

令和元年6月12日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07248

研究課題名(和文) LINC核膜複合体に依存した減数分裂期染色体の核内配置制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation and functions of meiotic chromosome positioning mediated by the LINC nuclear membrane protein complexes in fission yeast

研究代表者

山本 歩 (Yamamoto, Ayumu)

静岡大学・理学部・教授

研究者番号：70359082

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)：減数分裂は次世代の個体を生み出す精子や卵子などの配偶子形成に必須である。このとき分裂酵母では真核生物で保存されたLINC核膜複合体を介して染色体のテロメアとセントロメアの核内配置が大きく変化する。我々はテロメアがセントロメアの核内配置を制御し、この制御が染色体分配に必要な紡錘体と減数分裂で起こる核の融合に重要であることを見出した。また、減数分裂時のセントロメアの構造変化を評価する実験法を開発し、さらに相同染色体の紡錘体上の往復運動が染色体分配に重要であることを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

減数分裂における染色体の核内配置の制御は、様々な生物の核の細胞内配置制御や筋ジストロフィーに関与するLINC核膜複合体に依存する。LINC複合体による新たな染色体制御機構を明らかにした本成果は、減数分裂機構の理解だけでなく、他の生物のLINC複合体を介した生物現象や筋ジストロフィーの理解に寄与することが期待できる。また、本研究におけるセントロメアの構造や染色体の往復運動に関する知見は通常の細胞分裂の理解にも寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Meiosis is a type of cell division, which generates haploid gametes. During meiosis in fission yeast, positions of telomeres and centromeres dramatically change and the change depends on the LINC nuclear membrane protein complexes. We found that telomeres regulate centromere positioning and that this regulation is crucial for proper spindle formation during meiotic divisions and nuclear fusion during cell conjugation. We developed a novel method for evaluation of meiosis-specific centromere structure, whose proper formation depends on centromere detachment from the LINC complexes. Furthermore, we found that telomere-mediated chiasma formation causes coordinated oscillatory movements of homologous chromosomes and that this oscillation probably contributes to proper spindle attachment of chromosomes.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：減数分裂 テロメア セントロメア 相同染色体 姉妹染色分体 キネトコア スピンドル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核生物において保存された SUN および KASH ドメイン核膜タンパク質から構成される LINC 核膜複合体は、酵母・線虫・マウス・ヒト細胞など、様々な生物の減数分裂においてテロメアなどの特定染色体領域の集合に関与する。この LINC 複合体を介したテロメア集合は減数分裂における相同染色体の対合を促進する。分裂酵母では、減数分裂期にテロメアは酵母の中心体である Spindle Pole Body (SPB) 近傍に集合するが、減数分裂期のセントロメア構造制御やスピンドル形成の制御に関与することも報告されている。また、LINC 複合体は分裂酵母の体細胞分裂期におけるセントロメアの SPB 局在にも関与し、さらに減数分裂ではセントロメアが SPB から脱離することによって減数分裂型のセントロメアが形成されることが示唆されている。しかし、LINC 複合体による染色体制御機構の詳細は未解明である。さらに LINC 複合体は様々な生物の発生・分化における核の細胞内配置の制御にも関与するとともに、Emery-Dreyfuss 筋ジストロフィー症との関連も示唆されており、LINC 複合体の機能を理解することは医学的にも重要な課題となっている。

2. 研究の目的

分裂酵母ではテロメアが SPB 近傍に集合するとき、SPB に局在していたセントロメアは SPB から脱離する。テロメアとセントロメアの SPB 局在は、いずれも真核生物で保存された LINC 核膜複合体に依存しているが、それらの局在制御機構、および局在の機能の詳細は完全には解明されていない。本研究では、研究代表者が見いだしたテロメア集合とセントロメアの脱離の制御に関連に着目し、この制御関連の分子機構、および制御関連の減数分裂における役割を明らかにし、LINC 核膜複合体を介した染色体核内配置の制御機構および機能の解明をめざす。

3. 研究の方法

本研究では以下の点を明らかにし、LINC 核膜複合体によるテロメアとセントロメアの核内配置制御機構と核内配置の意義、およびテロメアとセントロメアの制御関連、制御関連の役割を解明することをめざす。

