

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：82636

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22370074

研究課題名(和文)減数分裂期染色体ブーケ形成とその生物学的機能の解析

研究課題名(英文)Functional analysis of chromosomal bouquet formation in meiosis.

研究代表者

近重 裕次(Chikashige, Yuji)

独立行政法人情報通信研究機構・未来ICT研究所バイオICT研究室・主任研究員

研究者番号：60359081

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：減数分裂前期、染色体のブーケ配置(中心体近傍に染色体末端が集合する現象)が広く観察される。分裂酵母のブーケ欠損変異体では、相同染色体の対合、紡錘系形成、染色体分配などが異常となる。本研究課題では、ブーケ欠損変異にみられる紡錘系形成異常は、ブーケ形成そのものではなく、中心体の核膜からの乖離が原因であり、逆に、ブーケ形成が不全であっても、核膜上、中心体が正常に位置していれば、正常な双極紡錘系を形成可能であることを明らかにした。加えて、そのような場合でも、染色体分配は異常となることから、ブーケ欠損変異の染色体分配異常は、紡錘系形成異常とは、異なる機構に起因するものであることを示した。

研究成果の概要(英文)：The chromosomal bouquet arrangement, in which ends of chromosomes cluster near a centrosome, is widely observed at the meiotic prophase. Bouquet defective mutants of *Schizosaccharomyces pombe* show defects in pairing of homologous chromosomes, spindle formation, and segregation of chromosomes. In this research, it was demonstrated that such defects in meiotic spindle formation are caused by disengagement of centrosome from the nuclear envelope. That is, if the centrosome is normally located on the nuclear envelope even though the bouquet arrangement is aberrant, the normal bi-polar spindle can be formed. It was additionally shown that defects in chromosome segregation were not rescued in the bouquet mutants that form normal bi-polar spindle. These results suggest that the defects in chromosome segregation in bouquet mutants should be caused by different mechanism from that of defects in spindle formation.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：核構造

1. 研究開始当初の背景

多くの真核生物は、二倍体相と一倍体相を往来することで「命」をつないでいる。このうち、二倍体相から一倍体相へ、文字通り染色体を「減数」する際に行うのが減数分裂である。これは、一度の DNA 合成と二度の連続する核分裂によって達成される。減数分裂を特徴づけているのは、この連続する核分裂と、それに先だって行う相同染色体の交叉といつてよい。相同染色体間に生じる交叉は、結果として遺伝的多様性をもたらすとともに、直後の連続する二度の染色体分配を可能にしていると考えられている。

応募者らは、分裂酵母の減数分裂期染色体の観察から、それまで核膜上に散在していたテロメアが減数分裂の進行に伴って、スピンドル極体 (Spindle Pole Body, 菌類における中心体相当器官: 以後 SPB と略記) 近傍へクラスターを形成することを見出した (Chikashige et al., 1994 Science 264 :pp270-273)。減数分裂期のこのような中心体近傍へのテロメアのクラスター形成は bouquet 配置と呼ばれ減数分裂を行う生物種に広く保存された現象であることが明らかとなっている (Scherthan, 2001 Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2:pp621-627)。応募者らは、本研究課題申請時まで、分裂酵母の減数分裂期染色体の bouquet 配置形成に關与する遺伝子を 4 個同定していた。これら 4 個の *bqt* 遺伝子の破壊株は、程度に違いはあるが、いずれも bouquet 形成に欠損を示す。bouquet 配置が、減数分裂前期に観察されることから、従来、この染色体配置は、その直後に生じる相同染色体の対合 (に次ぐ交叉) にとって重要な意味を持つものと考えられてきた (Chikashige et al., 2006 Cell 125 pp59-69)。一方、こうした染色体動態にみられる欠損とともに、これら、bouquet 形成欠損株は、共通して、のちの核分裂時のスピンドル形成に欠損を示す (Tomita & Cooper 2007

Cell 130 pp113-126, Chikashige et al., 2009 J. Cell Biol 187 pp413-427) ことが、報告され、bouquet 配置が、従来考えられていたような相同染色体対合だけでなく、その後の核分裂過程にも直接關与する可能性が指摘されていた。

2. 研究の目的

本計画では、応募者らがこれまでに蓄積してきた、分裂酵母 bouquet 形成欠損変異株に加え、あらたに獲得をめざす關連変異体を用いた遺伝学的解析、および、蛍光顕微鏡を用いた細胞学的解析により、減数核分裂過程における、中心体、核膜、染色体動態への bouquet 形成の關与とその分子機構を明らかにすることを目的とする。具体的には、既存の bouquet 形成不全株でみとめられるスピンドル形成異常の原因を明らかにし、bouquet 形成が、相同染色体の対合・交叉にとどまらず、SPB からの微小管形成にいかんして關与するのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) bouquet 形成とスピンドル形成の關連を明らかにするために、bouquet 形成不全変異株の減数分裂過程における SPB、スピンドル、および核膜の動態を蛍光顕微鏡を用いて連続的に観察する。

(2) 新規 bouquet 形成およびその下流ではたらく因子を探索するために、既存の bouquet 形成不全変異と類似の表現型を示す新たな突然変異株の取得をめざす。

