

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06943

研究課題名(和文) 減数分裂期染色体の対合機構と非対合サイレンシング機構の関係解明

研究課題名(英文) Differences and similarities between homologous pairing and unpaired silencing of chromosomes during meiosis

研究代表者

田原 浩昭 (Tabara, Hiroaki)

筑波大学・医学医療系・研究員

研究者番号：90362524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000 円

研究成果の概要(和文)： 減数分裂は動植物の遺伝情報を次世代へ伝達する配偶子を形成する重要な過程である。第一減数分裂期において、相同なパートナーを持つ殆どの染色体は相同対合を行う。残りの非対合染色体は、非対合サイレンシングによってヘテロクロマチン化される。筆者は、線虫 *C. elegans* を用いて減数分裂期染色体について研究を行い、相同対合、非対合サイレンシングそして RNAi の機構はお互いに部分的にオーバーラップしていることを見いだした。

研究成果の概要(英文)： During meiosis, most chromosomes have homologous partners and undergo homologous pairing mediated by the synaptonemal complex. In some organisms, the remaining unpaired chromosomes are heterochromatinized by unpaired silencing. Using the nematode *C. elegans*, we analyzed the differences and similarities of regulation of paired and unpaired chromosomes during meiosis.

We found that a cohesin containing COH-3/4 is involved not only in homolog pairing but also in unpaired silencing. In addition, CEC-5 possessing a chromodomain acts as a heterochromatin-specific factor in unpaired silencing. Heterochromatinization of unpaired chromosome is known to be abnormal in some RNAi mutants, such as the *csr-1* mutant that corresponds to an Argonaute protein bearing an RNA cleavage activity. A defect in homologous pairing was also observed in the *csr-1* mutant. Thus, mechanisms of RNAi, meiotic silencing and homologous pairing appear to overlap partially with each other in this organism.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：減数分裂 相同対合 非対合サイレンシング

1. 研究開始当初の背景

(1) 減数分裂は、遺伝情報を次世代へ伝達するための一倍体の配偶子を産生するための特殊な細胞分裂サイクルである。減数分裂期における遺伝子組み換えと配偶子間の受精による二倍体ゲノムの再構築は、ゲノムを多様化し、環境に対応するための柔軟性を生物集団へ与える。

減数分裂におけるステージは、減数分裂 S 期、レプトテン、ザイゴテン、パキテン、ディプロテン、ディアクinesisからなる第一分裂、そして第二分裂に分類される。減数分裂 S 期において、染色体は DNA 複製を行い接着された姉妹染色分体のセット（相同染色体）を形成する。パキテン期には、シナプトネマ構造が相同染色体同士を対合して、遺伝的組換えに必要な交叉の形成を促進し、後のステージにおいて正確な分離ができるように染色体の配置を調節する。染色体は、第一減数分裂後期における分離と第二減数分裂における分離を経て 1 倍体の状態へ変化する。

(2) 第一減数分裂において、重要かつおそらく最も不思議な現象は相同染色体の対合である。相同染色体の対合の開始は、二本鎖切断によって生じた DNA 間の相互作用、セントロメアやペリセントロメア・ヘテロクロマチン間の相互作用、テロメア間の相互作用、ペアリングセンター領域における蛋白を介した相互作用を含む、生物種に依存する機構に依存していると考えられる。

(3) 線虫では、反復配列によって構成されているペアリングセンターが染色体の末端に存在している。ザイゴテン期に、ジンクフィンガーを持つ HIM-8 や他の ZIM 蛋白がペアリングセンターに結合し、相同対合のための開始点として働く。線虫ではペアリングセンターにおける対合の開始後に、相同染色体の殆どの他領域の対合がシナプトネマ複合体によってパキテン期に確立される。真核生物においては、シナプトネマ複合体の典型的形状は、2 つのラテラル因子が一つのセントラル領域を挟む形の線路状構造である。出芽酵母、マウス、アラビドプシスでは、二本鎖切断がシナプス形成に必要であり、切断で生じた DNA 末端の一本鎖領域がもう片方の相同染色体の同一領域を認識するのではないかと考えられている。対照的に、線虫やハエでは、二本鎖切断はシナプス形成に必要でなく、DNA に依存しない未知の相同認識機構が存在することを示唆している。このように、後者の生物においては、相同染色体の殆どの領域の対合を担うシナプトネマ複合体の形成の過程で、如何にして相同な配列が認識されるのか不明である。

