

細胞分裂期における染色体と核膜との関係

大阪大学 蛋白質研究所
生命維持情報ネットワーク研究グループ
加納 純子

1. 背景

細胞分裂期（M期）は、細胞周期の中で複製された遺伝情報を娘細胞に分割する時期である。M期の制御に異常が生じると、細胞のガン化、細胞死を誘導することから、M期が正常に制御されていることが生命維持のために非常に重要であると考えられる。M期には、中心体（あるいは紡錘極体）の分離、紡錘体の形成、姉妹染色分体の分離、核膜の複製など、様々な反応が次々に起こる。これらの反応は巧妙にコーディネートされ、厳密に秩序が維持されている。

近年、染色体のセントロメア領域にキネトコアという構造体が形成され、それがM期の正常な染色体分離において必須の役割を果たしていることが明らかにされてきた。しかし、M期進行における染色体の他の部分の機能については、不明な点が多く残されている。真核生物の線状染色体の末端には、テロメアとよばれる構造体が存在している。テロメアは、特殊な繰り返し配列からなるテロメアDNAとそれに結合する様々な蛋白質群からなる。テロメアの機能として、染色体末端の保護、テロメアDNA長調節、減数分裂期の正常な進行がこれまでに明らかにされている。特に、細胞老化とテロメアDNA長との関係については、多くの研究者が関心を寄せている。しかし、テロメアのM期における制御や機能については、ほとんど明らかにされていない。

一方、M期における核膜の制御は、生物種によって大きく異なる。多くの菌類は、細胞周期を通じて核膜が維持されるclosed mitosisを行う。それに対して、多くの動物・植物細胞は、M期に一旦核膜が崩壊するopen mitosisを行う。さらに、部分的に核膜が崩壊するsemi-open mitosisを行う生物も存在する。各タイプのmitosisに特異的な制御メカニズムについては、まだ不明な点が多く残されている。また、生物がなぜ明らかに異なる核膜制御メカニズムを獲得したのかについても謎に包まれたままである。そこで本研究では、closed mitosisを行う分裂酵母においてM期のテロメア機能を探ることにより、closed mitosis特異的な制御メカニズムを明らかにすることを目指した。

2. 方法および結果

分裂酵母のテロメアDNAには、Taz1 タンパク質(哺乳類のTRF1, TRF2のホモログ)が直接結合し、Taz1と相互作用することによってRap1タンパク質がテロメアヘリクルートされる。Rap1は他の様々なタンパク質と相互作用することによって、様々なテロメア機能を遂行している。このことから、Rap1はテロメア機能の中核と考えられている。そこで、M期におけるテロメア機能を探るため、Rap1の制御について解析を行った。

まず、Rap1の細胞内局在を顕微鏡観察によって解析した。Rap1-GFPを発現させて観察したところ、驚いたことにRap1はM期特異的にテロメア局在がほとんど見られなくなった。このことから、Rap1はM期特異的な制御を受けることがわかった。

そこで次に、M期特異的なテロメア局在の減少がRap1タンパク質量の減少によるのかどうかをウエスタン解析によって調べた。同調細胞を用いて解析したところ、Rap1タンパク質量は細胞周期を通じてほとんど変化しないが、M期においてバンドシフトが観察された。そのバンドシフトはリン酸化によるものであることがわかった。これらのことから、Rap1はM期特異的にリン酸化されることがわかった。そこで、in vitro kinase assay、mobility shift assay (ウエスタン解析)、MASS解析などによってRap1のリン酸化部位を同定した。その結果、Rap1は少なくとも5つのアミノ酸においてリン酸化されることがわかった。

