

染色体均等分配を保障する動原体構成因子の探求

Search for kinetochore components ensuring equal chromosome segregation

研究代表者 久留米大学分子生命科学研究所 細胞工学研究部門 助手 齋藤成昭

Department of Cell Biology, Institute of Life Science, Kurume University,
assistant professor, Shigeaki Saitoh

要旨

複製された染色体は、有糸分裂期に紡錘体装置によって姉妹細胞へと均等に分配されます。動原体は、染色体の特定部位に形成される DNA-タンパク質複合体ですが、紡錘体に沿って染色体を動かす「駆動エンジン」であると共に、染色体分配の均等性を保障する高度な制御機構を備えています。しかしながら、その制御メカニズムについては、未だに不明の部分が多く残されています。我々は、本研究において、Mix1 と名付けた動原体構成因子を同定しました。Mix1 は、動原体構成タンパク Mis6 とともに巨大な分子複合体を形成し、染色体均等分配に必須な機能を果たしていました。Mis6-Mix1 複合体は、細胞周期進行と染色体分配を協調させる M 期チェックポイントタンパク質 Mad2 の動原体局在化に必要でした。さらに Mis6 の N 末断片は Mad2 と物理的に結合し得ること、および紡錘体とも相互作用し得ることを示しました。Mis6-Mix1 は、動原体と紡錘体の結合状態を監視し、Mad2 の局在を制御しているのかもしれない。

Abstract

Replicated chromosomes are segregated equally to sister cells during mitosis. A kinetochore is a protein-DNA complex formed at a certain position of each chromosome, and is an “engine” to move the chromosome along the mitotic spindle. The kinetochore is equipped with sophisticated controlling mechanisms ensuring equal chromosome segregation. Much about this mechanisms remains unknown, however. In this study, we found a new kinetochore component designated as Mix1. Mix1 forms a large molecular complex containing another kinetochore protein, Mis6, and plays an essential role for the equal segregation of the chromosomes. The Mis6-Mix1 complex is required for the accumulation of Mad2 to kinetochores. Mad2 is a component of the M-phase checkpoint pathway, which coordinates cell cycle progression and chromosome segregation. It is revealed that an N-terminal fragment of Mis6 physically binds to both Mad2 and the spindles. The Mis6-Mix1 complex may monitor the state of attachment between kinetochores and spindles, and may regulate the localization of Mad2.

1. 研究目的

遺伝情報を次世代へと伝える「乗り物」と言える染色体は、複製期（S 期）に複

製され、有糸分裂期（M 期）に姉妹細胞へと均等に分配されます。有糸分裂時には、紡錘体と呼ばれる「レール構造」が

形成され、それに沿って染色体は移動します。その際、複製された姉妹染色体は、必ずお互いに逆方向へと移動します。姉妹染色体が逆方向へと移動すること、すなわち「二方向性(biorientation)」は、染色体に乗った遺伝情報を均等に分配するために必要な「交通整理」ですが、どのような分子メカニズムによってそれが保障されているのか、未だに明らかではありません。

動原体は、染色体上の特定領域に形成された DNA-タンパク複合体であり、紡錘体と結合して染色体を引き動かす「駆動エンジン」です。それはモーター機能のみならず、姉妹動原体間の移動を調整して「二方向性」を保障し、またあるいは染色体分離と細胞周期進行を連動させるような高度な制御機構を備えていることが多くの研究によって示唆されています。それゆえ動原体の分子構成を明らかにし、その精巧な分子機械の全容を明らかにすることは、染色体分配の均等性という生命の根幹的現象を理解する上で極めて意義深いことです。

上述のような背景をふまえ、本研究では、遺伝的・分子生物学的取り扱いが可能な分裂酵母を用い、新たな動原体構成因子を網羅的にとらえ、それらの分子機能を解明することを目指しました。

2. 研究経過

2-1. 動原体タンパク複合体の精製の試み

我々のグループはすでに、分裂酵母 Mis6、CENP-A という二つの動原体構成タンパ

ク質を見だし、報告しています。これらと物理的に結合するタンパク質を網羅的に精製し、それらの正体を同定することを試みました。

具体的には、まず TAP (tandem affinity purification) tag と呼ばれる分子標識を Mis6 と融合した改変遺伝子を作製し、ゲノム中の本来の *mis6* 遺伝子を改変遺伝子で置換しました。*mis6-TAP* 遺伝子をもつ酵母株は、野生株と同様に生育しましたので TAPtag が Mis6 の分子機能を阻害しないと結論しました。融合タンパク質の発現を確認した後、定法に従い、Mis6 タンパク質複合体の精製を試みました。しかしながら十分な純度は達成できず、精製条件の詳細な検討が必要であると判断しました。現在、FLAG エピトープなどの別の分子標識の利用も視野に入れ、精製法を検討しています。

CENP-A に関しては、タンパク質 C 末端への TAPtag 付加が、その分子機能を損なうことが明らかとなりました。そこで、N 末側への付加を行い、改変遺伝子を多コピープラスミドベクターに乗せ、酵母細胞へと導入しました。この形質転換酵母株を利用して、CENP-A 複合体精製の条件を検討中です。

2-2. Mis6 結合タンパク Mix1 の同定

先に述べた生化学的アプローチは難航することが予想されたので、同時に遺伝学的なアプローチによる Mis6 結合タンパク質の同定を試みました。*mis6-302* 温度感受性致死変異体の生育を回復させ

