

平成22年 4月27日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20870011

研究課題名（和文） 高等動物における新規の減数分裂特異的染色体分配因子の解析

研究課題名（英文） Study on novel meiosis specific factors for chromosome segregation

研究代表者 石黒 啓一郎（ISHIGURO KEI-ICHIRO）
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：30508114

研究成果の概要（和文）：マウス精巣からセントロメアタンパク質に対する抗体を用いた精製及び酵母2 hybrid 法を駆使して減数分裂期セントロメアタンパク質のスクリーニングを行った。その結果、生殖細胞特異的に発現する複数の新規タンパク質を同定するに至った。減数第一分裂の際に2つの姉妹動原体は束ねられて1つに融合した構造として振る舞うことが知られているが、これらの新規因子が還元分配に向けた動原体の構造変換に関与しているのではないかと推測された。

研究成果の概要（英文）：We have screened meiosis specific centromere factors from mouse germ cells using affinity purification and yeast two hybrid techniques. We identified novel kinetochore/chromosome proteins which are specifically expressed in germ cells. Those factors may play a role in changing kinetochore structure for faithful chromosome segregation in meiosis I where a pair of sister kinetochores are in close proximity for monopolar spindle-microtubule attachment.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：減数分裂、染色体分配、生殖細胞、動原体

1. 研究開始当初の背景
生殖細胞の減数分裂における染色体分配は、

相同染色体どうしの対合による二価染色体の形成と引続いて起こる連続した2回の染

染色体分離を経て行われ、体細胞に見られる均等分裂のそれと著しく異なる（図1）。体細胞分裂では、複製された姉妹染色分体は、その動原体部分で反対方向からのスピンドル微小管により引っ張られるのに対し、減数第一分裂では姉妹染色分体が同一極からのスピンドル微小管によって捕らえられ、対合していた父方と母方由来の相同染色体は反対方向へ分配されることになる（紡錘体微小管の一方方向性結合）。次いで減数第二分裂では体細胞分裂と同様の様式で姉妹染色分体の均等分裂が起きる。体細胞分裂と比較した場合、減数分裂では第一分裂に見られる還元型の染色体分配過程が余分に挿入されているだけで、ここにゲノムを半分にする減数分裂と体細胞分裂との本質的な違いがある。とりわけ減数第一分裂の際に2つの姉妹動原体はあたかも束ねられて1つに融合した構造として振る舞うことが知られている。これには減数分裂時にセントロメアを構成するタンパク質の違いが還元型分裂に向けた新たな動原体構造変換と紡錘体微小管の一方方向性結合を生み出すためであろうと推測されているが、その全貌は明らかとされていない。この2つの姉妹動原体を束ねる機構は、減数第一分裂時に紡錘体微小管の一方方向性結合を保障し相同染色体を分配する要となっている。もしこの機構が破綻した場合、相同染色体の分配エラーが生じる結果、正常とは異なる染色体数を持つ配偶子（卵・精子）が生じてしまう。加齢と卵子の染色体異常との関連においても減数第一分裂時における動原体構造の経年変化が指摘されている。とりわけ本研究分野では、減数第一分裂期の動原体構造を構成する新規因子の同定が長年の懸案とされていた。

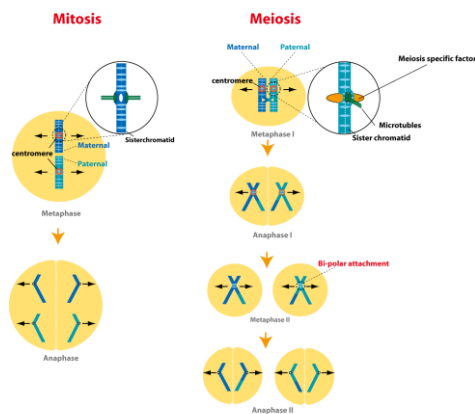


図1 減数分裂と体細胞分裂

2. 研究の目的

本研究では高等動物における減数分裂と体細胞分裂の染色体分配の素過程に違いを生み出すメカニズムの解明を目的とする。と

りわけ減数分裂特異的に染色体分配に寄与する新規の動原体因子の同定とその分子レベルの解析を試みた。さらに本研究ではこれらの因子の機能欠損マウスの解析を通して、減数分裂過程の染色体分配に及ぼす影響を検討した。これらの研究を通して減数第一分裂期の動原体構造および染色体構造を規定するメカニズムを明らかにしようと試みた。

