

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292169

研究課題名(和文) 哺乳類減数分裂における染色体高次構造の制御メカニズム

研究課題名(英文) Molecular mechanism regulating higher-order structure of chromosomes during mammalian meiosis

研究代表者

李 智博 (LEE, Jibak)

神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号：50372660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：本申請課題では、哺乳類の減数分裂における相同染色体の対合・組換えと染色体の凝縮の分子メカニズムについて調べた。

第一減数分裂前期に形成されるシナプトネマ複合体内における減数分裂型コヒーシンRAD21LとREC8の局在位置を明らかにした。また、減数分裂型コヒーシンRAD21Lを体細胞に異所発現させると相同染色体間の距離が近づくことを発見した。ノックアウトマウスを使用した解析によって、卵母細胞の減数分裂においては、コンデンシンIIが染色体の形成・分離に主要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this project, we examined the molecular mechanism that regulates synapsis and recombination of homologous chromosome as well as chromosome condensation and separation during mammalian meiosis.

We showed that meiotic cohesins are localized at the connection sites between axial and transverse filaments of the synaptonemal complex in mouse spermatocytes. We also found that ectopic expression of meiotic cohesin subunit RAD21L shortened the distance between homologous chromosomes in somatic cultured cells. Using knockout mice, we demonstrated that condensin II plays a main role in chromosome condensation and segregation during meiosis of mouse oocytes.

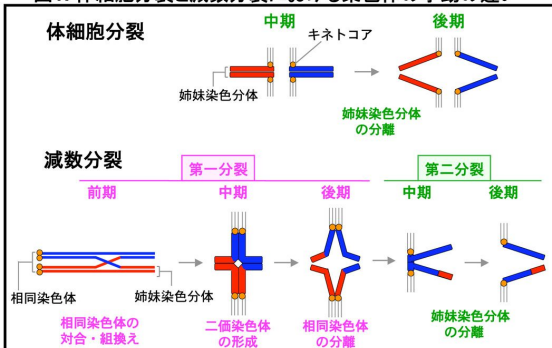
研究分野：発生工学

キーワード：減数分裂 相同染色体 対合 組換え コヒーシン コンデンシン

1. 研究開始当初の背景

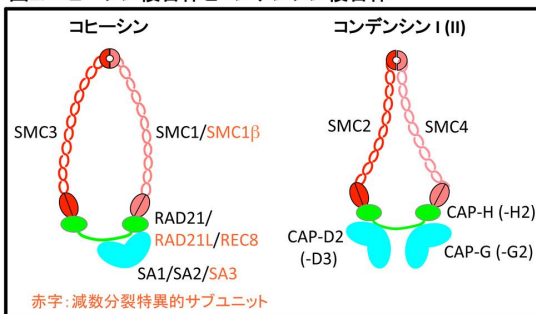
減数分裂は、生殖細胞が配偶子形成過程に行う特殊な分裂であるが、多くの動植物が行うことから明らかなように、種の保存と進化を支える普遍的な現象であると言える。減数分裂では、体細胞が行う通常の分裂とは異なり、DNA複製後に2回の連続する分裂が起こり、それによって染色体数が半減する。とりわけ第一減数分裂では、前期に相同染色体どうしが対合・組換えを起こす結果、後期に相同染色体が分離する。続く第二減数分裂において、体細胞分裂と同様に、DNA複製時に複製された染色体のペアである姉妹染色分体が分離する(図1)。このように減数分裂では体細胞分裂と異なる染色体の挙動が見られるが、それがどのような分子メカニズムで起こるのかについてはまだ明らかとなっていない。その解明は、家畜の繁殖やヒトの生殖医療の観点からも重要である。

図1. 体細胞分裂と減数分裂における染色体の挙動の違い



真核生物における染色体の接着や凝縮・分離には、コヒーシとコンデンシンと呼ばれるタンパク質複合体が重要な役割を担う。コヒーシは4つのサブユニットから構成されるが、哺乳類の生殖細胞では、いくつかのサブユニットが減数分裂特異的なコヒーシサブユニットに置き換わる(図2)。ノックアウトマウスを用いた解析から、それらのサブユニットは減数分裂に特徴的な染色体動態に必須であることが明らかとなっている。しかし、REC8とRAD21LはともにRAD21の代わりとなる減数分裂特異的なサブユニットであるが、それらの機能の役割分担についてはよくわかっていない。また、コンデンシンにはIとIIの2つのタイプが存在し(図2)、ともに減数分裂においても発現するが、減数分裂におけるそれらの制御や役割分担についてもまだよくわかっていないことが多い。