る多コピー抑制遺伝子をスクリーニングしたところ、Mix1 と名付けた 30kd のタンパク質をコードする *mix1* 遺伝子が得られました。Mix1 は coiled-coil モチーフに富むタンパク質で、ヒト CENP-H と弱い配列類似性を示します。GFP 融合によりその細胞内局在を調べたところ、細胞周期を通じて動原体に局在化していました。また、免疫沈降実験により、予想通り Mis6 タンパク質と Mix1 タンパク質が細胞内で強固に結合していることを見いだしました。ゲル濾過クロマトグラフィーにより、Mis6-Mix1 が分子量約 500kD の巨大複合体を形成していることが明らかとなりました。Mix1 は複合体中で二量体として存在しているようでした。データベース検索の結果、*mix1* は、動原体中央部の遺伝子サイレンシングに必要なと報告されている *sim4* 遺伝子と同一であることが判明しました。

2-3. *sim4/mix1* 遺伝子機能の探索

sim4/mix1 遺伝子の機能を探るため、プロモーターを改変し、培地へのビタミン B1 添加により *sim4/mix1* 遺伝子発現の有無を任意に調節できる株 (*sim4-shut-off* 株) を作製しました。この細胞株の培養液中にビタミン B1 を添加すると *sim4* 遺伝子の発現が遮断されます (*shut-off*)。 *sim4* 遺伝子の発現を遮断された細胞は生育することが出来ませんでした。その時、死細胞での核分裂の様子を観察したところ、*mis6* や *cnpl* (=CENP-A タンパク質をコードする遺伝子) の機能欠損変異体と同

じく、不均等な染色体分配が高頻度で観察されました。すなわち、*sim4* 遺伝子は姉妹染色体を均等に分配するために必須な機能を果たしていると考えられます。*sim4* 遺伝子の発現を遮断した細胞では、Mis12、Nuf2 あるいは CENP-C といった他の動原体タンパクは依然として動原体領域に局在化していましたが、Mis6、CENP-A は動原体に局在化出来なくなっていました。したがって Sim4 は Mis6、CENP-A の動原体局在化に必要であるといえます。反対に *mis6-302* 変異体中では Sim4 が動原体に局在化出来なくなっていたので、Sim4-Mis6 は、その動原体局在化能に関して、相互依存的であるようです。*sim4* 遺伝子発現を遮断した細胞中でも、Mis12 等のタンパク質は依然として動原体に局在し続けたことから推論すると、動原体構成タンパク質群は、機能的に互いに関連しあいながらも物理的には独立したいくつかのサブモジュールを形成している可能性が示唆されました。

2-4. Mis6-Sim 4 の新たな分子機能

Sim4-shut-off 株、*mis6* 変異株でおこる染色体不均等分配の様子を詳細に検討したところ、これらの変異体では M 期チェックポイントが正常に機能していないのではないかという可能性が示唆されました。M 期チェックポイントは、すべての染色体が「二方向性」を確立するまで細胞周期の進行を抑制する制御機構であり、染色体の均等分配を保障する上で重要な役割を果たしています。M 期チェックポ

イントに関与するタンパク質のうち Mad2 と呼ばれる進化的に保存されたタンパク質は、有糸分裂期初期に、紡錘体と未結合の動原体上に集積します。Sim4 の発現を遮断した細胞あるいは *mis6* 変異細胞中での Mad2 の挙動を観察したところ、両変異体では Mad2 の動原体集積が起こらないことが明らかとなりました。薬剤によって紡錘体形成を阻害し、動原体と紡錘体が結合できなくすると、野生株細胞ではM期チェックポイントが発動します。しかしながら *mis6* 変異細胞では、紡錘体形成が阻害されてもチェックポイントは活性化しませんでした。これらの結果から、Mis6-Sim4 は、Mad2 の動原体集積を通じて、M 期チェックポイント機構に深く関与していることが考えられました。

さらに、免疫沈降より、Mad2 と Mis6 が物理的に結合し得ること、および Mis6 の N 末部分断片が紡錘体に結合し得ることを示す証拠が得られました。

3. 研究成果

Mis6 動原体タンパク質と物理的に結合する因子として Sim4/Mix1 タンパクを同定しました。Mis6-Sim4 複合体には、さらに未知の構成因子が含まれており、約 500kD の巨大分子複合体を形成しているようです。Mis6-Mix1 複合体は、動原体特異的ヒストン H3 (CENP-A) およびチェックポイントタンパク質 Mad2 の動原体局在化に必要であることが明らかとなりました。さらに Mis6 N 末部分断片は紡錘体と Mad2 の両方に結合し得ることが

明らかになりました。これらの結果により、M 期チェックポイント経路において果たす Mis6-Sim4 複合体の新たな機能が浮かびあがってきました。Mis6-Sim4 複合体は、動原体と紡錘体の結合状態を監視し、Mad2 の動原体局在化を制御しているのかもしれません。

4. 今後の課題と発展

精製条件の検討を進め、動原体構成タンパクの生化学的同定を進展させる必要があります。Mis6-Sim4 が果たすチェックポイント機能についての解析は、より詳細な分子メカニズムの解明が必要となると考えています。Mad2 と結合する Mis6 N 末断片が紡錘体に結合するという点は、非常に興味深い結果です。ヒト細胞を用いて同様の結果が得られるのかどうか検証していきたいと考えています。M 期チェックポイントは、脊椎動物においては、発ガンとの関連性が指摘されています。本研究が、抗ガン治療の基礎的知見の解明へと結びつくかもしれません。

5. 発表論文リスト

S.Saitoh et al. "A Novel Role of Mis6 Kinetochores Subcomplex in Linking Mitotic Spindles with the Mad2-related Checkpoint" 投稿準備中