3. 研究の方法

(1) affinity 精製と質量分析法による新規染色体タンパク質の同定

マウス精巣からセントロメアタンパク質 CENP-C に対する抗体を用いた affinity 精製と質量分析法により動原体を構成するタンパク質の同定を行った。

(2) 酵母 2 hybrid 法による新規染色体タンパク質の同定

別のアプローチとして CENP-C をベイトにした酵母 2 hybrid 法により、マウス精巣 cDNA ライブラリーから減数分裂期に特異的な CENP-C 相互作用因子の同定をおこなった。

(3) RT-PCR 法を用いた発現組織の特異性の検討

スクリーニングで得られた候補となる因子については、RT-PCR 法を用いて発現組織の特異性について検討し、生殖細胞に特異的な発現を示すものに焦点を絞った。特に精巣と卵巣においてのみ発現を示すものがないか検討を行った。

(4) 免疫蛍光染色法を用いた新規染色体因子の局在の検討

これらの因子に対する抗体を作製して、免疫蛍光染色法を用いて、生殖細胞の染色体における局在と発現時期について検討を行った。オス精巣より精原細胞を、また胎児期メス卵巣より減数分裂前期の卵原細胞を分取し染色体上の局在について検討を行った。

(5) 遺伝子欠損マウスの作製

in vivo におけるこれらの因子の機能解析を行うため、これらの因子の遺伝子欠損マウスの作製に着手した。まず Bruce4 ES 細胞株を用いて、これらの因子をコードする遺伝子を標的としたジーンターゲティングを行った。

4. 研究成果

(1) 生殖細胞特異的に発現する新規染色体タンパク質の同定

セントロメアタンパク質 CENP-C に対す

る抗体を用いた affinity 精製と酵母 2 hybrid 法を駆使して、減数分裂期セントロメアタンパク複合体の同定をおこなった。その結果、既知のキネトコア構成タンパク質(CCAN, Mis12 complex, Blinkin)に加えて、これまでに報告のない生殖細胞特異的に発現する新規因子 Mei-CENPC-AP1 および Mei-CENPC-AP2 を同定するに至った (図 2)。

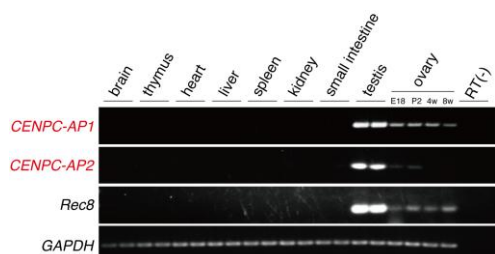


図2 新規 CENPC 会合因子の発現パターン

従ってこれらの因子は、減数分裂期において何らかの機能を果たしていると推測された。次に CENPC-AP1, CENPC-AP2 に対する抗体を作製し、免疫蛍光染色法により精原細胞におけるこれらの因子の局在について検討した。

(2) 動原体タンパク質 Mei-CENPC-AP1 の解析

免疫蛍光染色法による検討の結果、Mei-CENPC-AP1 タンパク質は、減数分裂の Pachytene 期から Metaphase I にかけて相同染色体の動原体に局在することが判明した。さらに精製 Mei-CENPC-AP1 タンパク質複合体の LC-MS/MS 解析による検討の結果から Mei-CENPC-AP1 と Polo like kinase1 (PLK1) との相互作用が示唆された。免疫蛍光染色法による検討の結果、PLK1 は Diplotene 期から Metaphase I にかけてキネトコアに局在すること、さらに CDK 阻害剤 Roscovitine を用いた解析からは、Cyclin dependent kinase (CDK) による Mei-CENPC-AP1 のリン酸化とそれを介しての PLK1 の結合が示唆された。減数第一分裂の際に 2 つの姉妹動原体は束ねられて 1 つに融合した構造として振る舞うことが知られているが、Mei-CENPC-AP1 タンパク質は PLK1 を引寄せ還元分配に向けた相同染色体のキネトコア構造変換に関与しているのではないかと推測された。

