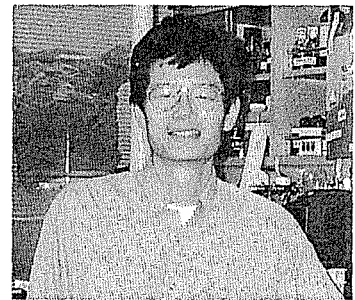


染色体分離装置の作られる仕組みを探る

「遺伝と変化」領域 升田 裕久

要旨



染色体分離装置形成の初期ステップの一つは、分裂極における微小管形成の活性化であり、動物細胞においては中心体、酵母においてはスピンドル極体が分裂極を形成する。1) スピンドル極体を持つ分裂酵母細胞をツメガエル卵分裂期抽出液を用いて活性化する試験管内再構成系を構築し、活性を指標に卵分裂期抽出液より分裂極活性化因子を精製した結果、80 kD を主成分とする画分を得た。2) アミノ酸配列の解析と特異抗体との反応性から、80 kD はリボヌクレオチドリダクターゼのラージサブユニット(RNR)であることがわかった。3) RNR を認識する抗ペプチド抗体や RNR に対するポリクローナル抗体は、試験管内再構成系におけるスピンドル極体の活性化を阻害した。4) ツメガエル精子核と卵分裂期抽出液を用いた試験管内染色体分離装置形成系に抗体を添加すると、精子核から形成される中心体の微小管形成能力が減少し、染色体分離装置形成が部分的に抑制された。5) 動物培養細胞の蛍光抗体法観察によって、RNR は細胞質の可溶性画分に存在するのに加えて、分裂極の中心体と間期の中心体に存在することがわかった。6) CHO 細胞内での RNR の大量発現によってガンマチューブリンで染色される細胞内構造の数が増加した。

以上の結果から、RNR が中心体の構成成分であり、分裂期においては中心体の活性化因子であることが強く示唆された。RNR は、DNA 合成経路を通して DNA 複製を制御することに加えて中心体活性を制御することから、染色体複製、分裂サイクルと中心体複製、分裂サイクルをリンクするタンパク質である可能性が示唆された。

研究の狙い/目的

染色体分離装置形成は多くのタンパク質が関与する複雑な現象であり、大きく3つのステップに分けることができる。(1) 分裂期開始のマスターキナーゼである cdc2 キナーゼの活性化の後、二つの分裂極からの微小管形成の活性化と、凝縮染色体の形成が起こる。(2)

染色体上のキネトコア領域への微小管の結合と、二つの分裂極から重合した微小管同士の相互作用による二極構造（紡錘体）の形成が起こる。（3）紡錘体の中央部分へ染色体が移動する。完成した分離装置は未知のシグナルによって染色体分離を開始すると考えられている。分子レベルでの研究は現在主に2つの方向から進められている。酵母などの突然変異株を用いた分子遺伝学的解析とツメガエル卵抽出液などを用いた試験管内再構成系による機能解析である。後者は試験管内で分離装置形成過程、染色体分離過程を再現することにより、それに関わる分子とその機能を明らかにしようとする試みであり、他の方法では困難な生化学的解析と分子機能解析を可能にする。本研究では、分離装置形成の初期ステップの一つである分裂極からの微小管形成の活性化の分子機構を試験管内再構成系を用いて明らかにしたい。分裂酵母とツメガエル卵抽出液を用いたハイブリッド再構成系によって生化学的解析、分子機能解析と、分子遺伝学的解析の融合を目指す。

研究方法と成果

分裂期特異的な微小管形成の活性化の分子機構を解明するために、間期において微小管形成能を持たず分裂期にのみ微小管形成能を持つスピンドル極体が分裂極を形成する分裂酵母細胞を利用し、不活性型スピンドル極体を活性型に変換できる細胞質因子の同定を行った。

微小管形成能を持たない不活性型スピンドル極体を持つ間期分裂酵母細胞を界面活性剤 Triton X-100 処理で除膜し、細胞内可溶性成分を取り除いたあと、アフリカツメガエル未受精卵から調製した分裂期抽出液を加えることにより、微小管形成能を持つ

