

「ゲノムの構造と機能」

平成11年度採択研究代表者

平岡 泰

(独)情報通信研究機構 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て行ってきた。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ことを目指している。

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。体細胞分裂期にはセントロメアが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。

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

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 (T. G. Yamamoto et al., 2004, J. Cell Sci. 印刷中)。さらに、MAP kinase のMAP kinase の活性化が、減数分裂での染色体の正常に必要なことがわかった (A. Yamamoto et al., 2003, EMBO J.)。ヒトの卵形成過程での染色体不正確な分離は染色体異常の原因となり、トリソミー病の主な原因であることから、減数分裂における染色体の正確な分離を制御する仕組みを理解することは、ゲノムの安定な継承に重要な知見を提供する。

また、減数分裂における染色体の正確な分離のためには、相同染色体の対合と組換えが重要である。われわれは、分裂酵母の生細胞で染色体のいくつかの箇所を蛍光染色することにより、染色体のダイナミクスを生きたままで追跡できる実験系を作った。これを用いて、相同染色体の対合過程を観察したところ、分裂酵母の減数分裂では、染色体のテロメアが核の一点にクラスターを作り、テロメアクラスターを先頭に核が往復運動をするが、このようなテロメアが先導する核運動が相同染色体の対合に働くことが、生細胞観察によって示された (Ding et al., 2004, Developmental Cell)。

分裂酵母GFP融合ライブラリーの作製

分裂酵母の全ORF (約5000個) をクローニングし、GFP融合遺伝子を染色体に組み込んだ分裂酵母株を作製し、蛍光顕微鏡で細胞内局在を観察し分類した (CREST 吉田チームとの共同研究)。このライブラリーは発現誘導プロモーターの制御下で遺伝子発現するようにデザインされているので、本来発現していないタンパク質の局在を調べることができるが、その反面、本来の局在を反映していない場合もあり得る。この問題を補うために、細胞内の特定の構造への局在が認められたもの限定して (約1000遺伝子)、本来の染色体の位置にGFP遺伝子を挿入した部分的なライブラリーを作製した。このライブラリーでは、GFPが融合した全長の遺伝子産物が、染色体上の本来の部位から本来のプロモーターの制御下で発現する。

分裂酵母マイクロアレイと遺伝子破壊株の作製

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。この発現解析に基づき、減数分裂特異的に発現する遺伝子を選択して、遺伝子破壊を行った。現在までに約130個の遺伝子について破壊株を作製したうち、テロメアクラスター形成に関わる新規な遺伝子を数個同定した。

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（情報通信研究機構、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) 論文発表

- Ayumu Yamamoto and Yasushi Hiraoka (2003). Monopolar spindle attachment of sister chromatids is ensured by two distinct mechanisms at the first meiotic division in fission yeast
The EMBO Journal Vol.22 No.9 pp.2284-2296
- Majid Hafezparast, Rainer Klocke, Christiana Ruhrberg, Andreas Marquardt, Azlina Ahmad-Annuar, Samantha Bowen, Giovanna Lalli, Abi S. Witherden, Holger Hummerich, Sharon Nicholson, P. Jeffrey Morgan, Ravi Oozageer, John V. Priestley, Sharon Averill, Von R. King, Simon Ball, Jo Peters, Takashi Toda, Ayumu Yamamoto, Yasushi Hiraoka, Martin Augustin, Dirk Korthaus, Sigrid Wattler, Philipp Wabnitz, Carmen Dickneite, Stefan Lampel, Florian Boehme, Gisela Peraus, Andreas Popp, Martina Rudelius, Juergen Schlegel, Helmut Fuchs, Martin Hrabe de Angelis, Giampietro Schiavo, David T. Shima, Andreas P. Russ, Gabriele Stumm, Joanne E. Martin, Elizabeth M. C. Fisher C (2003)
Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. Science 2 May
- Monika Molnar, Eveline Doll, Ayumu Yamamoto, Yasushi Hiraoka and Jürg Kohli (2003) Linear element formation and their role in meiotic sister chromatid cohesion and chromosome pairing Journal of Cell Science, 116(9)
- Tomohiro Hayakawa, Tokuko Haraguchi, Hiroshi Masumoto and Yasushi Hiraoka (2003) Cell cycle behavior of human HP1 subtypes: distinct molecular domains of HP1 are required for their centromeric localization during interphase and metaphase Journal of Cell Science 116(16), 3327-3338
- Tetsuya Hori, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraoka, Hiroshi Kimura and Tatsuo Fukagawa (2003) Dynamic behavior of Nuf2-Hec1 complex that localizes to the centrosome and centromere and is essential for mitotic progression in vertebrate cells Journal of Cell Science 116(16), 3347-3362
- Yasushi Hiraoka and Yuji Chikashige (2003)
Telomere Organization and Nuclear Movements

The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe, 191-205pg(9)

- Ayumu Yamamoto and Yasushi Hiraoka(2003)
Cytoplasmic dynein in fungi: insights from nuclear migration
Journal of Cell Science, 116(22)
- Tokuko Haraguchi, James M. Holaska, Miho Yamane, Takako Koujin, Noriyo Hashiguchi, Chie Mori, Katherine L. Wilson and Yasushi Hiraoka (2004)
Emerin binding to Btf, a death-promoting transcriptional repressor, is disrupted by a missense mutation that causes Emery-Dreifuss muscular dystrophy European Journal of Biochemistry, 271, 1035—1045
- Eishi Funakoshi, Takamitsu Hori, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraoka, Jun Kudoh, Nobuyoshi Shimizu and Fumiaki Ito (2003)
Overexpression of human MNB/DYRK1A gene induces formation of multinucleate cells through overduplication of the centrosome.
BMC Cell Biology 4:12.
- Da-Qiao Ding, Ayumu Yamamoto, Tokuko Haraguchi and Yasushi Hiraoka(2004)
Dynamics of homologous chromosome pairing during meiotic prophase in fission yeast Developmental Cell, Vol. 6 329-341

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：0件（CREST研究期間累積件数：1件）