(4) 加えて注目すべき点は、全ての染色体が減数分裂期に相同ペアリングを行うわけではないことである。哺乳類のオスの精巣におい

ては、偽常染色体領域を除く殆どの X 染色体領域は非対合状態である。同様な状態は、性決定が X 染色体の数によって制御されている線虫 *C. elegans* においても観察される。*C. elegans* では、XX は自家受精で増殖する雌雄同体の遺伝型であり、XO は非対合の X 染色体を持つオスの遺伝型である。フリー型の重複染色体や人為的に導入された染色体外トランスジーンも、減数分裂期に非対合である。これらの性染色体や重複やトランスジーンは転写レベルのサイレンシングを受けることが、カビや線虫やマウスで確認されている。この現象は、**meiotic silencing of unpaired DNA (MSUD)** と呼ばれており、ここでは非対合サイレンシングと記すことにする。非対合サイレンシングは幾つかの生理学的役割を持つと推測されている。第 1 に、減数分裂期における性染色体の発現調節に関与している。第 2 に、異数性の配偶子の異常形成の阻害に関与している可能性がある。第 3 に、トランスポゾンや DNA 型ウイルスのような外来性 DNA に対する防御として機能している可能性も推測されている。

2. 研究の目的

(1) 線虫やハエ等の生物では、減数分裂期の染色体の相同対合におけるシナプトネマ複合体の形成の過程で、如何にして相同な配列が認識されるのか不明である。そこで、減数分裂期染色体の対合における相同性認識の機構の解明を目指した。

(2) カビや線虫では、減数分裂期染色体の非対合サイレンシングの調節に、RNAi 関連の蛋白因子が関与していることが知られている。しかしながら、どのような RNA が非対合サイレンシングの調節に関与しているのかは不明である。そこで、非対合サイレンシングに関与する RNA 分子種を探索することにした。

(3) 減数分裂期に非対合の染色体は、線虫の場合にはヒストン H3 の K9 ジメチル化 (H3K9me2) に富んだ条件的ヘテロクロマンを形成することが知られている。しかしながら、その条件的ヘテロクロマンの詳しい組成は明らかではない。非対合サイレンシングによって形成されるヘテロクロマンの主要構成蛋白を同定することにした。

3. 研究の方法

(1) モデル生物として用いた線虫の系統

野生型の線虫系統としては Bristol N2 を用いた。研究に使用した主な変異体系統は以下の通りである。ZT3: *csr-1(fj54) IV /nT1[qIs51]*. WM153: *C04F12.1(tm1637) I*. ZT26: *C04F12.1(tm1637) I; csr-1(fj54) IV /nT1*. TY5120: *coh-4(tm1857) coh-3(gk112) V/nT1[qIs51]*. FX17002: *cec-5(tm6207) IV*. ZT33: *cec-8(fj63) III*. ZT34: *cec-8(fj63) III*.

cec-4(ok3124) cec-5(fj58) IV.

tm 変異は三谷グループ (National BioResource Project) によって単離された。*ok* 変異は Barstead グループ (*C. elegans* Gene Knockout Project) によって単離された。*csr-1* 遺伝子の変異は筆者が以前の研究 (Aoki *et al.* 2007) で単離したものであり、*cec* 遺伝子の *fj* 欠失変異は CRISPR/Cas9 システムでのゲノム編集によって本研究で新たに作製されたものである。一部の変異体は Caenorhabditis Genetics Center を介して入手した。

又、エピトープタグを付加した RNAi 関連蛋白を発現する、以下の安定型形質転換体を作製した。
ZT22: *csr-1(fj54) IV ; fjSi1[2xFLAG::csr-1] II.* ZT24: *C04F12.1(tm1637) I ; fjSi3[HA_2xFLAG::C04F12.1] II.*