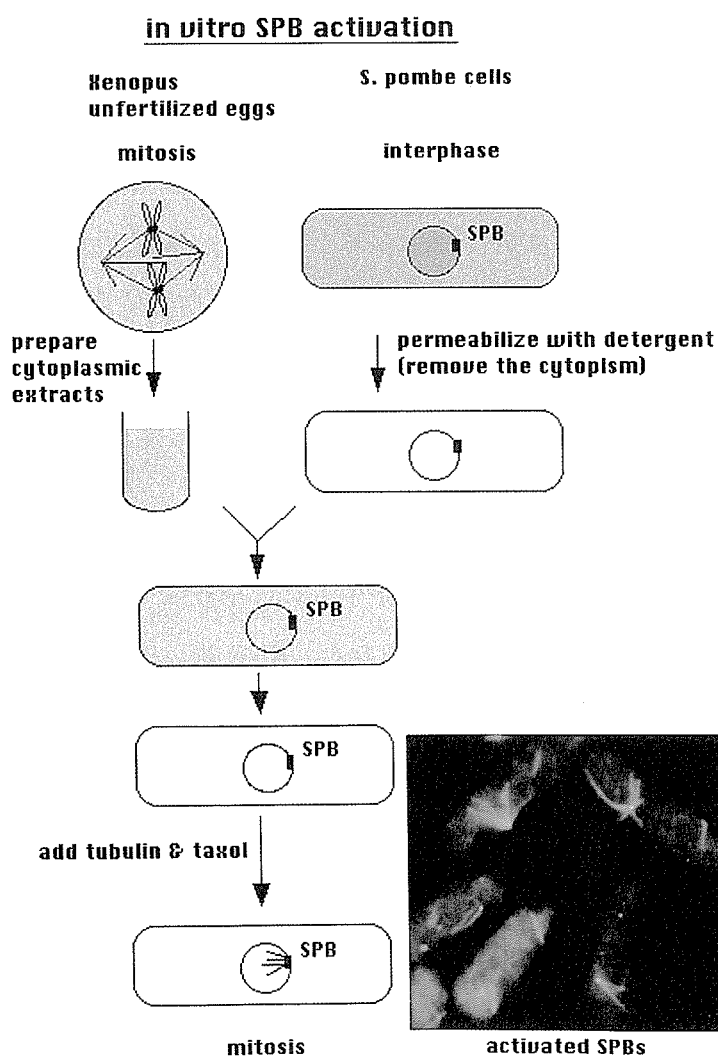


図1. 分裂極活性化因子を同定するための試験管内再構成系の構築。

分裂期活性型スピンドル極体に変換できた (図1)。このアッセイ系における活性を指標にして、ツメガエル卵分裂期抽出液より、分子量 80kD の分裂期特異的な微小管形成の活性化因子を得た。

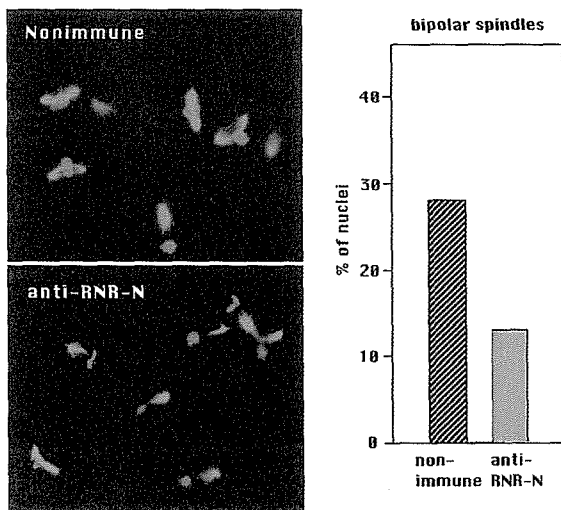
80kD の部分アミノ酸配列を決定した結果、リボヌクレオチドリダクターゼ(ribonucleotide reductase)のラージサブユニット (以下、RNR と略す)、特にヒト、マウスの配列に非常に高いホモロジーを持つことがわかった。部分アミノ酸配列を元に得られた PCR 断片(1.8kb)の配列も高いホモロジーを示した。ヒト、マウスなどで高いホモロジーを示すアミノ末端側の配列を持つペプチドに対する抗体、マウス RNR のカルボキシ末端側 1/2 断片に対する抗体、部分アミノ酸配列を元に得られた PCR 断片から発現させた部分タンパク質 (60 kD) に対する抗体を作製した。どの抗体も 80 kD を認識したことから、80 kD はツメガエルにおける RNR であると結論した。