(3) Mei-CENPC-AP2 の解析

もう一つの新規因子 Mei-CENPC-AP2 は、精原細胞において減数分裂の leptotene 期から Metaphase I にかけて二価染色体の Axial element(AE)に局在することが判明した。なお、雌胎児期卵巣における卵原細胞の解析では leptotene 期から diplotene 期にかけて二

価染色体の AE に局在するが、GV 期以降の卵子においては局在が確認されなかった。減数分裂前期では AE 上に集合するシナプトネマ複合体が相同染色体の対合を促進することにより、二価染色体が形成される。

Mei-CENPC-AP2 の AE 上の局在パターンは、相同染色体の対合開始の時期とも符合する。したがって Mei-CENPC-AP2 は、この二価染色体形成の過程で、何らかの役割を果たしていることが示唆された。

(4) 生殖細胞特異的染色因子 Mei-CENPC-AP 欠損マウスの作製

本研究で見出された新規因子の生殖細胞での in vivo 解析を目指して、現在 Mei-CENPC-AP1 および 2 遺伝子の欠損マウスの作製に着手している。Mei-CENPC-AP1 のノックアウトマウス作製に関しては、PLK1 との結合に必要とされるアミノ酸配列部分をコードするエキソン 13 を標的とした mutant 型の allele を持つ ES 細胞の取得に成功したので、この ES 細胞クローンからノックアウトマウスの作製を開始した。また Mei-CENPC-AP2 のノックアウトマウス作製に関しては、NIH-Knock-out mouse project (NIH-KOMP) よりエキソン 2 を標的とした mutant 型の allele を持つ ES 細胞が入手できたので、この ES 細胞クローンからノックアウトマウスの作製を開始した。

(5) 今後の展望

減数分裂では、シナプトネマ複合体による相同染色体の対合過程、交差型組み換えによるキアズマ構造の形成、姉妹動原体の紡錘体微小管への一方向性結合など、体細胞分裂では見られない一連の染色体構造の変化が起きている。本研究で見出された新規染色体因子は、減数分裂に特有の染色体構造の変換において何らかの役割を果たしていることが示唆された。今後これらの遺伝子の欠損マウスの解析により、これらの染色体因子の機能について更なる検討を行う必要がある。

減数分裂時の染色体分配エラーによって生じる染色体数異常は早期流産やダウン症などの疾患をもたらすことが知られている。本研究課題では世界に先駆けて、減数分裂期の染色体に固有の機能を与えると目される新規因子の同定に成功した。本研究におけるその分子機構の解明は、今後基礎生物学のみならず生殖医療にも大いに資するものと思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

(1) Kawashima SA, Yamagishi Y, Honda T, Ishiguro KI, Watanabe Y. :
Phosphorylation of H2A by Bub1 Prevents Chromosomal Instability Through Localizing Shugoshin. Science. 327, 172-177 (2010) 査読有り

〔学会発表〕(計4件)

(1) 石黒啓一郎、南部あや、渡邊嘉典: 高等動物における減数分裂特異的な動原体因子の解析: 染色体ワークショップ 2010年1月20日(三島)

(2) 本田貴史、川島茂裕、山岸有哉、石黒啓一郎、渡邊嘉典: ヒト Bub1 はヒストン H2A のリン酸化を介してシュゴシンの局在位置を規定する: 染色体ワークショップ 2010年1月20日(三島)

(3) 石黒啓一郎、南部あや、渡邊嘉典: マウスの減数分裂特異的な動原体タンパク質の解析: 第32回日本分子生物学会年会ワークショップ 2009年12月12日(横浜)

(4) 石黒啓一郎、藤山紗理、南部あや、加藤茂明、渡邊嘉典: マウス減数分裂期における新規染色体因子の同定:
第32回日本分子生物学会年会 2008年12月11日(神戸)

〔図書〕(計1件)

(1) 石黒啓一郎 - 分担執筆: 分子細胞生物学辞典(第二版), 東京化学同人(2008)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石黒 啓一郎 (ISHIGURO KEI-ICHIRO)
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教
研究者番号: 30508114

(2) 研究分担者
無し ()

研究者番号:

(3) 連携研究者
無し ()

研究者番号: