

「生命活動のプログラム」
平成8年度採択研究代表者

柳田 充弘

(京都大学大学院生命科学研究科 教授)

「細胞周期における染色体制御に必須な高次複合体の解明」

1. 研究実施の概要

子孫細胞への正確な染色体の分配、核内ゲノム DNA の安定維持にとって、いくつかの巨大分子複合体が必須であるという知見を得た。これらの複合体の活性を同定し、構成する遺伝子産物の機能を深くかつ統合的に検討し、細胞周期における染色体制御について明らかにする。これらの複合体の機能を把握することにより、がんや多様な症状の多くの症状を引き起こす染色体異常の原因が理解され治療への道も開かれる。

2. 研究実施内容

本研究は真核生物の分裂期制御因子の同定と機能解明を目的とし、分裂酵母を材料とした解析を行なった。解析は有糸分裂過程に欠損を示す分裂酵母変異遺伝子の解析を出発点とし、これらの遺伝子をもとに生化学的、遺伝学的手法を取り入れた種々の解析を行なった。今年度は主として Mis4、Cut1、Cut2、および Cut15 を中心とした解析を進め、以下に述べる解析結果を得た。

- (1) Mis4 は有糸分裂時に染色体の不均等分配を示す変異株より同定された。一連の解析の結果、このタンパク質は、均等な染色体分配に必須な因子であり、またアミノ酸配列上種間を通じて保存されていることが明らかとなった。また Mis4 は姉妹染色体間の結合に必須である因子としてすでに報告されている cohesin 複合体とは異なる挙動を示すことを生化学的解析により見いだした。Mis4 は cohesin 複合体とは異なる複合体を形成し、S 期において cohesin 複合体を染色体上にロードすることで姉妹染色分体の結合の制御を行なっている新たなタンパク質複合体ではないかと考えられる。
- (2) Cut1 および Cut2 は姉妹染色体の分離に必須な因子である。Cut1/Cut2 は複合体を形成して機能することはすでに見いだしており、今年度はこの複合体の分子活性について細胞周期を通じて、とりわけ分裂期における解析を進めた。蛍光顕微鏡を用いた高解像度な細胞内局在の解析、および生化学的解析により、Cut1 は分裂期前期にスピンドル微小管に局在を移すが、この過程にはそれに先駆けて

Cut1 と Cut2 の結合が必須であることを示した。また Cut1 は分裂中期だけでなく、分裂期後期にもスピンドル微小管上に局在することから Cut1 の分裂期後期における機能との相関が見られた。さらに Cut2 の分裂期特異的なプロテアーゼによる分解と Cut1 の分裂期後期におけるスピンドル微小管上への局在が分裂期後期の進行に必須であることを示した。

(3) クラゲの緑色蛍光タンパク質(green fluorescence protein)と種々の分裂装置を構成する融合タンパク質を細胞内で発現させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いてそれらの分子の細胞周期における挙動を解析した。この系の最大の利点は細胞内のタンパク質の挙動を生きたまま観察可能な点である。さらに出芽酵母で開発された lac repressor/operator と緑色蛍光タンパク質を組み合わせた系を改変し、分裂酵母動原体の動態を可視化することに初めて成功した。またスピンドル極体の構成成分である Sad1 の局在についても解析を行ない、分裂酵母の染色体分配過程が分裂期後期における明確な三段階の過程に分けられることを明らかにした。また姉妹染色分体の分離に欠損が見られる dis1 変異株ではこの3段階の内のひとつが観察されず、これらの過程が分裂酵母における正常な染色体の分離の進行に必須な過程であることを示した。

(4) Cut15 は染色体の凝縮に必須な因子である。遺伝子をクローン化した結果、驚いたことに Cut15 はタンパク質の核内輸送を担うタンパク質の一つである Importin alpha 相同タンパク質であった。有糸分裂過程とタンパク質の核内輸送の関連はこれまでの知見では説明はなされていない。そこでこの変異株内におけるタンパク質の核内輸送を細胞学的、生化学的に解析した結果、細胞内の核内輸送は起こっていた。これらの解析は核内輸送を司る因子の有糸分裂期における新たな生物機能の存在を示唆する点で興味深い。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

