

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2013

課題番号：24687024

研究課題名(和文) 超解像度顕微鏡で可視化する減数分裂前期の染色体制御機構

研究課題名(英文) Understanding mechanisms of chromosome dynamics during meiotic prophase using superresolution microscopy

研究代表者

Carlton Peter (Carlton, Peter)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・助教

研究者番号：20571813

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,300,000円、(間接経費) 6,090,000円

研究成果の概要(和文)：減数分裂は、精子や卵子を作り出す特別な細胞分裂であり、有性生殖を行う生物にとっては、必須の重要なプロセスです。我々は、モデル生物線虫を用いて、タンパク質脱リン酸化酵素PPH-4が、減数分裂前期において、各卵母細胞が、正常な数の染色体を受けとって成熟するために機能することを発見しました。また、特に、若い個体の卵母細胞と比較すると、老いた個体が卵母細胞を産生する過程で、PPH-4の働きがより重要であることも明らかにしました。

研究成果の概要(英文)：Meiosis creates gametes by distributing diploid genomes containing homologous chromosome pairs into daughter cells that receive only one of each chromosome. To segregate correctly at the first meiotic division, chromosomes must pair and synapse with their homologous partners, and undergo cross over recombination. How chromosomes recognize their partners, and how a cell controls the amount of DNA breakage and recombination, are open questions. We observed meiosis in the nematode *C. elegans* to examine the role of Protein Phosphatase 4 (PP4). We found that in the absence of PP4, chromosomes often paired and synapsed with non-homologous chromosomes, or synapsed with themselves. Additionally, without PP4 activity, the number of DNA breaks and of crossover recombination events were independently reduced. The latter two defects became worse with increasing age. These findings shed light on how protein phosphorylation controls meiotic events.

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：減数分裂 線虫 超解像度顕微鏡 DNA相同組換え プロテインフォスファターゼ

1. 研究開始当初の背景

減数分裂前期の相同染色体の対合は、有性生殖を行う全ての生物における必須のプロセスである。減数分裂前期、父由来と母由来の相同染色体のペアは、隣同士に並んで対合し、DNA 二重鎖切断を形成することにより相同組み換えを開始し、交叉を形成して、減数第一分裂で分離される。この、減数分裂前期における染色体のダイナミクスに失敗すると、染色体数異常の生殖細胞を生み出す原因となってしまう。しかしながら、この、対合を相同な染色体間のみを保証しているメカニズム、すなわち、例えば「父由来の第一染色体が、あまたある染色体のうちから、母由来の第一染色体を見つけて認識する」メカニズムは、大きな謎である。

また、減数分裂前期、細胞は、通常ゲノムにとって有害になりうる DNA 二重鎖切断を、SPO-11 と呼ばれる酵素により作り、母方、父方染色体の間で相同組み換え、交叉形成を行なう。交叉形成は、減数第一分裂の染色体分配に必須なので、細胞は、全ての染色体ペアが交叉を作るのに十分な量の、DNA 二重鎖切断を作らなければいけない。一方で、過剰量の DNA 二重鎖切断は、修復しきれない DNA 損傷を残す危険性がある。従って、細胞は、多すぎず、少なすぎない量の DNA 二重鎖切断 を作製してから、交叉を形成する必要があるが、この切断量を調節するメカニズムは、明らかではない。

上記の謎の一端を明らかにするために、我々は、モデル生物線虫の生殖腺と変異株を用いて解析を行った。線虫は、(1)成虫の全細胞のうち半数を、生殖細胞が占めるほど生殖腺が大きく、(2)変異株の単離が比較的容易であるため、減数分裂前期における染色体のふるまいを解析するために最適なモデルシステムの1つである。

我々は、本研究に先だって、上記に述べた、相同染色体の対合や、交叉形成に不具合の出る線虫の変異株を探索していた。その結果、セリン/スレオニンタンパク質脱リン酸化酵素 (PPH-4) という遺伝子に変異があると減数分裂に不具合がでることがわかったため、本研究では、PPH-4 の減数分裂前期における機能解析を行うに至った。

2. 研究の目的

線虫をモデル生物として、保存されたセリン/スレオニンタンパク質脱リン酸化酵素 (PPH-4) の機能解析を端緒とし「どのように染色体同士が、お互いの相同性を認識して対合し、交叉に必要な DNA 二重鎖切断を作り出すのか？」を明らかにすることを目指す。PPH-4 は、真核生物において非常に高度に保存されており、例えば、ヒトと線虫の PPH-4 (ヒト PP4) の間では、96%のアミノ酸配列同一性がある。このため、線虫で明らか