図2. コヒーシ複合体とコンデンシン複合体



2. 研究の目的

(1) 相同染色体の対合と組換えにおける減数分裂特異的なコヒーシサブユニットRAD21LとREC8の制御と役割を明らかにする。

(2) 減数分裂およびその後の胚発生におけるコンデンシンIとIIの役割を明らかにする。

(3) 減数分裂に特徴的な染色体高次構造と遺伝子発現との関連について明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウス初期胚におけるコンデンシンの役割の解析

*Smc2* ヘテロ欠損の雌雄マウスから採取した卵子と精子を用いて、受精後、最長4日間胚培養を行った。胚を固定後、免疫蛍光染色によりSMC2タンパク質の有無を調べるとともに、染色体、セントロメア、ヘテロクロマチンの状態を共焦点顕微鏡下で観察した。

(2) 減数分裂の染色体凝縮におけるコンデンシンIとIIの機能

コンデンシンIとIIに共通のサブユニット(SMC2)、Iに特異的なサブユニット(CAP-H)あるいはIIに特異的なサブユニット(CAP-H2)を卵母細胞特異的にノックアウトするため、それぞれのFloxedマウスとZp3-CreマウスあるいはGDF9-iCreマウスと交配させた。得られた産仔から卵母細胞を採取し、体外成熟培を行い、ライブセルイメージングあるいは固定・免疫傾向染色して、染色体の形状や動態を観察した。

(3) シナプトネマ複合体上のコヒーシンの局在解析

マウス精巣から精母細胞を採取し、固定後、シナプトネマ複合体の構成分子(SYCP3やSYCP1)、減数分裂型コヒーシサブユニット(RAD21LやREC8)、組換え中間体(MSH4)に対する特異的な抗体を使用して免疫蛍光染色を行った。染色後のサンプルを超分解能を持つ光学顕微鏡法3-Dimensional Structured Illumination Microscopy(3D-SIM)により観察し、シナプトネマ複体内の上述のタンパク質の局在位置を決定した。

(4) 体細胞における減数分裂型コヒーシンの異所性発現の影響

マウス線維芽細胞NIH3T3に、RAD21L-GFPを発現するプラスミドベクターをトランスフェクションし、24時間培養後に、X染色体あるいは11番染色体の一部を認識するポントプローブを用いてFISH解析を行った。共焦点顕微鏡下で観察し、GFPの蛍光により発現細胞を検出し、FISHシグナル間の距離を測定した。対照区には、GFPシグナル陰性細胞を使用し、体細胞分裂型のコヒーシ

RAD21-GFP 発現細胞も、比較のため用いた。また、本実験に用いた GFP 融合型のコヒーシンサブユニットが他のコヒーシンサブユニットと複合体を形成する能力を調べるため、*in vitro* 転写翻訳後に、抗 GFP 抗体を用いて免疫沈降を行い、他のコヒーシンサブユニットに対する抗体を用いたウェスタンブロット解析によって免疫沈降物中のサブユニットの有無を確かめた。

