

「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 グループリーダー)

「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

分裂酵母減数分裂期の染色体構造の変化

分裂酵母では、体細胞分裂から減数分裂に移行すると、染色体の配置が、セントロメアが束ねられた構造からテロメアが束ねられた構造へと、核内で劇的に変化する。その後、ヒトや出芽酵母などでも同様の構造変化が起こることが他の幾

つかのグループによって発見され、このような核構造の変化が、生物種を越えて共通であることがわかった。

このような背景のなかで、分裂酵母細胞を用いて、体細胞分裂期にセントロメアをSPBに留める分子や減数分裂前期にテロメアをSPBに留める分子を検索を行った。その結果、分裂酵母とヒトで共通に存在するセントロメアタンパク質およびテロメアタンパク質を同定した。このセントロメアタンパク質の働きを解析した結果、染色体の分離に必須の働きを持つことが明らかになった。また、テロメアタンパク質の働きを解析した結果、減数分裂期にテロメアが束ねられるために必須の働きを持つことが明らかになった。

また、テロメア結合タンパク質の一つ taz1 と相互作用する分子をtwo-hybrid法で検索し、新規なタンパク質を同定した。これを taf1 と名付け、その働きを解析したところ、環境ストレス耐性に関わることが明らかになった。この成果は、論文として *Current Genetics* に発表した (Ueno et al., 2001)。

さらに、セントロメアとテロメアの逆転という染色体核内配置の変化が、細胞外からのシグナルが核内に情報を伝達されて起こることがわかった。この過程を分裂酵母の種々の減数分裂突然変異株を用いて解析を進めた結果、その遺伝的な制御メカニズムが明らかになってきた。

ヒトの体細胞分裂における細胞核構造の解析

生細胞蛍光イメージング技術を用いて、分裂酵母やヒト培養細胞において染色体と細胞核構造のダイナミクスを解析してきた。現在では、生きたままのヒト細胞で、最大で4種類の生体分子を同時に蛍光で染め分け、その挙動を数日間にわたって追跡することが可能である (Haraguchi et al, 2000)。このような技術を用いて、核膜の構成タンパク質であるラミンBレセプター (LBR) やemerinなどをマーカーとして用い、細胞分裂周期の進行に伴って、細胞核が崩壊し、再構築する過程を追跡した。特に、細胞核膜と相互作用する染色体構成成分を中心に解析を行った。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

Tokuko Haraguchi, Takako Koujin, Yasushi Hiraoka (2000) Application of GFP: Time-Lapse Multi-Wavelength Fluorescence Imaging of Living Mammalian Cells. *Acta Histochem Cytochem* 33 : 169-175

Yasushi Hiraoka, Da-Qiao Ding, Ayumu Yamamoto, Chihiro Tsutsumi, Yuji Chikashige. (2000) Characterization of fission yeast meiotic mutants based on live observation of meiotic prophase nuclear movement. *Chromosoma* 109 : 103-109

S. Takada, T. Shibata, Y. Hiraoka and H. Masuda (2000) Identification of

ribonucleotide reductase protein M 1 as an activator of microtubule nucleation in *Xenopus* egg mitotic extracts. *Mol. Biol. Cell* 11 : 4173-4187

Hirohisa Masuda and Yasushi Hiraoka. (2000) Mechanisms of nuclear division. In *Frontiers in molecular biology : activities of the yeast nucleus* (eds. Peter Fantes & Jean Beggs) 143-175

Ueno, M., Kurokawa, R., Renauld, H., Watanabe, K., Ushimaru, T., Uritani, M., Yoshinaga, K. and Hiraoka, Y. (2001) *Schizosaccharomyces pombe* taf 1 + is required for nitrogen starvation-induced sexual development and for entering the dormant G 0 state. *Current Genetics* 38 : 307-313

Monika Molnar, Sandro Parisi, Yoshito Kakihara, Hiroshi Nojima, Ayumu Yamamoto, Yasushi Hiraoka, Aniko Bozsik, Matthias Sipiczki, and Jurg Kohli. (2001) Characterization of *rec7*, an early meiotic recombination gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 157 : 519-532

原口徳子、平岡泰 (2000) 生細胞蛍光イメージング *実験医学* 18 : 1519-1524

原口徳子 (2001) 細胞核 *病理と臨床* 19(2) : 183-188