

「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 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析」

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としてヒト細胞を用い、減数分裂の染色体構造の研究は分裂酵母を用いる。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。これまでに、ヒトと分裂酵母の蛍光タンパク質を作製し、生細胞蛍光イメージング技術を用いて画像化することより、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および核膜や核内構造体など細胞核構造のダイナミクスを解析してきた。また、細胞核構造と遺伝子発現との連関を調べるために、分裂酵母のGFP融合ゲノムライブラリーやDNAマイクロアレイを作製した。染色体と細胞核の構造を制御する仕組みをゲノムワイドに解析し、分裂酵母とヒトに共通の仕組みを明らかにする。

2. 研究実施内容

生細胞蛍光イメージング

ゲノムが機能するために細胞核はどのような構造的基盤を提供すればいいのかを理解するために、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。この方法は、特定の細胞機能を担うタンパク質を分子生物学や生化学の手法を用いて同定し、そのようなタンパク質を蛍光標識し、細胞内での局在や挙動を解析する。現在のところ、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。また、タンパク質の細胞構造内での移動速度を計測する方法としてFluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) を用い、タンパク質分子間の相互作用を画像化する方法としてFluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)を用いて、細胞内でのタンパク質のダイナミックな相互作用を解析してきた (Haraguchi et al., 2002; Hiraoka et al., 2002)。このような解析と分子生物学的手法を併用することによって、そのタンパク質の機能を解析を行う。これらの方法を用いて行ったヒトおよび

分裂酵母の細胞核構造の解析について以下に記述する。

ヒトの体細胞分裂における細胞核構造の解析

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ている。ヒトの細胞核は、分裂期に先がけて崩壊し、分裂後、染色体の周囲に自己集合的に再構築してくる。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によって、機能する細胞核がどのように作られるかを理解することが目的である。染色体と核膜との相互作用が細胞核構造の再構築と維持にどのように関わるかを理解するために、核膜や核ラミナのタンパク質の挙動に加えて、それと相互作用するクロマチンタンパク質の挙動を解析している。核膜タンパク質Lamin B Receptor (LBR) と相互作用すると言われているHP1タンパク質や、HP1と相互作用すると言われている Ki-67 タンパク質などである。このような解析から、HP1と Ki-67 の細胞周期変動が明らかになった。これらの成果は論文として報告した (Kametaka et al., 2002; Hayakawa et al., in press)。

分裂酵母減数分裂期の染色体構造の変化の解析

分裂酵母では、体細胞分裂から減数分裂に移行すると、核内の染色体配置が劇的に変化することを、我々のグループが見いだした。体細胞分裂期には染色体はセントロメアで束ねられ、セントロメアがspindle-pole body (SPB; 紡錘極体、高等動物の中心体にあたる微小管重合中心) の近くに集合する。これに対し、減数分裂に進行すると、染色体はテロメアで束ねられ、テロメアがSPBの近くに集合する。その後、ヒト・マウス・トウモロコシ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、減数分裂に伴う細胞核構造変換の意義と仕組みを理解することを目指している。

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に留める分子の検索を行った結果、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Nuf2およびテロメアタンパク質Rap1を同定した。セントロメアタンパク質Nuf2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Rap1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。

さらに、種々の減数分裂突然変異株を用いてテロメアとセントロメアの配置を解析することにより、その遺伝的な制御メカニズムを明らかにしようとしている。このような解析から、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、MAP kinase の制御下で起こることがわかった。MAP kinase の活性化することによって、通常は減数分裂に進行しない培養条件からでも、減数分裂を誘導することができた。このような細胞でテロメア・セントロメアの核内配置を解析したところ、テロメアはSPB の近くに集合し、セントロメアがSPBから解離しており、正常な減数分裂前期と同様の核構造を呈した。

分裂酵母GFP融合ゲノムライブラリーの作製

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。約50000株の転換体を蛍光顕微鏡でスクリーンし、細胞内の特異的な構造を染色する約800個のクローンについてDNA塩基配列を部分的に決定し、250個の遺伝子を同定した。これらの遺伝子産物の細胞内局在は画像カタログとして、webで公開している (<http://www-karc.crl.go.jp/bio/CellMagic/index.html>)。現在、このようにして得られた遺伝子のうち染色体と細胞核構造に関わるものを選択して、遺伝子破壊株の作製を行い、機能の解析を進めている。現在までに、核内に点状構造を形成するものや、SPBや核膜に局在する約20個の遺伝子について遺伝子破壊などによる機能解析を行った。

分裂酵母マイクロアレイの作製

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どのような遺伝的制御メカニズムによって起こるかを解析するために、分裂酵母ゲノムの全ORFに対するDNAマイクロアレイを作製した。減数分裂期の核構造変換に伴う遺伝子発現パターンの変化を追跡することで核構造変換の制御の仕組みを解析する。減数分裂特異的に発現する遺伝子を選択し、系統的な遺伝子破壊を行い、その機能を解析している。現在までに約80個の遺伝子について破壊株を作製した。また、このマイクロアレイを用いて、特定のタンパク質が結合するDNA配列や核膜との相互作用領域を同定することを試みている。

3. 研究実施体制

平岡グループ

- ① 研究分担グループ長：平岡 泰（通信総合研究所、グループリーダー）
- ② 研究項目：ゲノムの安定保持を保證する細胞核構造の解析

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

- Matthias Bureik, Burkhard Schiffler, Yasushi Hiraoka, Frank Vogel and Rita Bernhardt (2002). Functional expression of human mitochondrial CYP11B2 in fission yeast and identification of a new internal electron transfer protein, etp1. *Biochemistry* 41, 2311-2321.
- Futaba Miki, Koei Okazaki, Mizuki Shimanuki, Ayumu Yamamoto, Yasushi Hiraoka and Osami Niwa (2002). The 14-kDa dynein light chain-family protein Dlc1 is required for the regular oscillatory nuclear movement and efficient recombination during meiotic prophase in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* 13, 930-946
- Nishihashi, A., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Ikemura, T., Regnier, V., Dodson,

- H., Earnshaw, W. C., and Fukagawa, T. (2002). CENP-I is essential for centromere function in vertebrate cells. *Developmental Cell* 2, 463-476.
- Haraguchi, T., Shimi, T., Koujin, T., Hashiguchi N., and Hiraoka, Y. (2002) Spectral imaging fluorescence microscopy. *Genes to Cells* 7, 881-887
 - Kametaka, A., Takagi, M., Hayakawa, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Yoneda, Y. (2002) Interaction of the chromatin compaction-inducing domain (LR domain) of Ki-67 antigen with HP1 proteins. *Genes to Cells*. 7: 1231-1242.
 - Hiraoka, Y., Shimi, T., Haraguchi, T. (2002) Multispectral Imaging Fluorescence Microscopy for Living Cells. *Cell Struct. Funct.* 27: 367-374.

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数：0件（研究期間累積件数：1件）