

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650007

研究課題名(和文)核内アクチン繊維形成のメカニズムと機能

研究課題名(英文)Functions of nuclear actin filament and its mechanism of the formation

研究代表者

篠原 彰 (Shinohara, Akira)

大阪大学・たんぱく質研究所・教授

研究者番号：00252578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は減数分裂期の染色体運動を制御する細胞骨格と核膜に存在するタンパク質複合体の核膜局在の仕組みを明らかにすることを目的とした。電子顕微鏡解析の結果、細胞質に加えて、核内でアクチン繊維が減数分裂期特異的に観察できた。この結果は、細胞質のみならず核内のアクチン繊維が染色体運動に関わる可能性を提示している。染色体運動の鍵タンパク質であるMps3タンパク質の動態を解析した所、このタンパク質がリン酸化を受けること、Mps3のリン酸化部位の部位に変異を導入すると、Mps3の核膜局在が大きく低下した。減数分裂期特異的リン酸化により、その局在が制御されていることを明らかにできた。

研究成果の概要(英文)：During meiosis, telomeres are attached to the nuclear envelope (NE) and move to the vicinity of the centrosome. The movement of telomeres, thus chromosomes, is driven by forces, which is transmitted through NE from cytoplasmic cytoskeletons. Dynamic repositioning of telomeres is a unique feature of meiotic prophase I. Telomere clustering is thought to promote recognition, meiotic recombination, and stable pairing between the homologous chromosomes. However, the molecular basis of telomere attachment and movement as well as its regulation is largely unknown. Previous works suggest that the nuclear envelope (NE) plays a critical role in telomere attachment/movement during meiotic prophase I. We found that telomere clustering and movement depend on two cell cycle kinases, cyclin-dependent kinase (CDK) and Dbf4-dependent Cdc7 kinase (DDK). Particularly, the impairment of the two kinases during meiosis affects the localization and movement of a component of the SPB of *S. cerevisiae*, Mps3.

研究分野：分子生物学

キーワード：減数分裂 染色体 核膜 細胞骨格

### 1. 研究開始当初の背景

精子、卵子と言った一倍体配偶子形成に必要な減数分裂では、染色体動態を劇的に変化させることで、染色体分配を促進し、配偶子内の染色体数の維持に関わっている。特に減数分裂期の核では染色体末端のテロメアが核膜に結合し、一過的に中心体直下の核膜付近に集合する、テロメア集合反応(ブーケ形成)が知られている。この集合反応に加え、核内で染色体を運動させることで、相同染色体の認識と対合を促進する。このような減数分裂期のテロメア集合、染色体運動には、核膜に存在するタンパク質複合体が核質側でテロメアを、細胞質側で細胞骨格(微小管やアクチン繊維)と結合することで、細胞骨格に夜駆動力を用いて、核内の染色体を動かすことが知られている。出芽酵母では核膜タンパク質 Mps3 タンパク質が中心体様構造体(SPB, Spindle Pole Body)から核膜へ局在を変え、核質側ではテロメアを、細胞質側ではアクチン繊維と結合することで、運動の原動力を作り出すことが知られている。細胞骨格の1つであるアクチン繊維は細胞の形態、運動に関わっていて、通常、アクチン繊維は細胞質に存在し機能することが知られている。

### 2. 研究の目的

本研究は減数分裂期の酵母細胞内でアクチン繊維形成のメカニズムを解明すること、アクチンと相互作用し、染色体運動の駆動力を生み出す核膜タンパク質 Mps3 の核膜の局在を促す仕組みを解明することを目的とする。また、本研究から、核内アクチン繊維による核膜のリモデリングを介した染色体の物理的環境変化が、減数分裂期のDNA交換反応を制御する分子機構が明らかにできることが期待している。特に、減数分裂期で起きる染色体の再配置の中で、染色体の核膜との結合、小胞体、さらには細胞骨格を介した染色体運動と組換えの連関を明らかにすることは、染色体上で起きるDNAの生化学反応が“動かす”という物理的な力によって制御を受けていると言う新しい概念の基盤を作り出すことを目標にする。

### 3. 研究の方法

これまでの研究で、アクチン繊維が減数分裂期の染色体運動や相同染色体のペアリングに必要であることが示されている。一方、減数分裂期細胞内でのアクチン繊維などの構造を解析するために、凍結した出芽酵母の減数分裂期細胞の切片を作成し、電子顕微鏡で詳細な減数分裂期の細胞、核に関しての微細構造の解析を行った。特に、アクチン繊維の局在、その継時変化を定量的に

