

ゲノムの安定保持を保証する細胞核構造の解明

平岡 泰 (CREST・通信総合研究所 関西先端研究センター)

体細胞分裂での、染色体の正確な複製や分配は、細胞機能に必須である。細胞機能の異常は、ガンや胎児の奇形や様々な疾患を引き起こす。そのため、細胞の正常な分裂を保証する機構は、個体の生存に非常に重要である。一方、生殖細胞を作るための減数分裂では、父母に由来する2組のゲノム情報が組換わり、遺伝的多様性を生み出す。このようにゲノムは、変化を許さない仕組みと、変化を促す仕組みを持っているといえる。このような2つの仕組みを使い分けるための遺伝的制御や構造的基盤はどこにあるのか。体細胞分裂および減数分裂の過程でのゲノムの安定保持を理解するために、蛍光顕微鏡システムを用いて、染色体と細胞核構造を解析してきた。実験系として、分裂酵母とヒト細胞を用い、双方の利点を活かして解析を進めている。ヒト細胞を用いる利点は、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。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(文献1)、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、生細胞蛍光イメージング法を用いることにより、染色体や特定のタンパク質の細胞内局在などの空間的情報と経時変化という時間的情報を同時に得ることが可能となった。

このような研究から、これまでに得られた主な結果について以下に要約する。

1) 分裂酵母の GFP 融合ゲノム DNA ライブラリー

分裂酵母において、クラゲの蛍光タンパク質 GFP との融合遺伝子ライブラリーを作製し、タンパク質の系統的な細胞内三次元マッピングを行った。分裂酵母ゲノムから調製したランダムな DNA 断片に GFP を融合させ、網羅的な 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て、個々の GFP 融合遺伝子産物の細胞内局在を調べた。約 50,000 株の転換体を蛍光顕微鏡で検索したうち、約 700 株で、細胞内の特異的な構造が染色された。538 株について DNA 塩基配列を部分的に決定した結果、250 個の独立の遺伝子が得られ、遺伝子産物の細胞内局在により分類された(文献2)。このライブラリーを用いると、染色体構築に関与する一連の遺伝子群を、その局在を指標として同定できる。従来、細胞内局在というのは、遺伝子やタンパク質が分離されて始めて観察できるもので、細胞内局在から逆に遺伝子やタンパク質に至ることは容易ではなかった。この新規な手法の特色は、局在を知ることにより、そこに含まれるタンパク質とその遺伝子が直ちに得られ、複合体を形成する遺伝子産物を芋づる式に同定できることである。

2) 分裂酵母減数分裂期の染色体構造の変化

我々の研究グループは、分裂酵母を用いた研究から、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ことを発見した。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。これは、体細胞分裂で、セントロメアが大きな役割を果たすのと好対照をなす。セントロメア主体からテロメア主体に切り替わるのが、ヒトを含めた多くの種の生殖に重要なプロセスとして認識されてきた。

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。さらに、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。また、減数分裂期にテロメアが集合することが、減数分裂の進行に必要なことが、突然変異株の解析から実証された。セントロメアとテロメアの逆転の遺伝的制御の仕組みを理解するために、現在、遺伝子破壊株の系統的な作製やDNAマイクロアレーによる遺伝子発現パターンの解析を進めている。

さらに、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タンパク質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。これらの知見を、分裂酵母とヒトで共通のメカニズムの理解へと発展させていきたい。

3) 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。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することが可能になった(文献3)。染色体と細胞核膜との相互作用に関わるタンパク質とそのダイナミクスを紹介する。

参考文献

1. Chikashige, Y., Ding, D. Q., Funabiki, H., Haraguchi, T., Mashiko, S., Yanagida, M. & Hiraoka, Y. Telomere-led premeiotic chromosome movement in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Science* **264**, 270-273 (1994).
2. Da-Qiao Ding, Tomita, Y., Yamamoto, A., Chikashige, Y., Haraguchi, T. & Hiraoka, Y. 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).
3. Haraguchi, T., Koujin, T., Hayakawa, T., Kaneda, T., Tsutsumi, C., Imamoto, N., Akazawa, C., Sukegawa, J., Yoneda, Y. & Hiraoka, Y. Live fluorescence imaging reveals early recruitment of emerlin, LBR, RanBP2, and Nup153 to reforming functional nuclear envelopes. *J. Cell Sci.* **113**, 779-794 (2000).