(1) テロメア集合とセントロメア脱離との関連

様々な方法でテロメア集合を阻害し、そのときのセントロメアや動原体因子の局在を解析する。これによりテロメア集合とセントロメアの SPB からの脱離、およびセントロメア脱離を引き起こす動原体崩壊との関係を明らかにする。

(2) Taz1 によるセントロメア脱離制御

テロメア結合因子である Taz1 を強制的に SPB に局在させ、さらに部分断片を作成してセントロメア制御に関わる領域を特定する。これによって、Taz1 によるセントロメア制御機構を分子レベルで明らかにする。

(3) テロメア集合とセントロメア脱離の制御関連の意義

テロメア集合欠損細胞ではセントロメアの SPB からの脱離が抑制されるが、このとき Taz1 を用いてセントロメア脱離させ、減数分裂への影響を解析する。これによってテロメアによるセントロメア脱離制御の役割を明らかにする。

(4) セントロメア脱離とセントロメア構造制御

セントロメアの SPB 脱離はセントロメア上の動原体の融合に必要であると考えられている。そこでテロメア集合欠損によってセントロメア脱離が抑制されたときの動原体融合を染色体分配によって解析する。また、動原体の融合を直接評価する実験系の構築を試みる。

(5) キアズマの機能解析

テロメア集合は相同染色体の対合を介してキアズマの形成を促進するが、このキアズマと染色体の動態および染色体分配との関係を解析し、染色体分配における核内配置の重要性を明らかにする。

4. 研究成果

(1) テロメア集合とセントロメア脱離との関連

テロメア集合には種々のテロメア構成因子 (Taz1, Rap1, Poz1) や LINC 核膜複合体とテロメアのリンカー因子である Bqt1、テロメアに形成される微小管形成中心であるテロセントロソームの形成に関わる Mto1 が必要である (図 1)。これら因子を欠損させ、テロメア集合を阻害したところ、セントロメアの SPB からの脱離が阻害され (図 3)、動原体の崩壊が阻害された (図 2)。また微小管形成阻害によるテロメア集合阻害でも同様の結果が得られた。このことはテロメア集合がセントロメアの脱離に必要なことを示している。

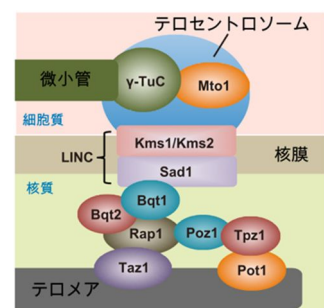


図 1. テロメア集合に関わる因子

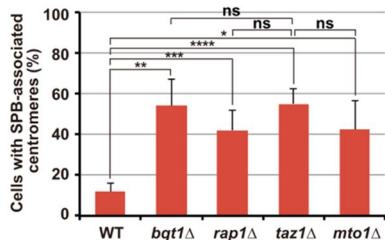


図2. 変異株における細胞接合時のセントロメアの局在 (*:有意差あり, ns:有意差なし)

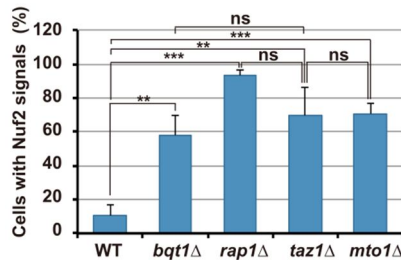


図3. 変異株における細胞接合時の動原体因子 Nuf2 の局在 (*:有意差あり, ns:有意差なし)

(2) Taz1 によるセントロメア脱離制御

Taz1 の DNA 結合ドメインを欠失させ LINC 複合体の構成成分である Sad1 と融合した融合タンパク質を作成した (図4, Taz1Δmyb-Sad1)。この融合タンパク質をテロメア集合欠損細胞に導入すると動原体