(2) 抗体作製と抗体染色

本研究に用いた線虫蛋白に対する一次抗体の多くは、以下の通りにして自作した。CSR-1, COH-3/4, SYP-1, CEC-5 の部分配列をリコンビナント蛋白として大腸菌で発現させ、それらを抗原としてウサギもしくはモルモットへ投与しポリクローナル抗体を作製した。これら全てのポリクローナル抗体は抗原蛋白を用いてアフィニティ精製された。ヒストン H3 の K9 ジメチル化を認識するマウスのモノクローナル抗体は、蛍光抗体染色には MAB10307 (MBL) そして免疫沈降には ab1220 (Abcam) が用いられた。

免疫組織染色のための固定は、Tabara *et al.* (1996) における条件と類似した方法で行った。ポリマーコートされた PBS 中で生殖巣を切り出し、カバーガラスを被せて生殖巣をスライドガラスへ密着させた状態でドライアイスによる凍結処理を行った。カバーガラスの除去の後に、スライドガラスを -20℃ のメタノールへ移すことによって、線虫組織を前固定した。引き続いてホルマリン溶液へ段階的に置換することによって、組織を更に固定した。その後、溶液をエタノールへ段階的に置換し、スライドガラスを -20℃ で保存した。染色実験に際してスライドガラスは水溶液に戻し、穏やかな抗原賦活化処理の後に蛍光抗体染色に用いられた。

(3) 染色体 FISH

染色体 DNA の蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) による解析のための固定は、抗体染色に用いた方法で行った。固定後の生殖巣は、透過性向上のために低濃度の Proteinase K で処理され、引き続いて内在性 RNA の除去のために RNase A で処理された。ホルマリン溶液による再固定の後、V 番染色体の右腕および X 染色体の右腕に対して作製した DNA プローブを用いたハイブリダイゼーションを行うことによって、生殖巣の染色体を解析した。

(4) クロマチン免疫沈降

成虫期の線虫集団は、ショ糖浮遊法によって精製され、表皮を弱めるために DTT 溶液で処理され、リン酸緩衝液によって洗浄された。次に、線虫集団はホルマリン溶液中で穏やかなホモジェナイズ処理によって破碎され、引き続いて同じ溶液中で 15 分間固定された。低速遠心でのリン酸緩衝液による洗浄の後、虫の破碎物は超音波処理された。高速遠心処理の後に回収された可溶性画分を、粗クロマチン画分として以降の実験に用いた。

CSR-1, COH-3/4 そして H3K9me2 の染色体上の位置を解析する ChIP-seq 実験のために、目的とする蛋白やヒストン修飾に対する抗体でクロマチン複合体を免疫沈降した。それらのクロマチン複合体から回収された DNA は、PCR で増幅され、大規模並列シーケンサー (SOLiD) で配列解析された。

又、非対合サイレンシングによって形成されるヘテロクロマチンの構成蛋白を同定するために、ヘテロクロマチン領域に多い H3K9me2 に対する抗体で免疫沈降したクロマチン複合体を、LC/MS-MS 装置による質量分析によって解析した。

(5) 情報生物学的解析

大規模並列シーケンサーによって得られた配列情報は、テキスト形式への変換の後、エラーが多い配列の除去およびアダプター配列の切り落としのために自作の Perl プログラムでフィルター処理された。その後、配列情報データはショートリード・アラインメントツールで線虫ゲノムへマッピングされた。

ChIP-seq 実験の解析においては、配列情報データのマッピング後に ChIP シグナルのピークコーリングを行い、COH-3/4, CSR-1, H3K9me2 の ChIP ピークの間で共通するものを選択し、共通領域を中心とする 300bp の配列を収集してモチーフ解析を行った。

4. 研究成果

(1) RNAi に関連する 2 つの Argonaute 蛋白による非対合サイレンシングの調節

野生型のオス精巣では非対合サイレンシングを受けて凝集した X 染色体が H3K9me2 に対する抗体で検出されるが、RNAi に関連する *csr-1* 変異体のオス精巣においては複数の染色体で H3K9me2 シグナルが検出されることが報告されている。

筆者は、*csr-1* に系統的に類似した遺伝子である *C04F12.1* の変異体の表現型を調べた結果、非対合サイレンシングを受ける X 染色体の凝集度が下がっていることに気付いた。更に二重変異体を作製してオス精巣を解析してみたところ、複数の染色体で H3K9me2 シグナルが検出されるという異常が、*csr-1 ; C04F12.1* 二重変異体では単独変異体よりも強く観察された。これらの結果は、非対合サ

