicus* で核膜崩壊の起こらない変異株を遺伝学的に同定し解析する事により、ヒトの核膜崩壊の機構や意義を理解するための端緒をつかむことを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 1015 株の温度感受性変異株の作製は、野生型の細胞に、変異源である EMS (Ethyl methane Sulfate) を添加することで行った。*apc2* 変異株のサプレッサーは、*apc2* 変異株を準制限温度(37 °C)の寒天培地上で培養し、生えたコロニーのうち、20 の寒天培地上で生育遅延を示すコロニーとして単離した。

(2) *apc2*、*cut23*、*nuc2* 変異株の原因遺伝子の同定は、他酵母を用いた過去の文献を参考にして選んだ分裂期に働く 50 個のタンパク質について、遺伝子をクローニングし、相補能検定により行った。サプレッサー変異の同定には、次世代シーケンサー (Illumina) を用いた。この解析は、東京農業大学の吉川研究室で行われた。

(3) 変異残基の特定は、当該遺伝子のシーケンシングにより決定した。変異遺伝子が温度感受性の原因遺伝子かどうかは、候補の変異遺伝子の近傍に薬剤マーカーを挿入した株と温度感受性変異株とをかけ合わせ、遺伝学的距離を測定する事により決定した。遺伝学的距離は、メンデル遺伝に則り算出した。遺伝学的距離 = $100(TT+6NPD)/2(PD+NPD+TT)$ 。

(4) タンパク質の細胞からの抽出は、以下のように TCA (Trichloroacetic acid) を用いて行った。対数増殖期にある細胞液に終濃度 20% の TCA を加えて懸濁し、上清を除いた。次に細胞ペレットを 50 μ l の 10% TCA で懸濁し、

そこに Zirconia ball を液面まで加え、ボルテックスにより細胞を潰した。次に遠心により上清をすべて除き、ペレットに SDS バッファを 50 μ l 加えて懸濁し、100 °C で 5 分間煮沸した。その後、遠心により上清をペレットと分け、サンプルとした。ウェスタンブロットのための電気泳動は、15% アクリルアミドゲルで行った。抗体は Flag M2 抗体 (Sigma、500 倍希釈)、チューブリン抗体 (Sigma、5 万倍希釈)、H3 Ser リン酸化抗体 (Abcam、500 倍希釈) を使った。

(5) 顕微鏡観察には、DeltaVision システムを用いた。経時観察には、ガラスボトムディッシュを用いた。間接蛍光法は、Funabiki et al., 1993 に従った。細胞壁の溶解には、1mg/ml の Zymolyase 100T を用いた。1 次抗体にはチューブリン抗体 (Sigma) を 50 倍希釈で用いた。マウス 2 次抗体には Alexa Flour 594 を 500 倍希釈で用いた。

4. 研究成果

(1) 注目している核膜崩壊現象が、*S. japonicus* では分裂期中期から後期にかけて起こる事が報告されていた。そこで、分裂期中期から後期に欠損を示すような細胞を得るために、1015 株の温度感受性変異株について染色体を DAPI で染め、分裂期中期から後期の核分裂が遅延する変異株の単離を試みた。その結果、5 株 (ts361, ts362, ts397, ts415, ts1051) を単離した。遺伝解析の結果、ts361、ts362、ts397 の 3 株はアレルである事がわかった。ts361、ts415、ts1051 の 3 株について、野生型と 3 回かけ合わせて純化し、以後の実験に用いた。この 3 株はいずれも温度感受性を示し、野生型で見られる核膜崩壊が減退した (図 1)。矢印は野生型の核膜を、矢頭は変異株内で閉鎖型核分裂になった核膜を示した (図 1)。また、ts361 株では、分裂期中期から後期にかけて、染色体が野生型に比べて縮退していた (図 1)。さらに、ts361、ts415、ts1051 の 3 株では、核膜孔複合体因子である Cut11-GFP の核膜中央付近からの消失が見られなかった (図 1)。よって、*S. japonicus* の半開放型核分裂に異常のある変異株を単離できたと結論した。

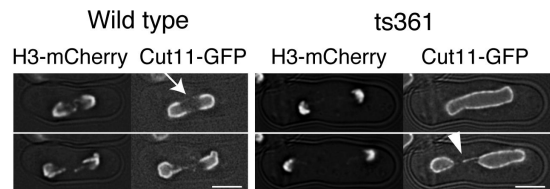


図 1 変異株での核膜動態の異常

(2) 変異株の原因遺伝子を特定したところ、ts361、ts415、ts1051 の 3 株はそれぞれ、E3 ユビキチンリガーゼである APC/サイクロソーム (APC/C) のサブユニットである *Apc2*、*Cut23*、*Nuc2* の変異株であった。変異株と野