著者	発表論文名	論文誌名
鍋島 健太郎※、中川 尚、Aaron F. Straight§、Andrew Murray§、近重裕次*、山下由起子、平岡 泰*、柳田 充弘 (京都大学大学院理学研究科生物科学専攻)、※大阪大学微生物病研究所、§ Department of Physiology, University of California San Francisco、* 郵政省通信総合研究所関西先端研究センター)	Dynamics of Centromeres during Metaphase-Anaphase Transition in Fission Yeast: Dis1 Is Implicated in Force Balance in Metaphase Bipolar Spindle	「Molecular Biology of the Cell」 Vol.9, pp.3211-3225, November 1998

熊田 和貴、中村 隆宏、 長尾 恒治、船引 宏則※、 中川 尚、柳田 充弘 (京都大学大学院理学研究科 生物科学専攻、※カリフォル ニア大学 サンフランシスコ 校)	Cut1 is loaded onto the spin- dle by binding to Cut2 and promote s anaphase spindle move- ment upon Cut2 proteolysis	「Current Biology」Vol.8,No.11, pp.633-640, 1998
丹羽 一※、片山 栄作§、 柳田 充弘、森川 耿右※ (京都大学大学院理学研究科 生物科学専攻、※生物分子工 学研究所構造解析研究部 X 線 グループ、§ 東京大学医科学 研究所)	Cloning of the Fatty Acid Synthetase β Subunit from Fission Yeast, Coexpression with the α Subunit, and Purification of the Intact Multifu nctional Enzyme Complex	「Protein Expression and Purification」 Vol.13, No.3, pp.403-41 3, 1998
杉浦 麗子※、登田 隆§、 春藤 久人※、柳田 充弘、 久野 高義※ (京都大学大学院理学研究科 生物科学専攻、※神戸大学医 学部薬理学講座、 § Cell Regulation Labora- tory, Imperial Cancer Re- search Fund)	pmp1+, a suppressor of calcineurin deficiency, en- codes a novel MAP kinase phosphatase in fis- sion yeast	「The EMBO Journal」 Vol.17,No.1,pp.140-148, 1998
Zhaohua Tang※、柳田 充 弘、Ren-Jang Lin§ (京都大学大学院理学研究科 生物科学専攻、 ※From the Department of Molecular Biology, Beckman Research Institute of the City of Hope)	Fission Yeast Mitotic Regu- lator Dsk1 Is an SR Protein- specific Kinase	「The Journal of Biological Chemistry」 Vol.273, No.10, pp.5963 -5969, 1998
古谷 寛治、高橋 考太、 柳田 充弘 (京都大学大学院 理学研究科生物科学専攻)	Faithful anaphase is en- sured by Mis4, a sister chromatid cohes ion molecule required in S phase and not destroyed in G1 phase	「Genes&Development」 Vol.12, pp.3408-3418, 1998
柳田 充弘 (京都大学大学院理学研究科 生物科学専攻)	Fission yeast cut mutations revisited: control of ana- phase	「Trends in Cell Biology」 Vol.8, pp.144-149, 1998
松坂 尚裕、今本尚子※、 米田悦啓※、柳田充弘 (京都大学大学院理学研究科 生物科学専攻、※大阪大学医 学部第3内科)	Mutations in fission yeast Cut15, an importin alpha homolog, lead to mitotic progression without chro- mosome condensation.	「Current Biology」 Vol.18, No.18, pp.1031-1034,1998
工藤 信明※、Barbara Wolff§、 関元 敏博*、Erwin P. Schreiner§、 米田 悦啓*、柳田 充弘、 堀之内 未治※、吉田 稔※	Leptomycin, B Inhibition of Signal Mediated Nuclear Export by Direct Binding to CRM1	「Experimental Cell Research」 Vol.242, pp.540- 547, 1998

<p>(京都大学大学院理学研究科 生物科学専攻、※東京大学大 学院農学生命科学研究科、 S Novartis Forschungsinsti- tut, Austria 、 * 大阪市立大 学医学部老年医学研究部)</p>		
---	--	--