

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23247003

研究課題名(和文) non-coding RNAタンパク質複合体の相同染色体認識における役割の解明

研究課題名(英文) A role for noncoding RNA in recognition of homologous chromosomes

研究代表者

平岡 泰 (HIRAOKA, Yasushi)

大阪大学・生命機能研究科・教授

研究者番号：10359078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 37,300,000円、(間接経費) 11,190,000円

研究成果の概要(和文)：減数分裂は、真核生物に普遍的で重要なプロセスである。減数分裂においては、父母に由来する相同染色体の組換えが起こり、これが染色体の正常な分離に必須である。減数分裂で相同染色体が互いを認識する仕組みを理解するために、分裂酵母を用いて解析を行った。具体的には、染色体の特定の領域を選択的に蛍光染色した分裂酵母細胞株を用いて、相同染色体の対合過程を生細胞で連続的に追跡した。その結果、sme2 遺伝子領域で、相同染色体の対合頻度が上昇することを見いだした。さらに、sme2 遺伝子から転写された非コード RNA が染色体に蓄積することが、相同染色体の対合促進に必要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Meiosis is an essential process for sexually-reproducing organisms. During meiosis, homologous chromosomes pair with each other and undergo homologous recombination, which is crucial for proper segregation of chromosomes. In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, clustering of telomeres promotes homologous chromosome pairing. However, the mechanisms by which chromosomes recognize their homologous partners remain unclear. We demonstrate that the sme2 gene encodes a meiosis-specific noncoding RNA that mediates homologous recognition in *S. pombe*. The sme2 RNA transcripts accumulate at their respective gene loci, and greatly enhances pairing of homologous loci: deletion of the sme2 sequence eliminates this robust pairing while transposition to other chromosomal sites confers the robust pairing at those sites. Results indicate that RNA transcripts retained on the chromosome play a role in recognition of homologous chromosomes in *S. pombe*.

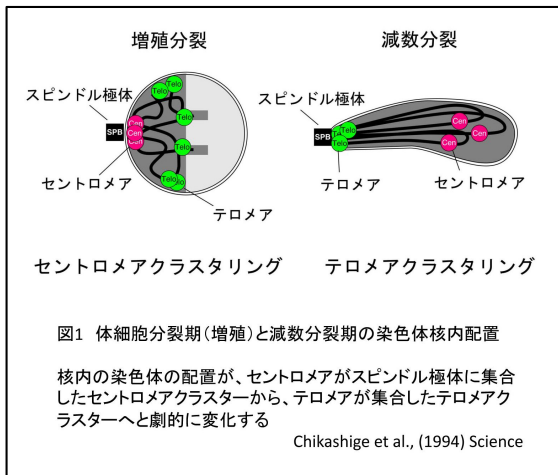
研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