生型を制限温度下で培養したところ、変異株では、分裂期中期から後期の細胞の蓄積と、それとともに生存率の低下が観察された。分裂期遅延をさらに確認するために、分裂期微小管の長さを測定した。その結果、分裂期微小管の長さは野生型に比べ変異株で長く、且つ、分裂期微小管を持つ細胞の割合も変異株の方が高かった。これらの結果から、APC/Cが分裂期後期において、核膜崩壊に関わると予想された。一方、分裂期中期の欠損は、他の真核細胞で見られるように、サイクリンやセキュリンの分解不全によると考えられた。APC/C 変異株の核膜が膨張する際に、分裂期微小管は十分に伸長していたことから、核膜の動態は、分裂期微小管とは別の経路で制御される事が示唆された。

(3) 変異株における核膜動態の異常が、染色体の分離異常に起因する可能性を検証するために、変異株の動原体の挙動を観察した。動原体タンパク質である Mis6-GFP の局在を観察したところ、核膜動態に欠損を示す *apc2* 変異株の細胞内でも、Mis6-GFP は娘細胞に均等に分配されていた。一方、核膜動態に欠損を示す *apc2* 変異株の細胞内では、核小体の分離が明らかに不均等であった。よって、核膜崩壊と染色体分離のメカニズムは独立すると考えられた。

(4) APC/C 変異株における核膜動態異常の表現型をより理解する目的で、*apc2* 変異株のサプレッサーを取得した。サプレッサーは7個単離された。次世代シーケンサーを用いて変異遺伝子を決定した。7個の変異遺伝子のうち、*oar2-51* 変異のみが、*apc2* 変異株の分裂期後期の欠損を特異的に抑圧した。*Oar2* は、脂肪酸合成酵素の活性をもつ235アミノ酸からなるタンパク質で、2つの Destruction box 配列を持っていた。また、*Oar2-51* は Y189D の変異を持っていた。*oar2* 遺伝子をベクターにクローニングし、*oar2-51* 変異株に導入したところ、*oar2-51* の低温感受性は抑圧された。また、*Oar2* の欠失変異株は、*Oar2-51* と同様に *apc2* 変異株の温度感受性を抑圧でき、且つ、低温感受性を示した。*Oar2* と同じ経路で働くと考えられる *Cem1* の欠失変異株も同様の効果を示した。これらの結果から、APC/C 変異株における核膜動態異常は、脂肪酸合成酵素経路に依存すると考えられた。

(5) *Oar2* は、Destruction box を持つため、APC/C-プロテアソームの経路で分解される可能性が考えられた。*Oar2-3Flag* のタンパク質量を野生型と APC/C 変異株とで比較したところ、*Oar2-3Flag* の量は、APC/C 変異株内で2倍程度増量していた。さらに確認するために、Destruction box の変異株を作製した。両方の Destruction box に変異を入れた *oar2-dm12* は、*oar2* 遺伝子欠失変異株と同様に低温感受性を示し、且つ、*apc2* 変異株の温度感受性を抑圧した(図2A)。さらに、*Oar2-dm12-3Flag* と *Oar2-51-3Flag* を作製し、タンパク質量を調べたところ、野生型に比べ

て、明らかにタンパク質量が増量した(図2B)。サイクリンやセキュリンは、Destruction box を介して E3 ユビキチンリガーゼである APC/C に認識され、その後プロテアソームによって分解される事から、*Oar2* も分裂期に APC/C 経路において、分解されると考えられた。

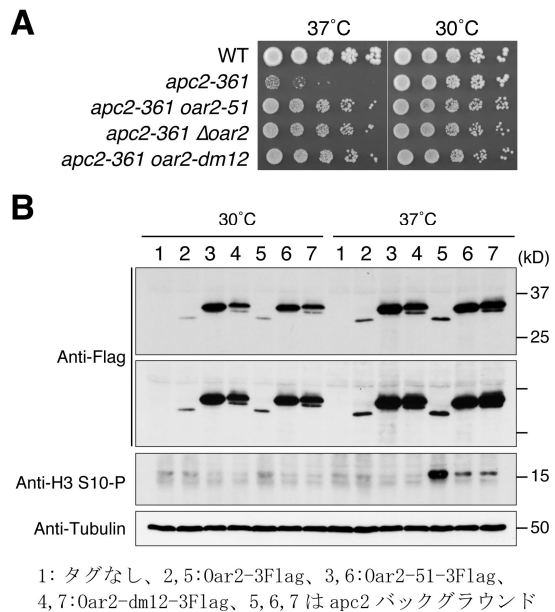


図2 変異型 *Oar2* の相補能とタンパク質量

(6) *oar2* 変異が *apc2* 変異株の温度感受性を抑圧する際に、細胞生物学的に何が起きているかを確認する目的で、核膜と染色体を顕微鏡下で詳細に観察した。Cut11-GFP を核膜マーカーとして用いた事でスピンドル極体を可視化できた。スピンドル極体間距離を測定する事により、各変異株の分裂期進行速度を測定し比較した(図3)。その結果、*apc2 oar2* の二重変異株では、分裂期中期の遅延は *apc2* 変異株の場合と変わらないが、分裂期後期の遅延が回復していた(図3)。また、このとき、