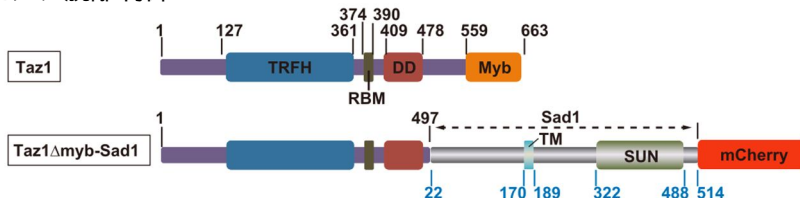


図4. Taz1 と Sad1 の融合タンパク質。数字はアミノ酸数。TRFH:TRF 相同ドメイン, DD:二量体ドメイン, SUN: SUN ドメイン

因子の遊離およびセントロメアの SPB からの脱離の回復が見られた。しかし、微小管阻害時にはこの回復が見られなかったため、セントロメア脱離は Taz1 と微小管に依存した2つの異なる経路で制御されていると考えられた。

(3) テロメア集合とセントロメア脱離の制御連関の意義

テロメア集合欠損細胞において Taz1 と Sad1 の融合タンパク質を発現させて SPB からセントロメアを脱離させたところ、SPB がスピンドル極から遊離する異常が見られた。また、接合時における核融合も顕著に阻害された。これらの結果からテロメア集合とセントロメア脱離の制御連関はスピンドル形成と核融合に重要な役割を果たすと考えられた (図5)。

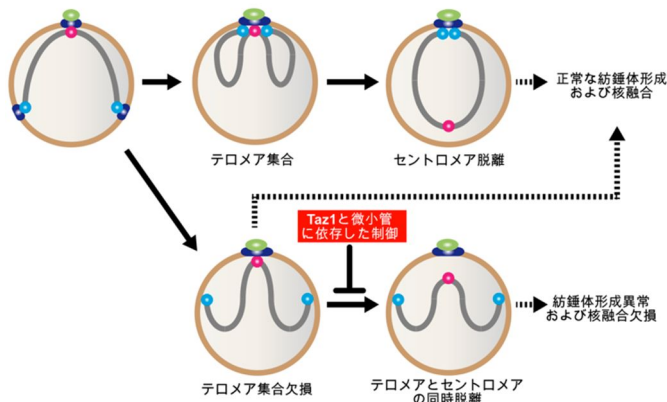


図5. テロメア集合とセントロメア脱離の制御連関

(4) セントロメア脱離とセントロメア構造制御

セントロメア脱離はセントロメア上の動原体の融合に関わることが示唆されている。そこでテロメア集合欠損変異株においてセントロメア脱離が阻害された時の染色体分配を解析し、動原体の構造への影響を解析した。染色体分配解析の結果、動原体融合に異常が生じていることを支持する結果が得られた。また、動原体の融合状態を直接評価する実験手法の開発を試みた。微小管を脱重合させて染色体を過凝縮させ、過凝縮染色体上の動原体を可視化することにより、動原体の融合状態を評価できることを見出した。

(5) キアズマの機能解析

テロメア集合によって形成されるキアズマの機能を、染色体の動態および染色体分配を解析し、検討した。その結果、相同染色体は紡錘体上を往復運動するが、キアズマはこの往復運動に同調性を生み出し、この同調した往復運動が染色体と紡錘体の正しい結合形成に寄与することを示唆する結果を見出した。

5. 主な発表論文等 [雑誌論文] (計2件)

Kazuhiro Katsumata, Eriko Nishi, Sadia Afrin, Kaoru Narusawa, and Ayumu Yamamoto. Position matters: multiple functions of LINC-dependent chromosome positioning during meiosis. *Current Genetics*. (2017) 査読有り, 63: 1037-1052. DOI: 10.1007/s00294-017-0699-2.

Kazuhiro Katsumata, Ami Hirayasu, Junpai Miyoshi, Eriko Nishi, Kento Ichikawa,

Kazuki Tateho, Airi Wakuda, Hirotada Matsuhara, and Ayumu Yamamoto. A Taz1- and microtubule-dependent regulatory relationship between telomere and centromere positions in bouquet formation secures proper meiotic divisions. *PLoS Genetics*. (2016) 査読有り, 12: e1006304. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006304.