イレレンシングの初期段階におけるヘテロクロマチン化の場所の規定に、CSR-1 と CO4F12.1 が部分的に機能重複して関与していることを示唆していると考えた。

(2) クロモドメイン蛋白である CEC-5 は非対合染色体に多く存在する

減数分裂期の非対合サイレンシングによって形成されるヘテロクロマチンの性質は、ヒストン H3 のメチル化の存在以外はあまり良く理解されていない。非対合 DNA が形成する条件的ヘテロクロマチンの構成因子を同定するために、非対合 X 染色体を持つオスの多い線虫集団から、H3K9me2 に富むクロマチン複合体を免疫沈降し、構成蛋白を質量分析で解析した。

その結果、ヘテロクロマチン画分にクロモドメインを持つ蛋白である CEC-5 を見つけた。クロモドメインは、リジン 9 がジメチルもしくはトリメチル化されたヒストン H3 に結合する構造であることが知られている。CEC-5 に対する抗体を作製して細胞内分布を調べてみたところ、オスの精巣ではヘテロクロマチン化された非対合 X 染色体に対応する H3K9me2 シグナルの染色部位に CEC-5 は多く存在し、その他の対合染色体に弱く存在することを確認した。同様に、フリー型染色体重複 *sDp2* を持つ系統の生殖巣において、CEC-5 は非対合の *sDp2* 上に強く検出された。

線虫には、CEC-5 と系統的に近いクロモドメイン蛋白として、CEC-4 と CEC-8 が存在している。最初にこれらの CEC 蛋白に対するシングル変異体を解析したが、オス精巣における H3K9me2 シグナルは正常であった。そこで、3 つのクロモドメイン蛋白をコードする遺伝子が機能重複しているのではないかと考え三重変異体を作製したところ、*cec-8; cec-4 cec-5* 三重変異体のオスの精巣における H3K9me2 シグナルは、通常よりも大きく減少していた。この結果は、クロモドメイン蛋白である CEC-5、CEC-4、CEC-8 は、ヘテロクロマチンの構成因子として、非対合サイレンシングにおいて重複的に機能していることを示唆している。

(3) COH-3/4 を含むコヒーシンも非対合サイレンシングに関与している

非対合サイレンシングに関与する更なる因子を同定するために、筆者は幾つかのクロマチン蛋白に対応する変異体を解析した。その結果、コヒーシン複合体のサブユニットの一部に対応する変異体のオス精巣では、非対合 X 染色体に対応する H3K9me2 シグナルが殆ど検出されないことに気づいた。

コヒーシンは、DNA 複製後の姉妹染色体の接着や染色体における境界形成そして減数分裂期のクロマチン構造制御に関わっていることが知られている。これらの複数の機能への対応のために、SMC-1 と SMC-3 のヘテロダイマーの ATPase ドメインへ異なるタイプの

kleisin が結合することによって、機能分化したコヒーシン複合体が形成されることが知られている。線虫は、REC-8 と COH-3/4 と呼ばれる 2 種類の減数分裂期特異的 kleisin を持っている。REC-8 は減数分裂期の姉妹染色体の接着に関与しているが、COH-3/4 の姉妹染色体の接着にはあまり重要でないと考えられている。筆者は、減数分裂特異的な kleisin に対応する変異体を解析し、*rec-8* 変異体のオス精巣では、条件的ヘテロクロマチンに対応する H3K9me2 シグナルがほぼ正常に検出されることを確認した。対照的に、*coh-3/4* 二重変異体のオス精巣では、条件的ヘテロクロマチンに対応する H3K9me2 シグナルが殆ど検出されないことに気づいた。

(4) COH-3/4 は非対合のみならず対合染色体にも存在する

次に、染色体の非対合サイレンシングに関連すると思われる COH-3/4 の細胞内分布を調べた。他グループの報告の一つでは、パキテン期において kleisin である COH-3/4 は対合染色体上に軸状に検出されている。筆者は、COH-3/4 に対する新たな抗体を作製し、非対合染色体を持つパキテン期の生殖巣を蛍光抗体染色した。精巣の核では、条件的ヘテロクロマチンを意味する H3K9me2 シグナルは DAPI で染色された非対合 X 染色体の広範囲の領域とオーバーラップしていた。対照的に、COH-3/4 シグナルは H3K9me2 シグナルよりも限定的であり、凝集した非対合 X 染色体の中央部位に検出された (図 1、a)。