#### 4. 研究成果

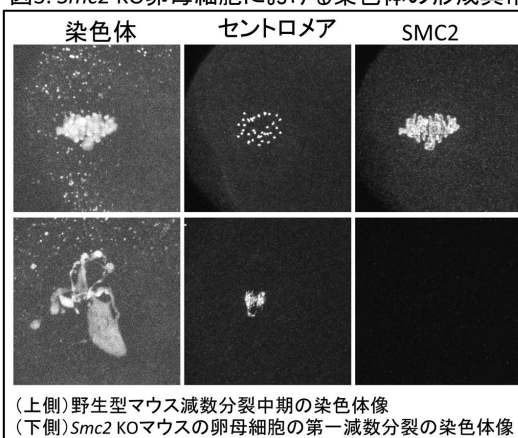
##### (1) 初期胚におけるコンデンシンの役割

コンデンシン I と II に共通のサブユニットである *Smc2* 遺伝子をノックアウトすると胚性致死となる。初期胚の発生過程における SMC2 の機能を調べるため、*Smc2* ヘテロ欠損の雌雄マウスから採取した卵子と精子を用いて、体外受精・胚培養を行い、観察した。その結果、胚培養 4 日目に、SMC2 タンパク質が枯渇した胚では、胚盤胞へ発生するものの、胚に含まれる細胞数は、野生型の胚と比較して有意に少なかった。また、SMC2 枯渇胚の細胞では、染色体の凝縮不全や不分離のため、分裂期で細胞周期が停止していることが明らかとなった。これらの結果から、コンデンシンは哺乳類の初期胚発生においても、染色体の凝縮・分離に機能することが示唆された。また、胚盤胞を構成する間期の細胞において、SMC2 枯渇胚ではヘテロクロマチンの点状シグナルがコントロールと比較して少数で大型化することから、間期のクロマチン構造にもコンデンシンが影響を与えていることが示唆された。今後の課題として、間期のクロマチン構造の変化と遺伝子発現制御との関連を明らかにする必要がある。

##### (2) 減数分裂の染色体凝縮におけるコンデンシン I と II の機能

Cre-LoxP システムにより、卵母細胞特異的にコンデンシン I およびコンデンシン II に特異的なサブユニットの遺伝子をノックアウトし、その影響を調べた。その結果、コンデンシン II のサブユニット *Cap-h2* をノックアウトした時には、染色体の形成（染色体の個別化、凝縮）が妨げられ、染色体の分離にも異常が見られた。一方、コンデンシン I サブユニット *Cap-h* のノックアウト卵母細胞では、通常通り、減数分裂が進行し、受精後に胚移植すると個体へと発生した。また、コンデンシン I と II に共通のサブユニット *Smc2* を卵母細胞特異的にノックアウトした時も染色体の凝縮や分離に異常が検出された（図 3）。これらの結果から、卵母細胞における減数分裂期の染色体の凝縮や分離には、コンデンシン II が主要な役割を果たし、コンデンシン I は機能するとしてもコンデンシン II によりその機能は補えることが示唆された。

図3. *Smc2* KO卵母細胞における染色体の形成異常



##### (3) シナプトネマ複合体におけるコヒーシンの局在

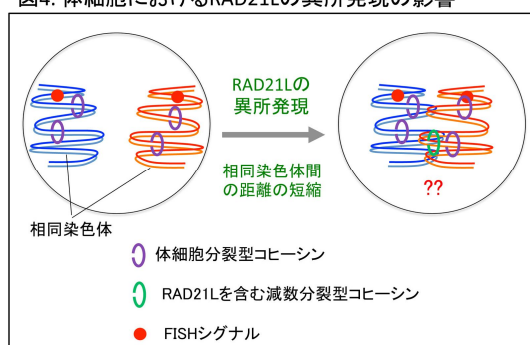
相同染色体の対合と組換えは、シナプトネマ複合体の形成と並行して起こる。シナプトネマ複合体は、各染色体に沿って形成される axial elements が相同染色体間で transverse filaments と呼ばれるジッパー様の構造により結合されることによって形成される。これまでの報告から、コヒーシンは axial elements に沿って局在することがわかってきたが、シナプトネマ複合体内の詳細な局在位置についてはわかっていなかった。そのため、3D-SIM と呼ばれる高解像度の光学顕微鏡システムを用いて、REC8 と RAD21L の局在を調べた。その結果、2つのコヒーシンサブユニットは共に、axial elements と transverse filaments の間（つまり繋ぎ目部分）に局在し、RAD21L の方が REC8 よりも少し内側に局在することが明らかとなった。組換え中間体の構成分子である MSH4 とのシグナルの重なりをシナプトネマ複合体上で調べたところ、RAD21L の方が REC8 よりもその割合が高かった。また、ザイゴテン期の細胞の未対合領域において、相同染色体間に RAD21L のシグナルが観察された。これらの結果およびその発現時期から、RAD21L は相同染色体の対合と組換えに特化したコヒーシンサブユニットであることが示唆された。また、染色体長軸方向に沿う REC8 と RAD21L の局在は、対合状態の相同染色体間で必ずしも一致しなかった。このことから、減数分裂期のコヒーシンの局在は染色体全長に渡って常に決まっているわけではなく、遊動的であることが示唆された。