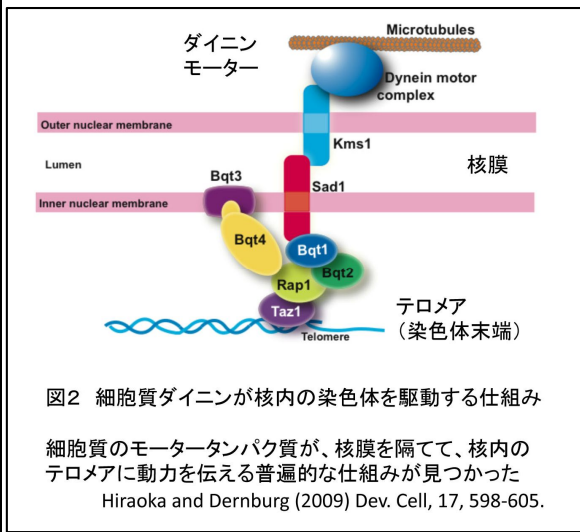
キーワード：染色体 非コードRNA

1. 研究開始当初の背景

減数分裂は、ヒトなどでは2倍体の体細胞から卵子や精子のような1倍体の配偶子を作る特殊な細胞分裂がそれに相当し、そこでの異常は不妊やダウン症などの異常につながるために、減数分裂の仕組みの解明は世代を越えたゲノムの継承のために重要な基礎研究課題となっている。染色体分配異常は分裂期に顕在化するが、異常につながる原因はすでに減数分裂の初期にDNA複製や相同染色体の対合・組換えの段階で作られていると予想される。しかし、ヒトやマウスなどの高等動物では、この過程は卵巣や精巣など体内で、かつ長い時間をかけて起こるために、その過程や分子機構を解明するのは困難である。一方、分裂酵母においては、通常は減数分裂に進行しない条件からでも、接合フェロモンシグナルを活性化するだけで、容易に減数分裂に誘導できる(Yamamoto et al., 2004; J. Cell Sci.). また、接合フェロモンの作用下でクロマチン構造が変化することも突きとめている(Asakawa et al., 2005; Ding et al., 2006; Asakawa and Hiraoka, 2009, Meth. Mol. Biol.). さらに、分裂酵母では、体細胞分裂から減数分裂に移行すると、細胞核内の染色体配置が、セントロメアクラスターからテロメアクラスターへと劇的に変化することが申請者らの研究を中心とした研究によって明らかになっており(図1; Chikashige et al, 1994, Science)、このような染色体の配置転



換は、細胞質のタンパク質モーターが核膜越しに核内の染色体を駆動することによって起こる(Chikashige et al, 2006, Cell; Chikashige et al, 2009, J. Cell Biol.). さらに、この仕組みは高等動物でも普遍的にみられ、発生過程での形態形成など広範な高次生命現象に関わることがわかっている(図2; Hiraoka and Dernburg, 2009, Dev. Cell)。おもしろいことに、このようなテロメアとセントロメアの配置転換は、相同染色体の組換えにも影響を与えることがわかっており、テロメアクラスターが形成されないと相同染色体の組換え頻度が低下し、胞子の



生存率が低下する(Ding et al., 2004, Dev. Cell; J. Cell Biol.; Ding et al., 2010, FEBS J.).

このような背景のなか、私たちは、基盤研究(A)「フェロモンに反応して作られる減数分裂期のクロマチン構造と染色体核内配置の解析」(H20-22)において、減数分裂を誘導した時に接合フェロモンの作用下で変動するタンパク質を、DNA マイクロアレイによる発現解析により、絞り込んである。さらに、予備的な実験から相同染色体の対合を促進するクロマチン構造の一つとして、non-coding RNAを含むタンパク質複合体をすでに見つけており、このRNAタンパク質複合体を足がかりに研究を進めることを計画した。

2. 研究の目的

減数分裂は、有性生殖を行う真核生物にとってゲノムを子孫に継承するための普遍的で重要なプロセスである。減数分裂においては、体細胞分裂とは異なり、父母に由来する相同染色体の組換えが起こる。相同染色体の組換えは、その後起こる染色体の正常な分離に必須の現象であるが、相同染色体がどのように相互を認識して対合するかについては未だわかっていない。本研究では、単細胞真核生物の分裂酵母を用いて、減数分裂特異的に形成されるクロマチン構造を解析する。特に、染色体上に形成される non-coding RNAとタンパク質の複合体に注目し、相同染色体が互いを認識する仕組みを解明することを目的とする。

相同染色体の対合・組換えは、正常な減数分裂に必須であるが、相同染色体の対合を保証するクロマチン構造については、その重要性にもかかわらず、包括的な理解は全くなされていない。そのため、この分子基盤の解明は、高等真核生物の減数分裂過程を理解する上でも重要な基盤研究となる。この過程は、ヒトを含めた真核生物に共通である可能性が高く、この分子基盤と分子機構の解明は、

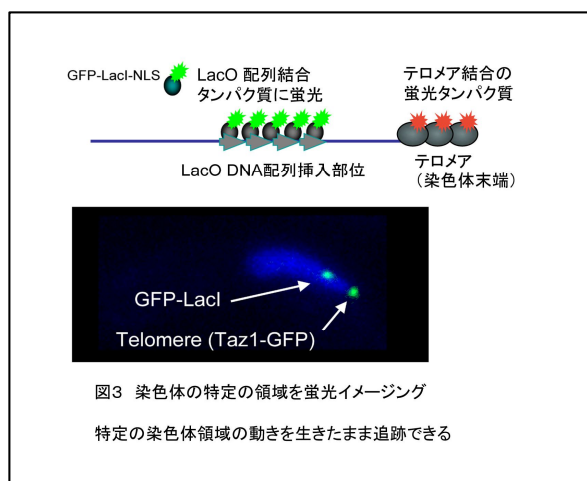
真核生物の減数分裂を理解するために重要である。その分子機構の解明は、真核生物の成り立ちを理解するという高い学術的な価値だけでなく、卵子や精子の形成過程の理解にも繋がり、不妊治療や育種にも役立つ基礎研究となると期待される。