捉える解析を行った。この研究は電子顕微鏡解析の専門家である総合画像支援機構の大隅正子博士との共同研究とした。

一方、アクチン繊維形成とは独立して、減数分裂期特異的に核膜に局在する Mps3 タンパク質の核膜局在機構を知るために、このタンパク質と翻訳後修飾と相互作用する因子の同定を行った。

### 4. 研究成果

凍結した酵母細胞の電子顕微鏡解析の結果、細胞質に加えて、核内でアクチン繊維が減数分裂期特異的に観察できた。計時変化を解析したところ、減数分裂期特異的組換えや染色体追合が起きている時期やそれ以上の減数第1分裂期に核内での繊維様構造体が確認できた(未発表)。アクチン繊維形成阻害剤である Latrunculin A 処理で細胞を処理すると、その繊維構造は消失すること、アクチン抗体を用いた免疫電子顕微鏡解析からもアクチン繊維であることを確認できた。これらの結果は、細胞質のみならず核内のアクチン繊維が存在することを強く示している。つまり、この核内繊維も染色体運動などに関わる可能性を提示している。核内のアクチン繊維は細胞質の繊維構造と形の上では大差がない。核内での繊維の再構築によるモデルを作成したところ、繊維の末端が核膜まで到達していることが分かり、核膜にアクチン繊維形成の鍵分子があると考えている。現在は生きている細胞に LifeACT(アクチン繊維を標識する蛍光マーカータンパク質)に核移行シグナルを蒸した融合遺伝子を導入して、減数分裂期でのアクチン繊維の核内で動態を解析することと、核内特異的にアクチン繊維形成を阻害する系を開発することで、その機能を明らかにすることを目指している。

染色体運動の鍵タンパク質である Mps3 タンパク質の減数分裂期特異的、核膜局在の仕組みを明らかにするために、Mps3 タンパク質の動態、並びに状態を解析した所、このタンパク質が減数分裂期に強く翻訳後修飾を受けること、それがリン酸化であることを明らかにできた。また、この Mps3 のリン酸化には2つのリン酸化酵素、CDK(Cyclin-dependent protein kinase)と DDK(Dbpf4-dependent Cdc7 kinase)が必要であることを見出した。さらに、Mps3 上のリン酸化部位として、核膜内膜、外膜の間にあるルーメン領域に存在するアミノ酸残基を同定できた。この部位に変異を導入すると、Mps3 タンパク質の減数分裂期の核膜局在が大きく低下することが分かった。減数分裂期特異的リン酸化により、その局在が制御されていることを明らかにできた。一方で、2つのリン酸化酵素は体細胞分裂期でも存在しており、Mps3 の核膜局在(やリン酸化)の減数分裂期特異性を説明することができないため、

その局在を制御する減数分裂期因子を探していた所、染色体構成要素であるコヒーシ  
ンが候補として同定できた(未発表)。実際、  
コヒーシと Mps3 の結合が免疫沈降により  
確認できた。今後は、コヒーシがどの  
ような仕組みで Mps3 タンパク質の核膜局  
在を制御するのかを、Mps3 やコヒーシの  
様々な変異を用いることで解析している。