次に、Rap1のリン酸化の生理学的意義について調べた。Rap1は他の様々なタンパク質と相互作用することによって様々なテロメア機能に関与することから、Rap1のリン酸化がそれらとの相互作用に影響を及ぼすかどうか解析した。Rap1の5カ所のリン酸化部位をすべてアラニン（非リン酸化型）やグルタミン酸/アスパラギン酸（偽リン酸化型）に置換したRap1遺伝子を用いてtwo-hybrid assayを行ったところ、偽リン酸化変異によってRap1とBqt4との相互作用が部分的に抑制されていた。Bqt4は、核膜に局在するタンパク質であり、普段Rap1と相互作用することによってテロメアを核膜に局在させる役割を果たしている。これらのことから、Rap1はM期に高度にリン酸化され、それが核膜とテロメアの一時的な解離を誘導している可能性が考えられた。

そこで、実際にテロメアがM期に核膜から離れるのかについて顕微鏡観察によって解析した。テロメアの局在は、Taz1（細胞周期を通じてテロメアから離れない）の局在を観察することによって調べた。また、核膜の位置は、核膜タンパク質Ish1の局在を観察することによって調べた。細胞周期の様々なステージにある細胞におけるテロメアと核膜との距離を測定したところ、M期初期から終期にかけてテロメアが核膜から離れることがわかった。

次に、テロメアが核膜から離れることがM期進行に重要なのかどうか解析した。Taz1とBqt4を融合させたタンパク質を発現させることにより、強制的にテロメアを核膜に局在させて影響を調べた。Taz1-Bqt4融合タンパク質を発現させると、異常なM期（核分裂が完全に終了しない）が時々観察され、人工ミニ染色体の脱落頻度が上昇した。以上のことから、分裂酵母においてテロメアがM期に核膜から離れることは染色体安定性において重要であることが示唆された。

3. 考察

分裂酵母はM期に核膜が崩壊しないclosed mitosisを行う。Rap1のリン酸化によって、普段核膜に局在しているテロメアが核膜から離れ、それが染色体安定性に寄与することがわかった。テロメアと核膜の解離がなぜ染色体安定性に導かれるのかについては現在のところ不明である。テロメアだけでなく、染色体全体が核膜から離れることが、スムーズな染色体の動きに必要なのかもしれない。あるいは、姉妹染色分体間のテンションを認知して活性化されるスピンドルチェックポイントの制御に必要とされるのかもしれない。

Rap1はM期にテロメア局在が激減していることから、Taz1からも離れることが推測される。しかし、その解離メカニズムについては不明である。未同定のRap1リン酸化部位がTaz1との解離を誘導するのかもしれない。あるいは他のRap1の翻訳後修飾やTaz1の翻訳後修飾によって誘導されるのかもしれない。いずれにせよ、大部分のRap1が一時的にテロメアから離れている状態でのテロメア末端保護機能やテロメアDNA長制御がどうなっているのか興味深い。

今回はclosed mitosisにおけるテロメアと核膜との相互作用について解析を行ったが、open mitosisにおいてもテロメアと核膜との特殊な制御メカニズムがあるかどうか調べていきたいと考えている。哺乳類細胞においては、普段テロメアが核膜に局在していないようである。しかし、減数分裂期の一時期において、テロメアが核膜近傍に会合することが知られている。その後、テロメアが核膜から解離し、減数分裂第一分裂が起こると考えられている。従って、分裂期におけるテロメアの核膜からの解離という現象は、closed mitosi, open mitosi共通に見られることのようにある。染色体や核膜の異常は、染色体病や核膜病をもたらす、我々の健康に深刻な被害をもたらすことが知られている。本研究の成果がそれらの疾患の発症メカニズムの解明に寄与することが期待される。

5. 発表論文、参考文献

Chen, Y., Rai, R., Zhou, Z-R., Kanoh, J., Ribeyre, C., Yang, Y., Zheng, H., Damay, P., Wang, F., Tsujii, H., Hiraoka, Y., Shore, D., Hu, H-Y., Chang, S. and Lei, M. A conserved motif within RAP1 plays diversified roles in telomere protection and regulation in different organisms. *Nature Struct. Mol. Biol.*, in press.