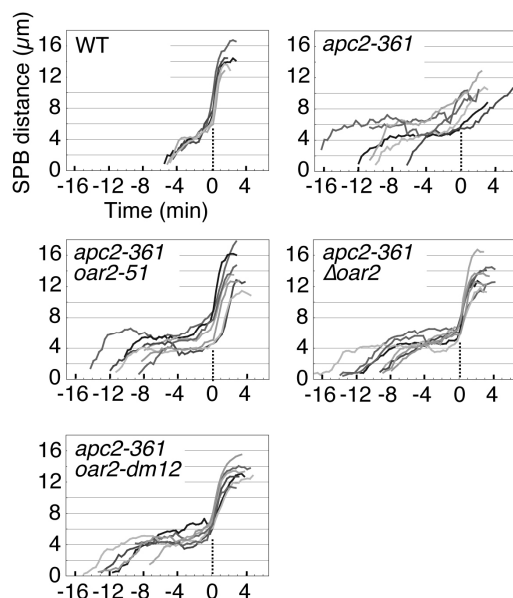


図3 スピンドル極体間距離の測定

半開放型の核分裂が回復した。これらの観察から、*S. japonicus*の核膜では、Oar2の活性に依存した核膜の増加があると考えられた。分裂期ではAPC/C依存的にOar2が分解され核膜の増加が起これないために、核膜が崩壊すると考えられた。APC/C変異株では、分裂期でもOar2活性が持続されるために、核膜の増加が止まらず、核膜が膨張すると考えられた。以上のモデルは、真核細胞で起こる核膜崩壊現象を説明するメカニズムの一端になるのではないかと期待された。以上の結果は、Aoki et al., 2013で報告した。

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)

青木 敬太、志波 優、高田 啓、吉川博文、仁木 宏典、Regulation of nuclear envelope dynamics via APC/C is necessary for the progression of semi-open mitosis in *Schizosaccharomyces japonicus*., *Genes to Cells*, 査読有、18巻、2013、733-752

[学会発表](計 9件)

青木 敬太、志波 優、高田 啓、吉川博文、仁木 宏典、Oar2を介した核膜動態の制御は、Anaphaseの進行に重要である、第45回酵母遺伝学フォーラム研究報告会、京大宇治キャンパス、2012年9月4日-6日

青木 敬太、志波 優、高田 啓、吉川博文、仁木 宏典、Regulation of nuclear envelope dynamics via Oar2 is necessary for the progression of anaphase、DYNAMIC ORGANIZATION OF NUCLEAR FUNCTION、Cold Spring Harbor Laboratory、2012年9月27日-10月1日

青木 敬太、志波 優、高田 啓、吉川博文、仁木 宏典、Limitation of nuclear envelope dynamics via APC/C is necessary for the progression of semi-open mitosis in *Sz. japonicus*、The 8th 3R Symposium、淡路夢舞台、2012年11月25日-28日

青木 敬太、志波 優、高田 啓、吉川博文、仁木 宏典、Regulation for breakage of nuclear envelope via Oar2 is necessary for the progression of anaphase in *Sz. japonicus*、第35回日本分子生物学会年会、福岡、マリンメッセ福岡、福岡国際会議場、2012年12月11日-14日

青木 敬太、志波 優、高田 啓、吉川博文、仁木 宏典、Semi-open mitosisの進行に必須な核膜動態制御の解析、第30回染色体ワークショップ、第11回核

ダイナミクス研究会、淡路夢舞台、2012年12月19日-21日

青木 敬太、志波 優、高田 啓、吉川博文、仁木 宏典、Regulation of nuclear envelope dynamics via APC/C is necessary for the progression of semi-open mitosis in *Schizosaccharomyces japonicus*、The 7th International Fission Yeast Meeting、UCL、London、2013年6月24日-29日

青木 敬太、志波 優、高田 啓、吉川博文、仁木 宏典、染色体と核膜構造の維持に必要な因子の解析、第46回酵母遺伝学フォーラム研究報告会、東北学院大学土樋キャンパス 押川記念ホール、2013年9月8日-10日

青木 敬太、志波 優、高田 啓、吉川博文、仁木 宏典、脂肪酸合成とRan経路は、染色体と核膜の構造維持に関わる、第31回染色体ワークショップ、第12回核ダイナミクス研究会、ホテルおかだ箱根湯本、2013年11月25日-27日

青木 敬太、志波 優、高田 啓、吉川博文、仁木 宏典、脂肪酸合成とRan経路は、染色体と核膜の構造維持に関わる、第36回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、2013年12月3日-6日

[その他]

ホームページ等

(1) タイトル：ジャポニカス酵母菌を材料とした染色体分配の研究

http://www.nig.ac.jp/labs/MicroGen/res_act/ourresearch/kobetsu.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青木 敬太 (AOKI, Keita)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助教

研究者番号：20620884