#### 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 11 件)

1. Bani Ismail, M., Shinohara M. and A. Shinohara. Dot1-dependent histone H3K79 methylation promotes the formation of meiotic double-strand breaks in the absence of histone H3K4 methylation in budding yeast. **PLoS One**, 9, e96648. 2014 DOI: 10.1371/journal.pone.0096648
2. Terasawa, M., Shinohara A., and M. Shinohara. Canonical Non-homologous End Joining in Mitosis Induces Genome Instability and Is Suppressed by M-phase Specific Phosphorylation of XRCC4 via CDKs. **PLoS Genetics**, 10, e1004563, 2014. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004563.
3. Terasawa, M., Shinohara. A., and \*M. Shinohara. Double-strand break repair-adox: restoration of suppressed double-strand break repair during mitosis induces genomic instability. **Cancer Science**, 105(12):1519-25, DOI: 10.1111/cas.12551.
4. Shinohara M. and A. Shinohara. Multiple Pathways Suppress Non-Allelic Homologous Recombination during Meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One**, 4, e63144, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0063144.
5. Sasanuma, H. Tawramoto, M.S., Lao, J., Hosaka, H., Sanda, E., Suzuki, M., Yamashita, E., Hunter, N., Shinohara M. Nakagawa, A. and A. Shinohara. A new protein complex promoting the assembly of Rad51 filaments. **Nature Comms**, 4, 1676, 2013, doi: 10.1038/ncomms2678.CI=8
6. Sasanuma, H. Furihata Y., Shinohara M. and A. Shinohara. *Saccharomyces cerevisiae* Srs2 helicase disassembles Rad51 from meiotic chromosomes. **Genetics**, 194, 859-872, 2013. DOI: 10.1534/genetics.113.150615.
7. Shinohara, M, Hayashihara, K., Grubb, J.T., Bishop, D.K., and A. Shinohara. DNA damage response clamp contributes to chromosomal assembly of ZMM-SIC pro-crossover factors during meiosis. **J. Cell. Sci.** 128(8):1494-506. DOI: 10.1242/jcs.161554
8. Atsumi, Y., Minakawa, Y., Ono, M., Dobashi, S., Snohe, K., Shinohara, A., Takeda, S., Takagi, M., Takamatsu, N., Nakagama, H., Teraoka, H., and K.-I. Yoshioka. ATM and SIRT6/SNF2H mediate transient H2AX stabilization when DSBs form by blocking HUWE1 to allow efficient  $\gamma$ H2AX foci formation. **Cell Report**, 13, 2728-2740. 2015. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.11.054..
9. Santosh, G. K., Patel, K.J., Colletti M.M., Sasanuma, H., Shinohara, M., Hochwagen, A., and A. Shinohara. The Paf1 Complex Shapes the Landscape of Double-strand Breaks along Meiotic Chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, 202, 497-512, 2016. DOI: 10.1534/genetics.115.177287
10. Subramanian, V.V., MacQueen, A. J., Vader, G., Shinohara, M., Borde, V., Shinohara, A. and A. Hochwagen, Chromosome synapsis alleviates Mek1-dependent suppression of meiotic DNA repair. **PLoS Biology**, 14, e1002369. 2016. DOI: 10.1371/journal.pbio.1002369.
11. Challa, KK., Lee, MS., Shinohara, M., Kim, K.m and A. Shinohara. Rad61/Wpl1(Wapl), a cohesin regulator, controls chromosome compaction during meiosis. **Nuclei. Acids Res.** 44, 3190-3204. 2016. DOI: 10.1093/nar/gkw034

[学会発表](計 9 件)

海外口頭発表 (招待講演)

1. A. Shinohara. Prophase pathway for cleavage-independent removal of cohesin from chromosome arms during late prophase-I in meiosis. Meiosis meeting in Spain, June 4-5, Salamanca, Spain, 2015.
2. Challa, K., Shinohara, M. A. Shinohara. Prophase pathway for cleavage-independent removal of cohesin from chromosome arms during late prophase-I in meiosis. EMBO workshop on Meiosis, September 1-5, Oxford, UK, 2015.
3. Challa, K., Shinohara, M. and A. Shinohara. Prophase pathway for cleavage-independent removal of cohesin from chromosome arms during late prophase-I in meiosis. International RecA and chromosome dynamics meeting, September 16-17, Taipei, Taiwan, 2015.
4. Challa, K., Shinohara, M. and A. Shinohara. Prophase pathway for cleavage-independent removal of cohesin from chromosome arms during late prophase-I in meiosis. FAOBMB meeting, Hyderabad, India, November 27-31, 2015.
5. A. Shinohara. Control of meiotic recombination by chromosome dynamics" Abacam meeting on Mechanism of recombination, Control of Rad51 filament formation. May 19-23, Alicante, Spain, 2014.
6. A. Shinohara Control of meiotic

- recombination by chromosome dynamics”Gordon Research Conference on Meiosis. June 3-8. New London, NH, USA. 2014.
7. A. Shinohara. Control of meiotic recombination by chromosome dynamics” Gordon Research Conference on Genome Instability, Control of Rad51 filament formation. July 6-11, Hong-Kong, China, 2014.
  8. A. Shinohara. Control of meiotic recombination by chromosome dynamics”International conference on Chromosome Stability. Control mechanism of chromosome motion during meiosis December 14-17, Bangalore, India, 2014.
  9. A. Shinohara. Control of meiotic recombination by chromosome dynamics”, Akira Shinohara, FASEB Science Research Conferences Genetic Recombination & Genome Rearrangement, July 21-26, Steamboat, CO, USA, 2013.