80 kD がスピンドル極体の活性化因子であることを示すために、80 kD 画分に作製した3種の抗体を添加し、その活性化に対する影響を調べた。どの抗体も 80 kD 画分によるスピンドル極体の活性化を阻害した。

次に、80 kD が分裂期における中心体からの微小管形成と染色体分離装置の形成に関与し

A.

Effect of anti-RNR on in vitro spindle assembly



B.

Effect of anti-RNR on microtubule formation

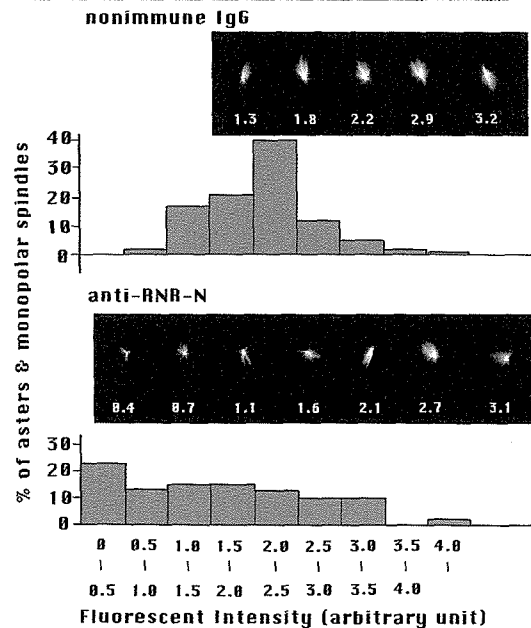


図2. (A) 80 kD 抗体による染色体分離装置形成の部分的抑制. 分離装置形成の試験管内再構成系にコントロール IgG, あるいは 80 kD 抗体を加えたときに観察される微小管構造 (赤) と染色体 (青).

(B) 80 kD 抗体による微小管形成の部分的抑制. 星状体構造の微小管形成量を蛍光強度によって定量した.

ているかどうかを明らかにするために、染色体分離装置の試験管内再構成系における 80 kD に対する抗体の影響を調べた。除膜したツメガエル精子核をツメガエル卵分裂期抽出液に加えることにより、精子核の中心子が抽出液中で中心体に変換され、微小管形成を行い（星状体 (Microtubule aster) 形成)、その後、精子クロマチンから形成される染色体と共同的に働いて、染色体分離装置が形成される。この系に 80 kD 抗体を加えると、コントロールの IgG を加えたときと比較して、形成される染色体分離装置の数が減少した (図 2 A)。このとき、染色体分離装置を形成しないで、星状体にとどまっている構造を観察すると、80 kD に対する抗体を加えた場合には中心体から形成される微小管の数が減少していることがわかった (図 2 B)。この結果は、80 kD が精子核中心子上での中心体形成過程あるいは中心体からの微小管形成過程に関与していることを示唆する。80 kD の抗体を用

いて、精子核から形成される中心体に 80 kD が局在するかどうかを調べた。中心体のマーカータンパク質であるガンマチューブリンと同様に、中心体に局在することがわかった (図 3 A)。

80 kD が中心体に存在することを確認するために、動物培養細胞内における 80 kD の局在を調べた。細胞質が染色されるのに加えて、分裂極、および間期の微小管の形成中心が認識された (図 3 B)。細胞を Triton X-100 で処理してから固定すると、細胞質の染色が大きく減