加えて筆者は、雌雄同体のパキテン期核の対合染色体における COH-3/4 と SYP-1 の分布を二重染色で比較した。相同対合を担うシナプトネマ複合体の超構造は、2 つのラテラル因子が一つのセントラル領域を挟む形の線路状構造である。線虫では、コイルドコイル蛋白である SYP-1 と幾つかの他の SYP 蛋白がセントラル領域を形成している。筆者の顕微鏡観察では、COH-3/4 は相同染色体の対合領域に軸状構造として検出されるが、しばしば COH-3/4 シグナルはわずかに離れた 2 本の軸として検出された。二重染色実験では、COH-3/4 の軸状シグナルは SYP-1 の軸状シグナルの両脇に検出された (図 1、b)。以上の観察結果から、COH-3/4 はシナプトネマ複合体のラテラル因子の構成蛋白であろうと解釈した。

本研究で新たに非対合サイレンシングに関与することを見つけた因子の中で、CEC-5 は減数分裂期の非対合染色体に好んで局在するが、COH-3/4 は非対合染色体のみならず対合染色体にも存在する。筆者は、このような COH-3/4 の分布は非対合サイレンシングの機構が対合染色体における何らかの重要な調節と一部オーバーラップしていることを意味しているのではないかと考えた。非対合サイレンシングから離れて、次に筆者は *coh-3/4* 変異体における染色体対合の状態を調べた。

coh-3/4 二重変異体では、シナプトネマ複合体のセントラル領域を形成する SYP-1 の分布に異常が見られた。更に、染色体 FISH による解析によって、*coh-3/4* 二重変異体はペアリングセンター以外の染色体領域の対合に異常を示すことが分かった (図 1, c)。線虫の COH-3/4 は、哺乳類の減数分裂期特異的な kleisin である RAD21L と機能的に類似しているのではないかと筆者は考える。

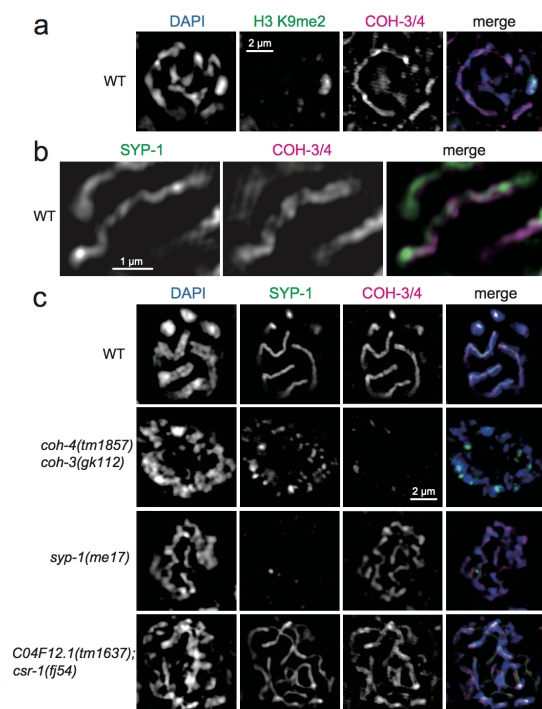


図 1. 減数分裂期染色体の蛍光抗体染色像。(a) 非対合 X 染色体を持つ野生型 (WT) オスの核を、H3K9me2 認識抗体、抗 COH-3/4 抗体で染色した。DAPI で DNA を対比染色してある。(b, c) 雌雄同体の核を、抗 SYP-1 抗体、抗 COH-3/4 抗体で染色した。(c)では野生型に加えて変異体の核も染色した。*coh-3/4* 二重変異体および *C04F12.1; csr-1* 二重変異体では、シナプトネマ複合体のセントラル領域を形成する SYP-1 の分布に異常が見られた。

