

「ゲノムの構造と機能」  
平成11年度採択研究代表者

平岡 泰

(通信総合研究所関西先端研究センター 室長)

## 「ゲノムの安定保持を保證する細胞核構造の解明」

### 1. 研究実施の概要

本研究は、体細胞分裂と減数分裂の過程でゲノムの安定保持に寄与する染色体と細胞核の機能構造を解明することを目的とする。この研究のための実験系として、体細胞分裂の研究には、主にヒト細胞を用いる。ヒト細胞を用いる利点は、ゲノムプロジェクトにより2003年には全DNA配列が明らかになること、染色体構造に影響する遺伝性の疾患が多く報告されていること、そのような患者由来の細胞が存在することなど、個々の分子の機能を細胞レベルで解析するための道具が揃っている。ヒト細胞で困難な解析、高等動物の生殖細胞での染色体や核構造の解析にはマウスを用い、高等動物での遺伝子破壊にはトリ培養細胞 DT40 を用いる。減数分裂の染色体構造の研究には、主に分裂酵母を用いる。分裂酵母では、体細胞分裂から減数分裂に移行する過程で、染色体構造が劇的に変化することが知られており、分子遺伝学が容易であることから、生殖分裂でのゲノム保持機構のモデル系として有用である。これらの細胞に対して、本研究グループが開発した蛍光顕微鏡システムを用いて、セントロメアやテロメア、ヘテロクロマチン領域などの染色体構造の解析を行い、他の細胞核構造との機能的連関を検討する。さらに、これらの構造から、それに関連する遺伝子群の発見に至るための新しい技術として、GFP融合遺伝子ライブラリーを構築し、特定の細胞内局在を示すタンパク質の遺伝子を検索することを試みる。また、GFPのほかに、精製用の His-tag を融合させることにより、生化学精製を行う。タンパク質複合体に含まれるタンパク質を全て網羅的に同定できる。

主な研究項目は、(1)体細胞分裂における細胞核構造の解析、(2)減数分裂における細胞核構造の解析、(3)GFP融合遺伝子ライブラリーの構築、(4)細胞内局在する複合体の分離精製と構成タンパク質の網羅的な同定。

### 2. 研究実施内容

コンピュータ制御のマルチカラー蛍光顕微鏡技術を用いて、ヒト細胞の細胞周期における核機能や構造のダイナミクスを解析した。細胞核の機能の一つである蛋白質核移行能の細胞周期における変化を知るために、蛍光標識した核蛋白質 (rhodamine-NLS-BSA) を生きたヒト細胞に微小注入し、経時観察を行った。この

蛍光蛋白質は細胞の核移行能の有無を示すプローブとして有用であり、このような方法論により細胞周期での細胞核の核移行能の変化を個々の生きた細胞で検討することが可能となった。

さらに、この蛋白質輸送能と核膜などの細胞核構造との連関を検討するために、核蛋白質と染色体をそれぞれrhodamine-NLS-BSAとHoechst33342で、核膜をLamin B receptor-GFPもしくはGFP-emerinを用いて染色し、マルチカラーによる連続観察を行った。その結果、分裂期のtelophaseでは核膜の再形成が核移行能回復に先駆けて起こることなどが分かった。さらに、核移行能に直接関わりと考えられる核膜孔複合体（NPC）の有無を、抗体染色することにより検討した。その結果、核膜の再構築はtelophaseの初期に開始し、同時に核膜孔複合体の集合も起こるが、核移行能の回復はそれより1-2分遅れることが分かった。染色体の脱凝縮は、核移行能の回復後に起こることも分かった。このような実験により、一度崩壊した細胞核が分裂終期で再構築される過程を追跡することができた。この成果は論文としてJournal of Cell Scienceに発表した（Haraguchi et al, 2000）。

分裂酵母のゲノムに由来するランダムなDNA断片にGFPを融合させ、GFP融合ゲノムライブラリーを作製した。このライブラリーで分裂酵母細胞を形質転換し、得られた転換体を蛍光顕微鏡で観察し、個々のGFP融合遺伝子産物の細胞内局在を調べた。ライブラリーの構築に用いたベクターは、全長のGFP遺伝子の5'端にクローニング部位を持ち、外来のプロモーターは持たない。従って、導入されたゲノムDNA断片が生来のプロモーターを含み、遺伝子断片が読み枠を合わせてGFPとつながった場合のみ蛍光タンパク質を生ずる。約50000株の転換体を蛍光顕微鏡でスクリーンしたうち、約7000株に蛍光が認められた。このうちの多くは細胞質に均一な蛍光が見られたが、約800株で、細胞内の特異的な構造が染色された。これら約800株についてDNA塩基配列を部分的に決定し、250個の遺伝子を同定した。これにより、分裂酵母ゲノム中の約250個の遺伝子産物の細胞内局在が明らかになった。分裂酵母遺伝子産物の細胞内局在の画像カタログとして利用できる。この成果は論文としてGenes to Cellsに発表した（Ding et al, 2000）。

### 3．主な研究成果の発表（論文発表）

Tokuko Haraguchi, Takako Koujin, Tomohiro Hayakawa, Toru Kaneda, Chihiro Tsutsumi, Naoko Imamoto, Chihiro Akazawa, Jun Sukegawa, Yoshihiro Yoneda and Yasushi Hiraoka. Live fluorescence imaging reveals early recruitment of emerlin, LBR, RanBP2, and Nup153 to reforming functional nuclear envelopes. *J. Cell Sci.* 113, 779-794. (2000)

Da-Qiao Ding, Yuki Tomita, Ayumu Yamamoto, Yuji Chikashige, Tokuko Haraguchi and Yasushi Hiraoka. Large-scale screening of intracellular protein localization in living

fission yeast cells by the use of a GFP-fusion genomic DNA library. *Genes to Cells* 5, 169-190 (2000).