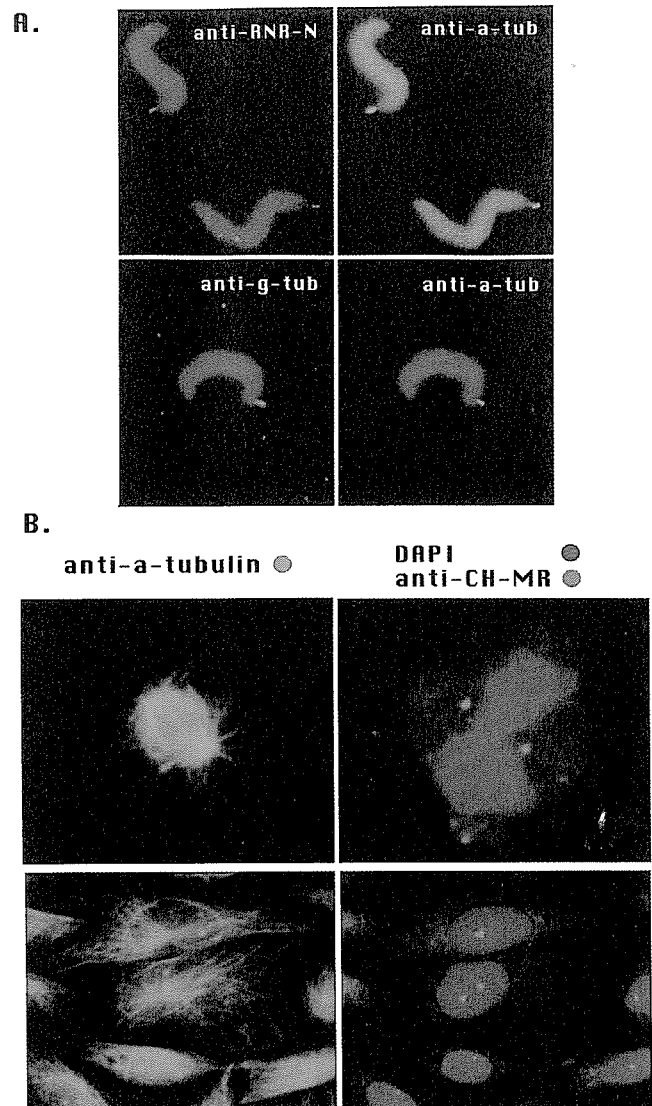


図 3. (A) 精子核から形成された中心体における 80 kD(RNR)とガンマチューブリン(g-tub)の局在. 中心子をアルファチューブリン(a-tub) に対する抗体で染めた.

(B) 動物培養細胞の中心体への 80 kD の局在. 分裂期細胞 (上) と間期細胞 (下) 中で観察される微小管 (緑)、80 kD (赤) と染色体 (青).

少し、中心体が強く染色されることから、80 kD は細胞質の可溶性画分と中心体上に存在することがわかった。

80 kD が中心体の構築、あるいは中心体からの微小管形成に関与しているとすると、80 kD の大量発現により80 kD と相互作用する中心体関連タンパク質の強制的な転位を誘導することが予想される。80 kD のマウスにおける相同遺伝子を CHO 細胞内で一過的に大量発現させると、中心体の構成成分であるガンマチューブリンに対する抗体で認識される場所の数（通常は中心体数の1 - 2個）が発現量に依存して増加した（図4）。