これまでに得られた *bqt1-4* の破壊株は、いずれも減数分裂後、正常な 4 胞子を作る頻度が低く、1~3 個の異常な胞子数を示す割合が高い。従って生育可能な胞子の割合も低下しているが、この内、2 胞子を形成した場合には、各々が二倍体の細胞として生育可能であることが分かっている。すなわち、このような bouquet 欠損変異では、比較的高頻度に生育可能な二倍体の胞子を

産生するという形質が期待される。一方、野生型の減数分裂においては、生育可能な二倍体胞子は、殆ど出現しないことから、生育可能な二倍体胞子を産生する変異体の中に bouquet 変異体が十分に濃縮されていることが期待される。そこで、生育可能な二倍体胞子を産生するという指標による変異体のスクリーニングを行う。

4. 研究成果

(1) 染色体ブーケ (以下ブーケと略気) 形成とスピンドル形成の相関を明らかにするために、いくつかの関連変異体の減数分裂過程における SPB、およびスピンドルの動態を蛍光顕微鏡を用いて連続的に観察した。*bqt2* 単独破壊株では、すでに報告されている他のブーケ変異体と同様に、減数第一分裂において、スピンドル形成異常が観察された。正常な双極スピンドル (紡錘系の両端に SPB が存在) は、全体の約 40% で、残りは、単極スピンドル (紡錘系の片方の端にしか SPB が存在せず、紡錘系が V 字型を示す) となる場合と、無極スピンドル (紡錘系は、形成されるもののその両末端ともに SPB を欠く) となる場合とが、半数ずつみとめられた。さらに詳細な解析をすすめるために、SPB、スピンドルに加え核膜を同時に可視化し、それぞれの動態を観察したところ、*bqt2* 破壊株において、SPB の一部、または、全部が、分裂期進入時、核膜から乖離していることが判明した。その後、核膜から乖離した SPB からは、スピンドルは生じず、即ち、一部が乖離した場合には、残った SPB から単極のスピンドルが形成され、全部が乖離した場合には、無極のスピンドルが形成されることが明らかとなった。第一分裂で、核膜から乖離せずに単極スピンドルを形成した SPB は、第二分裂では、正常な双極スピンドルを形成した。これらの結果から、ブーケ変異で観察されたスピンドル形成異常は、核分裂進入時の SPB の核膜か

らの乖離によって引き起こされていることが示唆された。分裂酵母の減数分裂前期には、SPB とその近傍に核膜を隔ててクラスターするテロメアを先頭として核が細胞内を往復運動 (ホーステール核運動と呼ばれている) することが知られている。ブーケ欠損変異株では、テロメアが SPB 近傍へクラスターしないため、SPB は、核膜上にあつて、染色体を直接牽引せずに、細胞内を往復運動する。正常であれば、SPB は、核膜上にあつて、核の内側から染色体によって引き止められながら運動しているところ、ブーケ変異体では、核の内側からの染色体による引き止め作用がなくなるために、分裂期進入時点で、SPB の一部、または、全部の核膜からの乖離が生じているのではないかと考えられた。もしも、ブーケ変異体において、ホーステール核運動を停止、ないし、減却させたならば、スピンドル形成異常の原因である、SPB の核膜からの乖離が生じにくくなり、スピンドル形成異常が抑圧されるのではないかと考え、ブーケ変異体とホーステール核運動の低下する変異との二重変異体を作成しその表現型を調べた。分裂酵母 *Hrs1* (別名 *Mcp6*) は、減数分裂特異的な SPB 成分の一つで、その破壊株は、ブーケ形成は、正常であるが、ホーステール核運動が低下することが知られている (Tanaka et al. 2005 *Curr. Biol.* 15, 1479-1486, Saito et al. 2005 *J. Cell. Sci.* 118, 447-459)。*bqt2*, *hrs1*, 二重破壊株では、*bqt2* 単独破壊株と同様に、SPB-テロメアクラスター (ブーケ配置) は、不全のままであったが、第一分裂におけるスピンドル形成は、野生株、及び、*hrs1* 単独破壊株と同様に、観察した殆どの細胞で、正常に回復していた。同様の抑圧は、他のホーステール運動変異である *dhc1* 破壊株と *bqt2* との二重破壊株においても認められた。以上の結果から、ブーケ欠損変異にみられるスピンドル形成異常は、ブーケ形成そのものではなく、染色体による

核の内側からの SPB への作用を欠失したまま生じる SPB の運動によって、SPB が核膜から乖離することが原因であり、逆に、ブーケ形成が不全であったとしても、核膜上、正常に位置していれば、SPB は、正常な双極スピンドルを形成可能であることが判明した。