3. 研究の方法

(1) 染色体の生細胞イメージング

相同染色体の対合過程を生細胞で連続観察するために、染色体の特定の領域を選択的に蛍光染色した株を用いる。そのために、染色体の狙った部位に、大腸菌 lac オペレーター配列 (lacO) を挿入しておき、lacO に特異的に結合する lac リプレッサー蛋白質の GFP 融合 (lacI-GFP) を発現させることによって蛍光染色する。その 1 例を図 3 に示す。これはテロメア近傍を染色した例であるが、染色体腕部のさまざまな部位に対して同様の方法で蛍光ラベルした細胞株を作製する。このような株を用いて、相同染色体が対合していく様子を生細胞で計測する。

(2) 相同染色体認識部位の生化学的解析
GFP 融合タンパク質のライブラリから核内ドット状局在を示す核タンパク質を選び、減数分裂期前期に *sme2* 遺伝子座に局在するものを顕微鏡観察により同定する。加えて、分子遺伝学・生化学の手法も取り入れ、酵母 three-hybrid 法により、分裂酵母の減数分裂期特異的 cDNA ライブラリから *meiRNA-L* 結合因子を検索する。また、*sme2* 遺伝子を栄養増殖期で多コピー強制発現し、免疫沈降法と質量分析を用いたプロテオミクスを行い、目的のタンパク質の同定を達成する。



(3) 染色体の超分解能イメージング

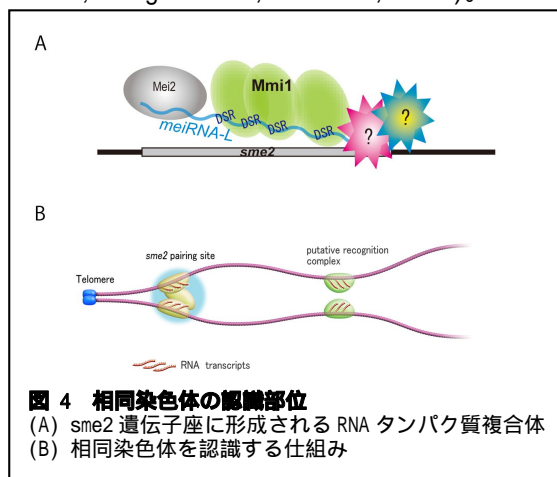
超分解能顕微鏡法として 3D-SIM (3 次元 Structured Illumination Microscope) を用い、染色体を蛍光染色した分裂酵母細胞を観察する。

4. 研究成果

(1) 相同染色体の対合過程の生細胞イメージング

染色体の特定領域が蛍光ラベルした分裂酵母の生細胞で減数分裂過程を観察した結果、第 2 染色体の *sme2* 遺伝子領域において高頻度で相同染色体が対合することを発見した (Ding et al., 2012, Science)。*sme2* 遺伝子領域を欠損させると対合の頻度が低下し、*sme2* 遺伝子領域を染色体の別の領域に移動させると、その領域の対合頻度が上昇した。さらに、*sme2* からは非コード RNA が合成され、これが *sme2* 遺伝子領域に蓄積されて、対合が起こることを明らかにした (Ding et al., Chromosome Research, 2013)。

染色体の特定の領域を選択的に蛍光染色した分裂酵母の細胞株を用いて、相同染色体の対合過程を生細胞で連続的に追跡した。その結果、第 2 染色体腕部の *sme2* 遺伝子領域で、相同染色体の対合頻度が上昇していることを見いだした。当該領域を破壊すると相同染色体の対合頻度が低下し、転座すると転座先の領域で対合頻度が上昇することから、*sme2* 遺伝子領域が相同染色体の対合を促進することが明確に示された。さらに、*sme2* 遺伝子から転写される non-coding RNA が染色体に蓄積することが、相同染色体の対合促進に必要なことがわかった。この結果は論文として報告した (Ding et al., Science, 2012; Ding et al., Nucleus, 2012)。