Overexpression of mouse RNR in CHO cells
anti-FLAG **anti-gamma-tubulin**

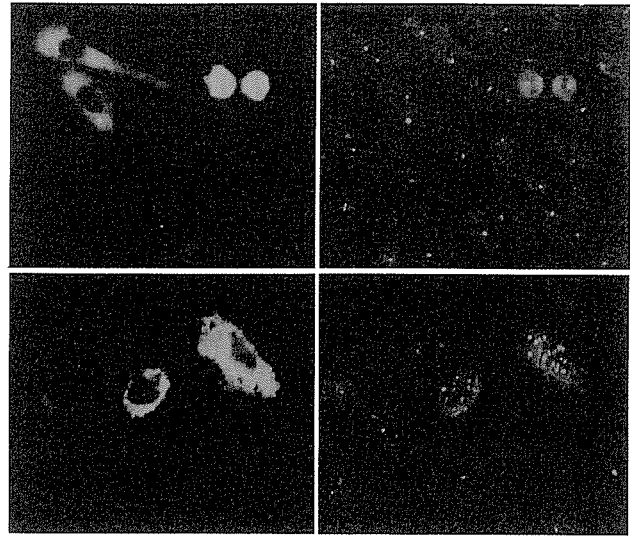


図4. 80 kDを一過的に大量発現させたCHO細胞内で増加するガンマチューブリン抗体で認識される構造. 発現させた80 kDはFLAGペプチドのEpitope taggingにより、FLAG抗体を用いて観察した。

以上の結果から、80 kD は中心体の構成成分であり、分裂期においては微小管形成の活性化因子として染色体分離装置の構築に関与していることが示唆された。リボヌクレオチドリダクターゼは、1) リボヌクレオチドをDNA合成の前駆体であるデオキシリボヌクレオチドに変換する酵素でS期に機能すること、2) 分子量80 - 80 kDのラージサブユニットの二量体と

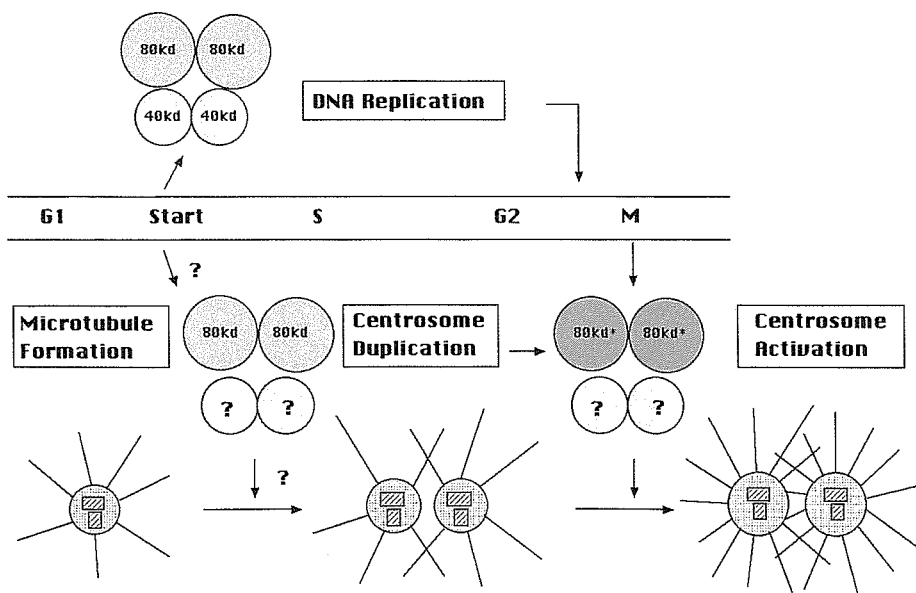


図5. 細胞周期による二機能性タンパク質80 kDの機能制御。

40 kD のスモールサブユニットの二量体が結合した複合体となって、酵素活性を持つこと、3) S期の開始シグナルとともに誘導されるスモールサブユニットの量の増加とともに複合体の量が増加することが知られている。単離された80 kDは40 kDのスモールサブユニットと結合していないので、単独で中心体の機能に関与していることが示唆された。80 kDは、S期におけるDNA合成の前駆体の供給とM期における中心体の活性化に関与している二機能性タンパク質であると思われる(図5)。