(5) 非対合サイレンシングに関わる Argonaute の二重変異体も相同対合の異常を示す

COH-3/4 を含む減数分裂期コヒーシンは非対合サイレンシングのみならず染色体対合にも関与しており、Slicer 活性を持つ Argonaute 蛋白は RNAi に関与しているのみならず非対合サイレンシングも調節している。それ故、Slicer 型の Argonaute 蛋白に対応する二重変異体も何らかの染色体対合を示すのか、次に調べてみた。染色体 FISH による解析の結果、*C04F12.1; csr-1* 二重変異体もペアリングセンター以外の染色体領域の対合に異常を示すことが分かった。

(6) ChIP-seq 実験により示唆された CSR-1 と COH-3/4 のターゲットは反復配列である

相同対合と非対合サイレンシングに関連する CSR-1, COH-3/4 そして非対合サイレンシングのみに関連する H3K9me2 の分布の詳細を調べる目的で、筆者は以下の ChIP-seq (クロマチン沈降物中の DNA の並列シーケンシング)実験を次に行った。野生型の雌雄同体集団、非対合 X 染色体を持つオスの多い集団をホルマリン処理して、クロスリンク処理されたクロマチン画分を調製した。これらのサンプルから、CSR-1, COH-3/4, H3K9me2 に対する抗体でクロマチン免疫沈降を行い、共沈降したゲノム DNA を増幅して大規模並列シーケンサーによって解析した。そして、得られたデータから ChIP シグナルのピークを計算し、染色体上分布を比較した。

その結果、RNAi 因子である CSR-1 とコヒーシンの構成因子である COH-3/4 の染色体上の分布に類似性を観察した。H3K9me2 の ChIP ピークも CSR-1 やコヒーシン構成因子の ChIP ピークと一部の場所でオーバーラップしていたが、CSR-1 やコヒーシン構成因子よりも広範囲の染色体領域をカバーしていた。これらの CSR-1, COH-3/4, H3K9me2 の ChIP ピークは、蛋白遺伝子をコードする領域よりも反復配列領域に多いという傾向が見られた。

又、CSR-1, COH-3/4, H3K9me2 の染色体上の分布の間で、どのような配列が共通して見受けられるのか調べるために、共通して ChIP シグナルが見られる領域を集めてモチーフ解析を行った。COH-3/4, CSR-1, H3K9me2 の共通ターゲット配列の中で最も高頻度に検出されたものは、一種のミニサテライト反復配列であった。更に、CSR-1 と相互作用している小分子 RNA を解析したところ、CSR-1 はミニサテライト反復配列由来の小分子 RNA とも相互作用していることが分かった。

(7) まとめ

以上の研究結果から、モデル生物として用いた線虫の減数分裂においては、染色体の相同対合、非対合サイレンシングそして RNAi の機構はお互いに部分的にオーバーラップしていることを提唱した。他方で、SYP-1 は相同対合に特異的に用いられ、CEC-5 は非対合サイレンシングに特異的に用いられており、これらの特異的因子が減数分裂期染色体の状態の違いを生み出しているものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

- ① Tabara H, Mitani S, Kohara Y, Nagata K. Intracellular targets of Argonaute proteins controlling homologous pairing of meiotic chromosomes. 21th International *C. elegans* Conference. Los Angeles, USA: 2017.6.21-6/25

- ② 田原浩昭、三谷昌平、小原雄治、永田恭介：
線虫の減数分裂期における染色体の相同
対合と非対合サイレンシングは RNAi
によって調節されている、第 39 回日本分
子生物学会、横浜、2016.11/30-12/2

- ③ 田原浩昭、三谷昌平、小原雄治、永田恭介：
減数分裂期の非対合染色体サイレンシン
グにおけるヘテロクロマチン蛋白の同定、
BMB2015・第 38 回日本分子生物学会・
第 88 回日本生化学会合同大会、神戸、
2015.12/1-12/4

- ④ Tabara H, Mitani S, Mochizuki M,
Kohara Y, Nagata K. Homologous
pairing and unpaired silencing of
chromosomes are regulated by RNAi
during meiosis in *C. elegans*. 20th
International *C. elegans* Conference.
Los Angeles, USA: 2015.6.24-6/28

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田原 浩昭 (TABARA, Hiroaki)
筑波大学・医学医療系・研究員
研究者番号：90362524