##### (4) 体細胞における減数分裂型コヒーシンの異所性発現の影響

マウスの線維芽細胞に、減数分裂型コヒーシンサブユニット RAD21L を異所発現させ、FISH 法により相同染色体間の距離を測り、その影響を調べた。その結果、体細胞分裂型の RAD21-GFP を発現させた細胞では、対照区（GFP 発現細胞）と比較して、相同染色体間の距離は変わらなかったが、RAD21L-GFP 発現

細胞では、相同染色体間の距離が有意に短縮した。さらに、RAD21LのN末端部分を削除すると、コヒーシンサブユニットの1つであるSMC3と相互作用できないことを試験管内の結合アッセイによって確かめた。このRAD21Lの部分欠変異体を用いると、相同染色体の距離は対照区と変わらなかった。これらの結果から、RAD21Lを含むコヒーシンは相同染色体の相互認識・結合に関わることが示唆された(図4)。また、今回の発見は、体細胞において、減数分裂期に起こる相同染色体の対合や組換えと類似した現象を人工的に引き起こす技術開発へとつながる可能性もある。

図4. 体細胞におけるRAD21Lの異所発現の影響



## 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)

Mei Rong, Sachi Miyauchi, Jibak Lee (2017). Ectopic expression of meiotic cohesin RAD21L promotes adjacency of homologous chromosomes in somatic cells. *J Reprod Dev* 63: 227-234. 査読有り.

Mei Rong, Atsushi Matsuda, Yasushi Hiraoka, Jibak Lee (2016). Meiotic cohesin subunits RAD21L and REC8 are positioned at distinct regions between lateral elements and transverse filaments in the synaptonemal complex of mouse spermatocytes. *J Reprod Dev* 62: 623-630. 査読有り.

Martin Houlard, Jonathan Godwin, Jean Metson, Jibak Lee, Tatsuya Hirano, Kim Nasmyth (2015). Condensin confers the longitudinal rigidity of chromosomes. *Nat Cell Biol* 17: 771-781. 査読有り.

〔学会発表〕(計 7 件)

Jibak Lee. Meiotic cohesins during spermatogenesis. 4<sup>th</sup> World congress of reproductive Biology 2017, 2017.9.27-29, 沖縄コンベンションセンター (沖縄県).

Mei Rong, Sachi Miyauchi, Jibak Lee. Ectopic expression of RAD21L-containing cohesin brings homologous chromosomes closer in somatic cells. 4<sup>th</sup> World congress of reproductive Biology 2017, 2017.9.27-29, 沖縄コンベンションセンター (沖縄県).

Sachi Miyauchi, Mei Rong, Jibak Lee. Effects of ectopic expression of meiotic cohesin RAD21L in somatic cells. The 2<sup>nd</sup> meeting on SMC proteins, 2017.6.13-16, 南陽市文化会館 (山形県).

宮内紗千, 美栄, 李智博. 減数分裂型コヒーシンサブユニット RAD21L の体細胞への異所発現の影響. 日本畜産学会第 122 回大会, 2017.3.27-30, 神戸大学(兵庫県).

Jibak Lee. Potential roles of condensins during mouse oocyte maturation and early embryogenesis. Department seminar, Department of Biochemistry, University of Oxford, 2014.9.5, Oxford (UK).

Jibak Lee, Moeko Shimizu, Kenji Nishide, Tatsuya Hirano. Essential roles of condensins in chromosome organization during mouse early embryogenesis. 3<sup>rd</sup> World congress of reproductive Biology 2014, 2014.9.2-4, Edinburgh (UK).

Mei Rong, Atsushi Matsuda, Yasushi Hiraoka, Jibak Lee. The detailed localization of meiotic cohesin subunits, REC8 and RAD21L, in mouse spermatocytes. 3<sup>rd</sup> World congress of reproductive Biology 2014, 2014.9.2-4, Edinburgh (UK).

〔図書〕(計 1 件)

Jibak Lee. Chapter 15: The regulation and function of cohesin and condensin in mammalian oocytes and spermatocytes. In "Oocyte -Maternal information and functions" Malgorzata Kloc (Ed), *Results and Problems in Cell Differentiation* 63: 355-372. 査読有り.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/ans-reprod/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

李 智博 (LEE, Jibak)

神戸大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：50372660

(2)研究分担者

松田 厚志 (MATSUDA, Atsushi)  
国立研究開発法人情報通信機構・未来 ICT  
研究所・主任研究員  
研究者番号： 20585723