国内（口頭、ポスター発表）  
〔学会発表〕（計 13 件）

1. 篠原 彰、Control of chromosome motion by nuclear envelope remodeling during meiosis、4D nucleome、平成 26 年 11 月 17-20 日、広島大学 RcMcD（広島県、東広島市）
2. Chilla Kiran（篠原 彰）、Prophase pathway of arm cohesin removal in budding yeast meiosis、日本遺伝学会、平成 26 年 9 月 17-19 日、長浜バイオ大学（滋賀県・長浜市）
3. 寺澤 匡博(篠原 彰)、M 期における染色体分配と DNA 二重鎖切断修復経路制御の連携機構解明、日本分子生物学会、平成 25 年 12 月 3-6 日、神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市)
4. 林原加代子(篠原 彰)、出芽酵母減数分裂進行における Zip3 の機能解析、日本分子生物学会、平成 25 年 12 月 3-6 日、神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市)
5. Santosh Kumar Gothwal(篠原 彰)、Roles of Paf1 complex in Meiosis of Budding Yeast、日本分子生物学会、平成 25 年 12 月 3-6 日、神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市)
6. Challa Kiran(篠原 彰)、Regulatory mechanism of nuclear envelope remodeling and chromosome motion in meiosis、日本分子生物学会、平成 25 年 12 月 3-6 日、神戸ポートアイランド(兵庫県、神戸市)
7. 寺澤 匡博(篠原 彰)、M 期における染色体分配と DNA 二重鎖切断修復経路制御の連携機構解明、DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、平成 25 年 11 月 20-22 日、ホテルニュー水戸屋(宮城県、仙台市)
8. Santosh K. Gothwal(篠原 彰)、Roles

- of Paf1 complex in Meiosis of Budding Yeast、DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、平成 25 年 11 月 20-22 日、ホテルニュー水戸屋(宮城県、仙台市)
9. Challa Kiran(篠原 彰)、Regulatory mechanism of nuclear envelope remodeling and chromosome motion during meiosis、DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、平成 25 年 11 月 20-22 日、ホテルニュー水戸屋(宮城県、仙台市)
  10. 寺澤 匡博(篠原 彰)、M 期における染色体分配と DNA 二重鎖切断修復経路制御の連携機構解明、放射線影響学会、平成 25 年 10 月 18-20 日、クラウンパレス青森(青森県、青森市)
  11. Mohammad Bani ismail(篠原 彰)、Role of the Histone H3 methyltransferase enzyme Dot1 in Tel1/ATM activation、日本遺伝学会、平成 25 年 9 月 19-21 日、慶應義塾大学日吉(神奈川県、横浜市)
  12. Santosh Kumar Gothwal(篠原 彰)、Roles of Paf1 complex in Meiosis of Budding Yeast、日本遺伝学会、平成 25 年 9 月 19-21 日、慶應義塾大学日吉(神奈川県、横浜市)
  13. Challa Kiran(篠原 彰)、Regulatory mechanism of nuclear envelope remodeling and chromosome motion during meiosis、mplex in Meiosis of Budding Yeast、日本遺伝学会、平成 25 年 9 月 19-21 日、慶應義塾大学日吉(神奈川県、横浜市)

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕  
出願状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
(1) ホームページ等  
<http://www.protein.osaka-u.ac.jp/genome/Shinohara-HP-index.html>

(2) 高校の出前講義（アウトリーチ活動）

1. 出前講義-茨城県立水戸第一高校(平成27年9月22日) 2年生(24名)
2. 出前講義-京都府立嵯峨野高校(平成27年10月26日) 2年生-20名
3. 出前講義-大阪府立住吉高校(平成27年11月7日) 1年生-80名
4. 出前講義-和歌山県立田辺高校 / 田辺中学(平成27年12月9日) 中学3年-80
5. 出前講義-大阪府立住吉高校(平成26年10月20日)
6. 出前講義-福岡県立東筑高校(平成26年10月22日)
7. 出前講義-大阪府立春日丘高校(平成26年10月27日)
8. 出前講義-大阪府立生野高校(平成26年10月30日)
9. 出前講義-京都府立嵯峨野高校(平成26年年11月6日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

(1) 研究代表者

篠原 彰 (SHINOHARA AKIRA)  
大阪大学・蛋白質研究所・教授

研究者番号：00252578

(