になった PPH-4 の減数分裂における機能は、ヒトを含む他の生物においても保存されている可能性が高い。

3. 研究の方法

線虫 pph-4 変異株を用いて、免疫染色や、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション、遺伝学的解析を行い、減数分裂前期の染色体のふるまいのどこで不具合が起こっているかを明らかにする。モデル生物線虫では、すでに、多くの減数分裂タンパク質が同定され、それらを検出するための抗体も存在する。これらの抗体を用いて、既知の減数分裂タンパク質の核内局在や、数量変化を、pph-4 変異体と野生型において比較する。免疫染色画像の解析には、一般的に使われるデコンボリューション顕微鏡に加え、超解像度顕微鏡 3D-SIM (Three dimensional Structured Illumination Microscopy) を用いて、最高 100nm の高い分解能で画像を取得し、局在解析を行う。

4. 研究成果

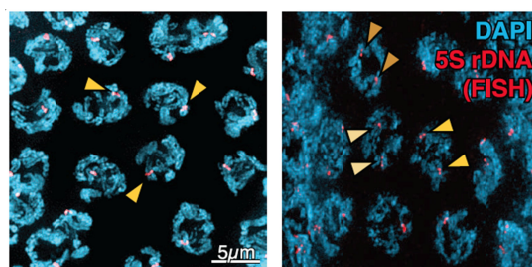
研究の主な成果

(1) PPH-4 の脱リン酸化活性は、減数分裂前期における PPH-4 の役割に必須であり、pph-4 変異株の卵母細胞は、母体の加齢に影響を受ける。

我々は、まず pph-4 の脱リン酸化酵素活性を不活化させる 1 アミノ酸置換を挿入した pph-4 遺伝子を 2 種類作成し、脱リン酸化酵素活性を持たない pph-4 をもつトランスジェニック線虫を作成した。その結果、脱リン酸化酵素活性を持たない pph-4 変異株は、pph-4 を全くもたない変異株 (Null) と、同じレベルの減数分裂における不具合を起こすことがわかった。これは、脱リン酸化活性が、PPH-4 の働きに必須であることを示す。

興味深いことに、pph-4 変異株における減数分裂の不具合は、個体の加齢とともに悪化することがわかった。これは、若年個体に比べると、高齢個体における減数分裂において、PPH-4 活性に依存する度合いが高いことを示唆する。

(2) PPH-4 は、常染色体の相同な対合 (ペアリング) を促進する。



Wild Type

pph-4.1(tm1598)

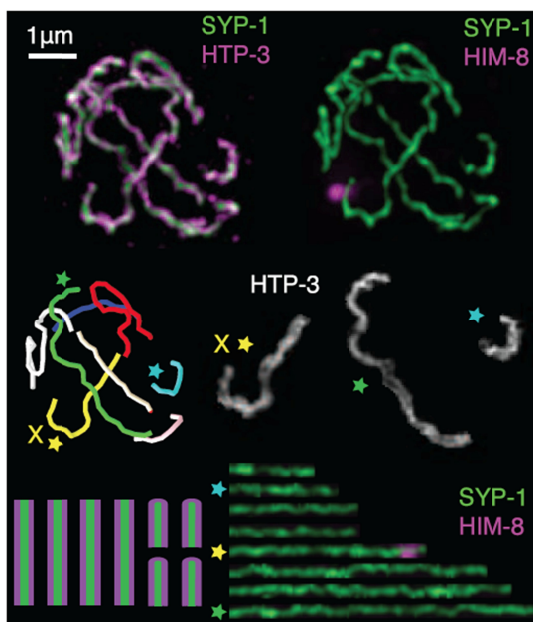
我々は、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション

オンを行い、染色体の対合を検証したところ、*pph-4* 変異株では、常染色体において対合が顕著に減少するが、X 染色体は、対合が正常に起こることがわかった。上図は、線虫生殖腺の蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション像で、DNA 染色を青で示し、5 番染色体の 5S rDNA 部位を、赤で示す。また我々は、この PPH-4 の対合活性が、個体の年齢に影響されないことも示した。