ブーケ変異株では、減数第一分裂におけるスピンドル形成異常とともに、染色体の不等分配、ないしは、脱落が観察される。次に本研究では、SPB、スピンドル、及び染色体(ヒストン)の可視化によってブーケ形成、スピンドル形成と染色体分配の関係を調べた。興味深いことに、ブーケ形成不全のまま、第一分裂のスピンドル形成異常が抑圧される *bqt2*, *hrs1* 二重破壊株では、正常な双極スピンドルが形成されるにも関わらず、*bqt2* 単独破壊と同様に、染色体の脱落や不等分配がみとめられた。従って、ブーケ変異体で観察される染色体分配以上は、スピンドル形成異常とは、異なる機構によって誘起されているものと考えられた。本研究課題によって、見出された、*bqt2*, *hrs1*, 二重破壊株の表現型は、スピンドル形成の関与を排除しつつ、ブーケ形成と染色体分配との関連を考察する上で、向後、重要な機会を提供するものと期待される。

(2) ブーケ形成、および、その後の減数分裂進行に関わる因子を探索する目的で、既知のブーケ変異体が示す二倍体の胞子を産生するという形質を指標に分裂酵母株の突然変異体のスクリーニングを行い、指標通りの表現型を示す変異体を 5 個単離した。このうち、2 個は、ブーケ形成欠損を示し、あとの 3 個は、ブーケ形成は正常であるものの、その後の減数核分裂過程に異常を示した。ブーケ形成に欠損を示す 2 個の変異の原因変異は、いずれも、既知のブーケ形成因子である *kms1*, *bqt3* であった。一方、後の 3 株の変異は、いずれも本来 2 回連続して起こるべき減数核分裂が、1 回しか生じず、その結果二倍

体の胞子を 2 個つくるという表現型を示すものであった。これら、3 変異体(B05, B07, B013 と呼ぶ)の原因遺伝子を特定するとともに、それぞれの表現型を詳細に検討した。この内、B05 変異の原因遺伝子は、栄養増殖に必須の遺伝子であったが、今回あらたに取得した変異株は、栄養増殖に欠損はみられず、その表現型は、減数分裂に特異的であった。B07 変異の原因遺伝子も、栄養増殖に必須の遺伝子であったが、こちらは、栄養増殖においても温度感受性を示した。残りのひとつは、未同定の遺伝子に変異をもっていた。今回のスクリーニングでは、新規のブーケ欠損変異体を取得することは出来なかったが、一方、本来 2 回連続して起こるべき減数核分裂が、1 回しか生じず、その結果二倍体の胞子を 2 個つくるという表現型を示す一群の変異体を取得することができた。これらの変異体では、減数分裂を特徴付ける「連続する核分裂」になんらかの異常が生じていること示しており、減数分裂における連続核分裂(M 期が連続することから一般に M-M 転移と呼ばれている)機構を解明する重要な手がかりとなる可能性を秘めている。同時に、こうした変異体を単離し得たということは、本研究課題で用いた「生育可能な二倍体胞子を産生する」という変異体スクリーニングの指標が、ブーケ変異のみならず、減数分裂進行制御に関わる遺伝子群を探索、同定するためにも有効であることを示唆している。

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 3 件)

Chikashige Y, Yamane M, Okamasa K, Mori C, Fukuta N, Matsuda A, Haraguchi T, Hiraoka Y. (2014)

Chromosomes rein back the spindle pole body during horsetail movement in fission yeast meiosis.

Cell Structure and Function, (in press)
URL:<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/csf> 査読有

Imori M, Ozaki K, Chikashige Y, Habu T, Hiraoka Y, Maki T, Hayashi I, Obuse C, Matsumoto T. (2012)

A mutation of the fission yeast EB1 overcomes negative regulation by phosphorylation and stabilizes microtubules.

Exp Cell Res., vol.318: pp262-275.

DOI:10.1016/j.yexcr.2011.11.006. 査読有

Chikashige Y, Haraguchi T, Hiraoka Y. (2010)

Nuclear envelope attachment is not necessary for telomere function in fission yeast.

Nucleus, vol.1: pp481-486.

DOI: 10.4161/nucl.1.6.13113 査読有

〔学会発表〕(計5件)

Chikashige Yuji

Progression of meiosis in Schizosaccharomyces pombe analyzed by live observation.

EMBO Conference on Meiosis 2013

2013年9月15日

Hotel Radisson Blu, ドレスデン、ドイツ

近重 裕次

減数分裂期ブーケ配置とスピンドル形成について

第35回日本分子生物学会年会

2012年12月12日

福岡国際会議場、マリンメッセ福岡、福岡、日本

Chikashige Yuji

Defects in meiotic spindle formation caused by failure in chromosomal bouquet arrangement.

第63回日本細胞生物学会大会

2011年6月27日

北海道大学、札幌、日本

Chikashige Yuji

Defects in meiotic spindle formation caused by failure in chromosomal bouquet arrangement.

International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities

2011年1月24日

Awaji Yumebutai International Conference Center, 淡路、日本

Chikashige Yuji

Four bouquet proteins required for the chromosomal bouquet arrangement in Schizosaccharomyces pombe.

第62回日本細胞生物学会大会

2010年5月28日

大阪国際会議場、大阪、日本

〔その他〕

ホームページ等

http://www2.nict.go.jp/advanced_ict/bio/w131103/CellMagic/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近重 裕次 (Chikashige Yuji)

独立行政法人情報通信研究機構・未来 ICT

研究所バイオ ICT 研究室・主任研究員

研究者番号：60359081