(2) 相同染色体認識部位の解析

これまでに同定した *sme2* 遺伝子領域以外に、相同染色体の対合を促進する領域があるか検索を行った。そのような領域の候補として、減数分裂期に特異的に発現する non-coding RNA を選択し、これらの候補となる RNA 遺伝子領域の近傍に lacO 配列を挿入して、その染色体領域を蛍光染色した細胞株を約 140 株作成した。これらの細胞株で、相同染色体の対合頻度を生細胞で計測することにより、その領域が *sme2* 遺伝子領域のように相同染色体の対合を促進するか調べたが、これまでのところ顕著な領域は見つ

っていない(未発表)。さらに、この実験を補完するために、GFP 融合タンパク質ライブラリを利用した *sme2* RNA 共局在因子の網羅的解析を行った。GFP 融合タンパク質のライブラリを検索すると、核内ドット状局在を示す核タンパク質が約 200 個ある。それらの候補タンパク質の減数分裂期の局在を検討し、減数分裂期前期に *sme2* 遺伝子座に局在するものを検索した結果、共局在を示すタンパク質をいくつか同定した(未発表)。これらのタンパク質をてがかりとして、タンパク質複合体を精製することが可能になった。

(3) 染色体の超分解能イメージング

分裂酵母の染色体繊維を高分解能でトレースできるように、超分解能顕微鏡法 3D-SIM の開発を行った。その結果、相同染色体をトレースできるようになった(図5)。この方法を用いて、相同染色体の対合に関わる遺伝子を同定するために、減数分裂期に障害を持つ各種の変異株で解析を行った(未発表)。

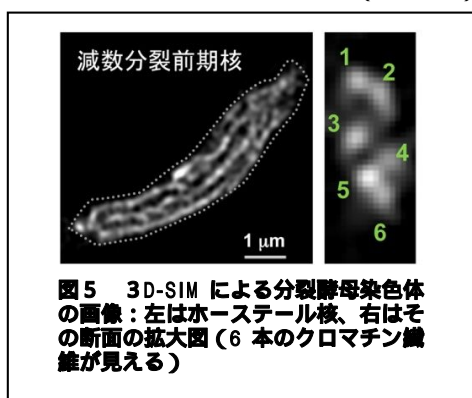


図5 3D-SIM による分裂酵母染色体の画像：左はホーステル核、右はその断面の拡大図(6本のクロマチン繊維が見える)

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 19 件)

Asakawa H, Yang H-J, Yamamoto TG, Ohtsuki C, Chikashige Y, Sakata-Sogawa K, Tokunaga M, Iwamoto M, Hiraoka Y, Haraguchi T. (2014) Characterization of nuclear pore complex components in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. **Nucleus**. 5. (in press) doi:10.4161/nucl.28487 (査読有)

Ding D-Q, Haraguchi T, Hiraoka Y. (2013) The role of chromosomal retention of noncoding RNA in meiosis. **Chromosome Res**, 21:665-672. doi:10.1007/s10577-013-9389-1(査読有)

Oya E, Kato H, Chikashige Y, Tsutsumi C, Hiraoka Y, Murakami Y. (2013) Mediator Directs Co-transcriptional Heterochromatin Assembly by RNA Interference-Dependent and -Independent Pathways. **PLoS Genet**, 9:e1003677. doi:10.1371/journal.pgen.1003677(査読有)

1003677(査読有)

Yoshida M, Katsuyama S, Tateho K, Nakamura H, Miyoshi J, Ohba T, Matsuhara H, Miki F, Okazaki K, Haraguchi T, Niwa O, Hiraoka Y, Yamamoto A. (2013) Microtubule-organizing center formation at telomeres induces meiotic telomere clustering. **J. Cell Biol**, 200: 385-395. doi: 10.1083/jcb.201207168 (査読有)

