

染色体維持機構の変異動物細胞株の表現型を評価するアッセイ系の樹立

●武田俊一

京都大学医学研究科放射線遺伝学

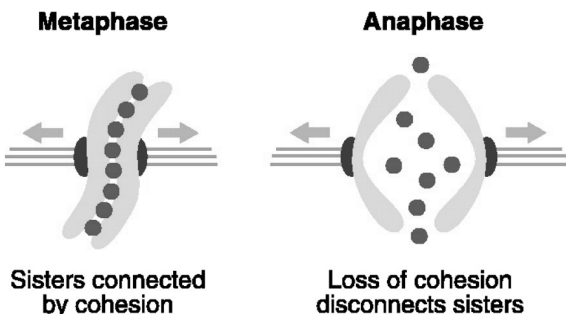
〈研究の目的と進め方〉

遺伝学的解析でもっとも重要なことは、表現型のアッセイ系である。本研究の目的は、標的組み換え効率のよいニワトリBリンパ細胞株DT40を使って、染色体の複製、分配、構造維持機構の分野での、表現型アッセイ系を樹立することである。そして新しく樹立したアッセイ方法を使って様々な遺伝子破壊株を解析し、そのアッセイ方法による実験結果が自分の調べたい現象を正確に反映しているか否かを検証することである。

〈研究開始時の研究計画〉

- (i) 野生型と各変異クローンとで、全タンパク発現パターンを2次元タンパク泳動で比較する。
- (ii) 固定した細胞標本および生きた細胞で染色体の分裂周期の各フェーズ毎の染色体の動態を観察できるように、酵母で樹立されたアッセイ系をDT40でも試みる。
- (ii) の目標の達成を、我々は、コヒーシコンディショナル破壊株の表現型解析のなかで成し遂げることを計画した。

図1 コヒーシン(紅い点で図示)がM期中期(metaphase)まで2本の姉妹染色分体を繋ぎとめ、その破壊がM期後期(anaphase)に移行させる。



コヒーシンは複数種類の分子からなるコンプレックスである。コンプレックスのなかでScc1と呼ばれる分子は、酵母からヒトまで保存され、その破壊がM期中期→後期移行に必須であることがわかっている。我々は、コヒーシンが姉妹染色分体間での相同組み換えにも必須であろうという作業仮説を立て、それを証明するために、DT40からScc1破壊株を作製した。ただしScc1は、M期の完了に必須であるので、我々は培地にテトラサイクリンを加えた時だけ、細胞のなかのScc1トランスジーン発現がOFFになるシステムを導入したDT40細胞でScc1遺伝子破壊をおこなった。

Scc1発現OFFの状態、染色体の動態を観察するために、我々は以下の4種類の実験法をDT40用に開発した：

- (1) Ovalbumin遺伝子プローブを使ったin situ hybridization
- (2) 原子間力顕微鏡を使ったM期染色体の構造解析(新大、医、解剖、牛木教授との共同研究)
- (3) CENP-H遺伝子座にGFPをノックインして、動現体を可視化する(遺伝研、深川博士よりノックインプラスミ

ドを譲渡された) (図2 水色の点)

(4) Scc1-GFP遺伝子によるコヒーシンの可視化(図3 M期染色体の緑で染まった部位)

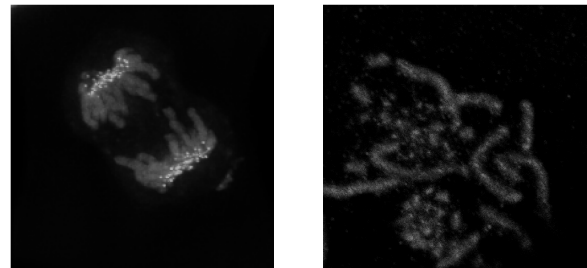


図2

図3

- (i) 2次元タンパク泳動での比較はできなかった。
- (ii) 共同研究によって、当初予定したよりも多種類の、染色体動態を可視化するアッセイ法が樹立できた。

〈国内外での成果の位置づけ〉

(ii)については、研究成果を高く評価され、一流誌に論文発表できた(論文リスト1)。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

(i)については、2005年に『TAP tagなどによるタンパクの共免疫沈降→電気泳動による沈降分子の比較→質量分析によるタンパクの同定』の一連の実験がCancer UK, London Lab.との共同研究によりできるようになった。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Sonoda, E., Matsusaka, T., Morrison, C., Vagnarelli, P., Hoshi, O., Ushiki, T., Nojima, K., Fukagawa, T., Waizenegger, I. C., Peters, J.-M., Earnshaw, W. C., and Takeda, S.: Scc1/Rad21/Mcd1 is required for sister chromatid cohesion and kinetochore function in vertebrate cells, *Developmental Cell*, 1, 759-770 (2001)
2. P. Vagnarelli, C. Morrison, H. Dodson, E. Sonoda, S. Takeda, and W. C. Earnshaw: Analysis of Scc1-deficient cells defines a key metaphase role of vertebrate cohesin in linking sister kinetochores, *EMBO Report*, 5(2), 167-71 (2004)

〈今後の課題〉

(i)の方法によるDT40特異的な新規分子のスクリーニング。