(3) PPH-4 は、非相同な染色体間の対合や、自己折れ曲がり対合を阻止する。

我々は、染色体の対合時に、相同染色体同士を繋ぎ止めるタンパク質群(シナプトネマタンパク質、下図 SYP-1, HTP-3 など)の免疫染色を行い、*pph-4* 変異株においてシナプトネマタンパク質が、非相同な染色体間や、1 染色体が折れ曲がった部分に重合することを発見した。

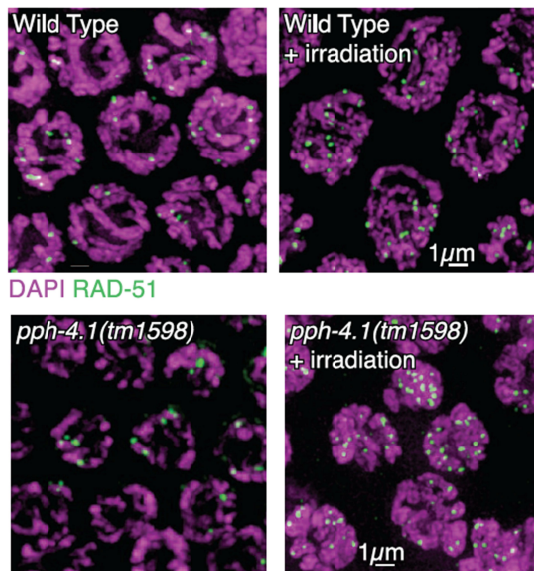
下図では、*pph-4* 変異株の、1 卵母細胞(減数分裂前期パキテン期)を示す。HIM-8 は、X 染色体の左末端に結合するタンパク質であるため、X 染色体のマーカーとして用いた。上列の 3D 免疫染色画像を、コンピュータ上でトレースし、各染色体のシナプトネマ構造を展開したものが最下列である。線虫は、6 ペアの相同染色体を持つため、野生株では、6 本のシナプトネマ構造(6 対の相同染色体ペアにあたる)が可視化されるが、*pph-4* 変異株では、6 本以上のシナプトネマ構造が多く観察され、3-4 本の染色体が 1 つに対合した複雑な構造や、下図のような折れ曲がり対合をすることが、超解像度顕微鏡によって可視化された。



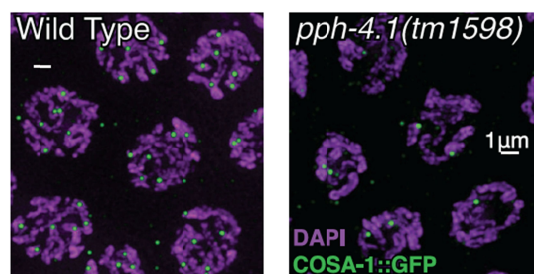
(4) PPH-4 は、正常量の DNA 二重鎖切断と交叉を作るのに必須である。

我々は、次に、交叉形成の前駆的過程であ

る DNA 相同組み換え時に働く RAD-51 タンパク質に対して免疫染色を行った。この RAD-51 タンパク質のスポット数を可視化することで、DNA 相同組み換えの数を定量化することができる。この結果、*pph-4* 変異株では、DNA 相同組み換え量が、野生株と比べて減少していることがわかった。下図では、生殖腺の免疫染色像を示し、DNA 染色をマゼンダ、RAD-51 抗体染色を緑色でしめた。



次にこの DNA 組換え量の減少が、DNA 二重鎖切断量の減少に由来するのか、それとも異常な DNA 修復(姉妹染色体を用いた修復)に由来するのかを検証するため、DNA 修復が全くできない変異株バックグラウンド *rad-54* において、RAD-51 免疫染色を行った。その結果、*rad-54 ; pph-4* 二重変異株では、DNA 二重鎖切断の量そのものが減少することがわかった。また、興味深いことに、DNA 二重鎖切断量は個体の加齢効果を受け、高齢の個体では、さらに減少することがわかった。若年個体に比べた、高齢個体における二重鎖切断量の低下は、*pph-4* 変異株のみならず、野生株でも見られたが、野生株は、そもそも十分な量の二重鎖切断が作られるので、高齢になり、多少、切断能力が低下しても、最低限の交叉が作られるようバッファーされていると考えられる。一方、*pph-4* 変異株では、既に若年時より減少している二重鎖切断量が、高齢化によりさらに減少するため、その効果が、交叉減少として検出されると考えられる。