Ichikawa Y, Kagawa W, Saito K, Chikashige Y, Haraguchi T, Hiraoka Y, Kurumizaka H. (2013) Purification and characterization of the fission yeast telomere clustering factors, Bqt1 and Bqt2. **Protein Expr Purif**. 88: 207-213. doi: 10.1016/j.pep.2013.01.006. (査読有)

Ding D-Q, Haraguchi T, Hiraoka Y. (2012) Chromosomally-retained RNA mediates homologous pairing. **Nucleus**, 3: 516-519. doi:10.4161/nucl.22732 (査読有)

Fujita I, Nishihara Y, Tanaka M, Tsujii H, Chikashige Y, Watanabe Y, Saito M, Ishikawa F, Hiraoka Y, Kanoh J. (2012) Telomere-Nuclear Envelope Dissociation Promoted by Rap1 Phosphorylation Ensures Faithful Chromosome Segregation. **Curr. Biol**, 22, 1932-1937. doi:10.1016/j.cub.2012.08.019. (査読有)

Tange Y, Kurabayashi A, Goto B, Hoe K-L, Kim D-U, Park H-O, Hayles J, Chikashige Y, Tsutsumi C, Hiraoka Y, Yamao F, Nurse P, Niwa O. (2012) The CCR4-NOT Complex Is Implicated in the Viability of Aneuploid Yeasts. **PLoS Genetics**, 8:e1002776. doi: 10.1371/journal.pgen.1002776. (査読有)

Ding D-Q, Okamasa K, Yamane M, Tsutsumi C, Haraguchi T, Yamamoto M, and Hiraoka Y. (2012) Meiosis-specific non-coding RNA mediates robust pairing of homologous chromosomes in meiosis. **Science**, 336: 732-736. doi:10.1126/science.1219518 (査読有)

Yamashita A, Shichino Y, Tanaka H, Hiriart E, Touat-Todeschini L, Vavasseur A, Ding D-Q, Hiraoka Y, Verdel A, Yamamoto M. (2012) Hexanucleotide motifs mediate recruitment of the RNA elimination machinery to silent meiotic genes. **Open Biology**, 2:120014. doi:10.1098/rsob.120014(査読有)

Iimori 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.** 318:262-275. doi:10.1016/j.yexcr.2011.11.006(査読有)

Asakawa H, Hiraoka Y, Haraguchi T. (2011) Physical breakdown of the nuclear envelope is not necessary for breaking its barrier function. **Nucleus.** 2:523-526. doi:10.4161/nucl.2.6.16117(査読有)

Hiraoka Y, Maekawa H, Asakawa H, Chikashige Y, Kojidani T, Osakada H, Matsuda A, Haraguchi T. (2011) Inner nuclear membrane protein Ima1 is dispensable for intranuclear positioning of centromeres. **Genes Cells**, 16:1000-1011. doi:10.1111/j.1365-2443.2011.01544.x(査読有)

Sheltzer JM, Blank HM, Pfau SJ, Tange Y, George BM, Humpton TJ, Brito LL, Hiraoka Y, Niwa O, Amon A. (2011) Aneuploidy drives genomic instability in yeast. **Science**, 333:1026-30. doi:10.1126/science.1206412(査読有)

Asakawa H, Hiraoka Y, Haraguchi T. (2011) Nuclear translocation of RanGAP1 coincides with virtual nuclear envelope breakdown in fission yeast meiosis. **Communicative and Integrative Biology** 4:312-314. doi:10.4161/cib.4.3.14808(査読有)

[学会発表](計 51 件)

Ogiyama Y, Asakawa H, Yamamoto TG, Haraguchi T, Ishii K, and Hiraoka Y. Behaviors and structures of neocentromeres during meiosis in fission yeast. EMBO Conference on Meiosis (Sep. 18, 2013) Hotel Radisson Blu, Radebeul-Dresden, Germany

Tange Y, Asakawa H, Yang H-J, Chikashige Y, Haraguchi T, Hiraoka Y. Fission yeast nuclear membrane proteins that affect chromosome movements. EMBO Conference on Fission Yeast (Jun. 29, 2013) Senate House, London, UK

Hiraoka Y. Inner nuclear membrane proteins that affect chromosome dynamics in fission yeast. Gordon Research Conference "Chromosome Dynamics" (May 27, 2013) Renaissance Tuscany II Ciocco Resort, Lucca (Barga), Italy (招待講演)