今後の展望

80 kDが中心体における機能発現のために相互作用するタンパク質の同定、80 kDの機能が細胞周期に依存して制御されるメカニズムの解明、80 kDの中心体への局在を制御しているメカニズムの解明など、多くの興味深い問題が今後の問題として残されている。また、80 kDが、DNA複製・分離サイクルと中心体の複製・分離サイクルの両方に関与していることから、80 kDの機能解析を通して、これまでほとんどわかっていない2つのサイクルのカップリングのメカニズムを明らかにできることを期待している。

発表論文リスト

1. Masuda, H. and Shibata, T. Role of gamma-tubulin in mitosis-specific microtubule nucleation from the *Schizosaccharomyces pombe* spindle pole body. *J. Cell Sci.* **109**, 165-177 (1996)
2. Hirara, D., Masuda, H., Eddison, M., and Toda, T. Essential role of tubulin-folding cofactor D in microtubule assembly and its association with microtubules in fission yeast. *EMBO J.*, in press. (1997)
3. Nakamura, M., Masuda, H., Hori, J., Yokoyama, N., Ohta, T., Tanaka, M., and Nishimoto, T. A centrosomal Ran-binding protein involved in microtubule nucleation., 投稿中 (1997)

総説・解説

1. Masuda, H. The formation and functioning of yeast mitotic spindles. *BioEssays* **17**, 45-51 (1995).
2. 升田裕久. 動物体には運動方向の異なる2種類の微小管モーター活性がある.” 英語論文セミナー: 現在の細胞生物学” (丸山工作、馬淵一誠、山本正幸 編集)、講談社サイエンスフィク、東京、p20-28、(1996).

3. 升田裕久、高田左恵子、太田邦宏. CHO 細胞からの中心体の単離と微小管重合.” 細胞生物学の基礎技術：細胞骨格・細胞運動へのアプローチ” (馬淵一誠 編集)、羊土社、東京、p239-249, (1997).

口頭発表

1. Masuda, H., and Shibata, T. Role of kinases and gamma-tubulin in mitosis-specific activation of the *S. pombe* spindle pole body. The 3rd JRDC international symposium on Cell growth and Development, Osaka, 1995.
2. Masuda, H., and Shibata, T. Role of gamma-tubulin in mitosis-specific activation of *S. Pombe* spindle pole body. 35th annual meeting of American Society for Cell Biology, Washington, D.C., USA, 1995.
3. Takada, S., Shibata, T. and Masuda, H. Partial purification of a mitosis-specific activator of the *S. pombe* spindle pole body from *Xenopus* mitotic extracts. Takada, S., Shibata, T. and Masuda, H. 6th International Congress on Cell Biology/36th Annual Meeting of American Society for Cell Biology, San Francisco, USA, 1996.
4. Takada, S., Shibata, T., and Masuda, H. Purification of a spindle pole activator from *Xenopus* mitotic extracts. "Centrosomes and Spindle Pole Bodies"(ASCB/EMBO/H.Dudley Wright Conference). Santa Cruz, USA 1997.
5. Takada, S., Shibata, T., and Masuda, H. Identification of a spindle pole activator in *Xenopus* egg mitotic extracts. UK/Japan Cell Cycle Workshop. Kyoto. 1997.
6. Takada, S., Shibata, T., and Masuda, H. Purification of a spindle pole activator from *Xenopus* mitotic extracts. 37th annual meeting of American Society for Cell Biology, Washington, D.C., USA, 1997.
7. 升田裕久,柴田武彦 星状体形成とガンマチューブリン 第48回日本細胞生物学会大会 (1995).
8. 升田裕久,高田左恵子,柴田武彦 スピンドル極体活性化因子 第49回日本細胞生物学会大会 (1996)
9. 高田左恵子, 柴田武彦, 升田裕久 試験管内再構成系を用いた中心体活性制御機構の解析 第50回日本細胞生物学会大会 (1997)
10. 高田左恵子, 柴田武彦, 升田裕久, 分裂極活性化因子 第50回日本細胞生物学会大会 (1997)
11. 高田左恵子, 柴田武彦, 升田裕久 ツメガエル卵分裂期抽出液中に存在するスピンドル極活性化因子の同定と機能解析 第20回日本分子生物学会年会 京都 (1997)