〔学会発表〕(計 21 件)

山本 歩、「染色体上のキネトコア配置の制御機構」第 36 回染色体ワークショップ・第 17 回核ダイナミクス研究会、2019 年

南部 将志、「減数第一分裂における姉妹染色分体のキネトコアの融合にはセントロメアコアとキネトコアの結合が必要である」第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年

脇谷 美鈴、「キアズマに依存的な相同染色体の同調的な往復運動は減数分裂における染色体と紡錘体の結合修正に寄与する」第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年

南部 将志、「減数分裂型キネトコア形成にはセントロメアコアとキネトコアの結合が必要である」第 51 回酵母遺伝学フォーラム研究報告会、2018 年

脇谷 美鈴、「Dam1 による染色体の往復運動と染色体と紡錘体の結合修正」第 51 回酵母遺伝学フォーラム研究報告会、2018 年

山本 歩、「Chiasma function in meiotic chromosome segregation: a relationship between chromosome oscillation and correction of erroneous kinetochore-microtubule interaction」IPR International Seminar on “Genome stability and instability in mitotic and meiotic cells”、2018 年

脇谷 美鈴、「キアズマに依存した相同染色体のセントロメアの同調的な往復運動による染色体と紡錘体の結合修正」第 19 回静岡ライフサイエンスシンポジウム、2018 年

南部 将志、「減数分裂型コヒーシン因子 Rec8 と DNA 複製制御因子 Mrc1 は減数第一分裂型のキネトコアの形成制御に関与する」第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会、2017 年

西 絵里子、「キアズマによる染色体とスピンドルの結合主星と相同染色体のセントロメアの同調的な往復運動」第 40 回日本分子生物学会年会・第 90 回日本生化学会大会、2017 年

山本 歩、「減数分裂における染色体と紡錘体の結合制御機構」第 35 回染色体ワークショップ・第 16 回核ダイナミクス研究会、2017 年

西 絵里子、「キアズマによる染色体とスピンドルの結合制御機構の解明」第 50 回酵母遺伝学フォーラム研究報告会、2017 年

南部 将志、「減数分裂におけるキネトコア制御機構の解明」第 50 回酵母遺伝学フォーラム研究報告会、2017 年

南部 将志、「減数分裂型コヒーシン因子 Rec8 と DNA 複製制御因子 Mrc1 は減数分裂型キネトコア形成に関与する」第 69 回日本細胞生物学会大会、2017 年

山本 歩、「減数分裂におけるキアズマによる染色体とスピンドルの結合制御機構の解析」第 69 回日本細胞生物学会大会、2017 年

山本 歩、「Meiotic cohesin is required for sister kinetochore association at meiosis I」SMC proteins: Chromosomal Organizers from Bacteria to Human、2017 年

山本 歩、「Chiasmata causes destabilization of bipolar attachments of sister chromatids at meiosis I」The 9th International Fission Yeast Meeting、2017 年

南部 将志、「減数分裂時におけるキネトコア制御機構の解明」第 18 回静岡ライフサイエンスシンポジウム、2017 年

市川 研殉、「分裂酵母における減数分裂型キネトコアの解析手法の確立」第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年

西 絵里子、「減数分裂期の染色体と紡錘体の結合修正におけるキアズマの役割」、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年

市川 研殉、「減数分裂型キネトコアの解析手法の確立」、第 49 回酵母遺伝学フォーラム研究報告会、2016 年

⑳ 西 絵里子、「染色体とスピンドルの結合形成におけるキアズマの機能解析」、第 49 回酵母遺伝学フォーラム研究報告会、2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

(1) 山本研究室ホームページ

<https://sites.google.com/site/ayuyamamu/>

(2) 研究成果データベース

<https://tdb.shizuoka.ac.jp/RDB/public/Default2.aspx?id=11039&l=0&t=21>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：市川 研殉

ローマ字氏名：Kento Ichikawa

研究協力者氏名：西 絵里子

ローマ字氏名：Eriko Nishi

研究協力者氏名：南部 将志
ローマ字氏名：Masashi Nambu

研究協力者氏名：脇谷 美鈴
ローマ字氏名：Misuzu Wakiya

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。