実際に、生殖核あたりの交叉数を定量化す

るために、交叉タンパク質 COSA-1 をマーカーとして免疫染色し、その数を比較した。上図は、生殖腺の免疫染色像で、DNA 染色をマゼンダ、COSA-1 抗体染色を緑色で示した。pph-4 変異株では、野生株と比べ、若年時にすでに交叉の数が減少しており、個体の加齢とともに、さらに減少することがわかった。次に、線虫にガンマ線を照射し、人工的に DNA 二重鎖切断を作って、pph-4 変異株における交叉形成を、人為的に回復させることができるかどうか検証した。その結果、人為的に DNA 二重鎖切断を作っても、交叉形成を増やすことができなかった。これは、PPH-4 が、DNA 二重鎖切断の作製のみならず、その下流過程である、交叉形成そのものに関わっていることを示している。

(5) pph-4 変異株では、核膜タンパク質 SUN-1 の 8 番目セリンのリン酸化が増加する。

我々は、PPH-4 の脱リン酸化の基質を探索するうちに、減数分裂に機能することが知られている核膜タンパク質 SUN-1 のリン酸化が、pph-4 変異株で増えることを免疫染色をもちいて明らかにした。sun-1 変異株が、相同染色体の対合に不具合を持つことが知られており、減数分裂前期に機能する重要な因子である。現在、PPH-4 と SUN-1 の間に相互作用があるかどうかを、生化学的、遺伝学的に解析中である。

上記をまとめると、PPH-4 は、減数分裂前期の複数のステップ(染色体対合、DNA 切断、交叉形成)に独立して機能すると考えられる。PPH-4 は脱リン酸化酵素であるため、これらの独立した機能は、独立した基質の脱リン酸化を介して起こると思われる。

得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

これまで、PPH-4(PP4)の機能解析は、体細胞のサイクルにある細胞を用いて行われたものがほとんどであった。本研究は、これまで未知であった PPH-4 の減数分裂における機能を明らかにしたという意義がある。

また、我々は、PPH-4 の卵母細胞における機能の重要性が、個体の老化とともに増加することも示した。これは、近年増加しつつある、高齢女性の不妊問題を理解するのに貢献する可能性がある。

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. Peter M. Carlton
Application of advanced fluorescence microscopy to the structure of meiotic chromosomes
Biophysical Reviews, 2013 April

10.1007/s12551-013-0116-0、査読有

[学会発表](計 8 件)

- Peter Carlton, "A conserved phosphatase, PPH-4.1, ensures faithful chromosome pairing and DNA double strand break formation in *C. elegans*"
Chromatin decoding meeting, 2014, 5. 京都
- Peter Carlton, "Visualizing meiosis chromosome structure with 3D Structured Illumination Microscopy"
36th Molecular Biology Society of Japan annual meeting 2013.12 神戸
- Peter Carlton, "A conserved phosphatase, PPH-4.1, ensures chromosome pairing and recombination in *C. elegans*"
The 29th RBC-NIRS International Symposium, 2013.11, 京都
- Peter Carlton, "A conserved phosphatase, PPH-4.1, ensures chromosome pairing and recombination in *C. elegans*"
EMBO Meiosis meeting, 2013. 9. ドイツ
- Peter Carlton, "A conserved phosphatase, PPH-4.1, ensures chromosome pairing and recombination in *C. elegans*"
Chromosome Dynamics Workshop on Advanced Microscopy Techniques, 2013.09, オーストリア
- Peter Carlton, "A conserved phosphatase, PPH-4.1, ensures chromosome pairing and recombination in *C. elegans*"
35th Molecular Biology Society of Japan annual meeting. 2012.12 福岡
- Peter Carlton, "A conserved phosphatase, PPH-4.1, ensures chromosome pairing and recombination in *C. elegans*"
14th International Congress of Histochemistry and Cytochemistry, 2012.08 京都
- Peter Carlton, "A conserved phosphatase, PPH-4.1, ensures chromosome pairing and recombination in *C. elegans*"
East Asia *C. elegans* meeting, 2012.06 台湾

[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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

カールトン ピーター (CARLTON Peter)
京都大学・物質 - 細胞統合システム拠点・
助教
研究者番号：20581813

(2) 研究分担者

佐藤 綾 (SATO Aya)
京都大学・物質 - 細胞統合システム拠点・
JSPS 特別研究員
研究者番号：40595112

リー シュエン (Li Xuan)
京都大学・物質 - 細胞統合システム拠点・
研究員

(3) 連携研究者

()

研究者番号：