Hiraoka Y. Dynamic Organization of Chromosomes In Fission Yeast. Joint Conference of HGM 2013 and 21st International Congress of Genetics (Apr. 17, 2013) The Sands Expo and Convention Center, Marina Bay Sands,

Singapore (招待講演)

Hiraoka Y. Live-cell imaging of chromosome dynamics in fission yeast. 1st International Symposium of the Mathematics on Chromatin Live Dynamics (Mar. 16, 2013) Hiroshima University, Japan (招待講演)

平岡泰、丁大橋、原口徳子 核内 RNA ボディが相同染色体の認識に果たす役割. 第 30 回染色体ワークショップ・第 11 回核ダイナミクス研究会 (2012 年 12 月 19 日) 兵庫県立淡路夢舞台国際会議場、兵庫県

平岡泰、丁大橋、原口徳子 減数分裂特異的な非コード RNA が相同染色体を認識する. 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、福岡県 (招待講演)

Hiraoka Y, Ding D-Q, Chikashige Y, Haraguchi T. RNA bodies on the chromosome play a role in pairing homologous chromosomes. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting, Dynamic Organization of Functional Nucleus (2012 年 9 月 30 日) NEW YORK, USA

平岡泰、丁大橋、原口徳子 減数分裂特異的な非コード RNA が相同染色体の対合を促進する. 第 50 回日本生物物理学会 (2012 年 9 月 23 日) 名古屋大学 東山キャンパス、愛知県 (招待講演)

Hiraoka Y. The Nuclear Envelope in Meiosis. The 20th Jerusalem School in Life Sciences "Nuclear Organization, Dynamics and Activity" (Jul. 23, 2012) Israel Institute for Advanced Studies at the Hebrew University, Israel (招待講演)

Hiraoka Y. Meiosis-specific non-coding RNA in homologous chromosome pairing. Gordon Research Conference "Meiosis" (Jun. 6, 2012) Colby-Sawyer College, USA (招待講演)

Hiraoka Y. Meiosis-specific non-coding RNA mediates pairing of homologous chromosomes in meiosis. Gordon Research Conference "Chromatin Structure & Function" (May. 9, 2012) Colby-Sawyer College, USA

Hiraoka Y, Ding D-Q, Haraguchi T. Meiosis-specific non-coding RNA mediates robust pairing of homologous chromosomes in meiosis. The EMBO Conference on Meiosis (2nd) (Sep. 19, 2011) Capaccio/ Paestum, Italy (招待講演)

Hiraoka Y. Meiosis-specific non-coding RNA mediates robust pairing of homologous chromosomes in meiosis. Gordon Research Conference "Chromosome Dynamics" (Jul. 13,

2011) Mount Snow Resort, USA (招待講演)

Hiraoka Y, Ding D-Q, Haraguchi T.
Pairing and recognition of homologous chromosomes in meiosis. The 6th International Fission Yeast Meeting (June 29, 2011) Boston, USA (招待講演)

〔図書〕(計 1件)

Asakawa H, Hiraoka Y, Haraguchi T. (2012)
Live CLEM imaging: an application for yeast cells. In "Current microscopy contributions to advances in science and technology", vol.1;478-485. A. Méndez-Vilas (Ed.) Formatex Research Center

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.fbs.osaka-u.ac.jp/labs/hiraoka/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平岡 泰 (HIRAOKA Yasushi)
大阪大学・大学院生命機能研究科・教授
研究者番号：10359078

(2) 研究分担者

該当なし()

研究者番号：

(3) 連携研究者

浅川 東彦 (ASAKAWA Haruhiko)
大阪大学・大学院生命機能研究科・助教
研究者番号：70399533

近重裕次 (CHIKASHIGE Yuji)
(独)情報通信研究機構・未来 ICT 研究所・主任研究員
研究者番号：60359081

丁 大橋 (DING, Da-Qiao)
(独)情報通信研究機構・未来 ICT 研究所・主任研究員
研究者番号：50359080

小布施 力史 (OBUSE, Chikashi)
北海道大学・先端生命科学研究院・教授
研究者番号：00273855