

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26711020

研究課題名(和文) 減数第一分裂期における染色体分配制御機構の解析

研究課題名(英文) The analysis for the regulation of chromosome segregation during meiosis I

研究代表者

作野 剛士 (Sakuno, Takeshi)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授

研究者番号：10504566

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、減数第一分裂期において姉妹動原体がスピンドル微小管によって一方向性に捉えられるために必要な機構が、酵母からマウスに至るまで機能的に保存されているMEIKINを介して制御されることを示した。また、減数第一分裂期におけるコヒーシンの分解保護に必要なシュゴシンの局在制御に、酵母とマウス共にPoloキナーゼが必要であることを示した。さらに、相同染色体が両極へと分配されるために必須な減数分裂期組換えの制御に、I型カゼインキナーゼによるコヒーシンのリン酸化が必須であることが判明した。これらの結果を通して、真核生物の減数第一分裂期における染色体分配制御を担う分子機構に関する理解が深まった。

研究成果の概要(英文)：Throughout this study, we found that the mechanism necessary for sister kinetochores to be captured mono-oriented manner by spindle microtubules during meiosis I is controlled through MEIKIN, which is functionally conserved from yeasts to mouse. We also showed that yeast and murine Polo-like kinase is required for the regulation of the localization of Shugosin, which is essential for the protection of cohesin from cleavage after meiosis I. Furthermore, it was found that phosphorylation of cohesin by casein kinase I is essential for the regulation of meiotic recombination necessary for the reductional segregation of homologous chromosomes. From these results, the understanding of the molecular mechanism responsible for the regulation of chromosome segregation during meiosis I was largely progressed.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：減数分裂 染色体分配 コヒーシン MEIKIN 相同組換え CK1

1. 研究開始当初の背景

有性生殖を採用した生物にとって、半数体の配偶子を形成する減数分裂過程は、遺伝情報の本体である染色体を次世代へと継承する上で必須なプロセスである。その過程の根幹を担うのが減数第一分裂期のみ履行される“還元分配”と、姉妹染色分体の接着を担うコヒーシンの局所的な分解保護機構である。姉妹染色分体ペアが両極へと“均等分配”される体細胞分裂期や減数第二分裂とは異なり、還元分配過程では姉妹動原体が同じ極から伸びてきたスピンドル微小管によって捉えられる一方向性結合が確立される。それに加えて、相同染色体ペアは減数分裂期組換え産物であるキアズマを介して物理的に繋がっていることから、減数第一分裂期では姉妹染色分体ではなく相同染色体が両極へと分配される。このとき、染色体腕部のコヒーシンがセパレースにより分解されることで相同染色体が分離可能となるが、シュゴシンの働きによりセントロメア周辺のコヒーシンは分解から免れる。この残存したコヒーシンによる接着が、続く減数第二分裂期で姉妹染色分体が均等分配されるために必須となる(下図)。

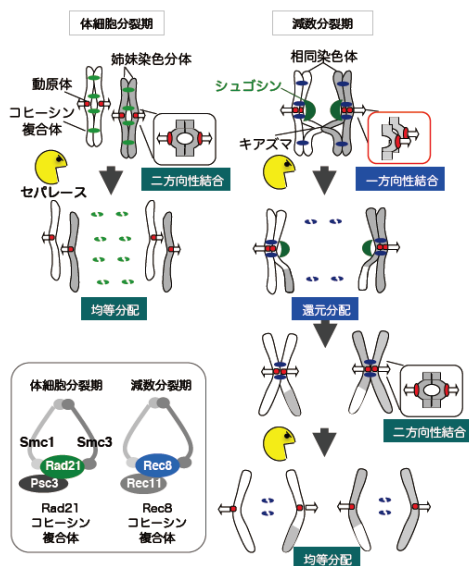


図1 染色体分配様式とコヒーシン複合体

よって、一方向性結合の確立、キアズマの形成に必須な相同組換え、さらにコヒーシン分解保護、これら3つを司る分子機構が減数分裂を減数分裂たらしめるために必須な要素であり、その理解が減数分裂期における染色体分配制御機構全体の理解につながると考えられる。また、上記の各過程に異常が生じると染色体分配ミスが誘起され、異数体(染色体数が異常な)の卵や精子が形成されるため、ダウン症などの先天性疾患や早期流産を引き起こしてしまうことが知られている。よって減数分裂期における染色体分配の制御機構を分子レベルで理解することは、基礎生物学の発展に資するだけでなく、将来的には臨床応用に

有益な知見を提供しうる研究課題であると考え

2. 研究の目的

減数分裂過程で、最終的に染色体数を半減させた一倍体の配偶子を形成するためには、一度の複製の後、連続した二回の染色体分配が必要となる。しかし一回目の分配時に、体細胞分裂期と同様に姉妹染色分体を分離してしまうと、すなわちコヒーシンによる姉妹染色分体の接着を全て失ってしまうと、続く二回目で分配されるべきペアの認識が不可能となる。そこで生物が採用したのが、減数第一分裂期では還元分配により相同染色体ペアを両極へと分離すると同時に、姉妹染色分体の接着は維持することで続く第二分裂期での均等分配を保障する仕組みである。これには、姉妹動原体とスピンドル微小管との一方向性結合や、分離すべき相同染色体ペアを形成する交差型の組換え(キアズマ)の存在が前提条件となる。しかし、これらの減数分裂期における正確な染色体分配を支える機構がどのような分子機序で制御されているのか、不明な部分が多い。そこで本研究では、真核モデル生物である分裂酵母を用いてそれら分子機構の解明を目指した。さらに、マウス生殖細胞における解析を行い、分裂酵母で明らかになった機構の進化的保存性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

本申請者らのこれまでの解析から、モデル生物である分裂酵母の場合、一方向性結合を保障する為には、姉妹動原体のコヒーシン複合体を介した融合が必要であること、さらに Moa1 という減数分裂期特異的に発現する動原体結合因子によるその融合の維持が必須であることが明らかになっていた。しかし、Moa1 が有する分子機能に関しては未解明であり、加えて姉妹動原体の融合を介した一方向性結合の確立および還元分配の履行を制御する機構の進化的保存性に関しても不明であった。分裂酵母 Moa1 は、Polo 様キナーゼのホモログである Plo1 と結合し、動原体へとリクルートする。そこでまずこれらの結合の生理的意義を解析した。また、Plo1 が一方向性結合の制御に必要である可能性を前提として、そのリン酸化基質の同定を試みた。実際には野生型および moa1 破壊株における減数第一分裂期の動原体周辺からコヒーシン複合体を免疫沈降により精製し、質量分析により moa1 破壊株で消失するリン酸化残基、すなわち Plo1 の標的残基の同定を試みた。同時に、精製したコヒーシン複合体を Plo1 で *in vitro* でリン酸化したうえで同じく質量分析を行い、Plo1 によってリン酸化される残基の同定を行った。また、moa1 破壊株では、一方向性結合だけでなく、セントロメアコ

ヒースンの分解保護機能も欠損していることが明らかになっていた。そこでこれらの表現型が生じる要因の解明を行った。また、並行して明らかになりつつあったマウスにおける減数分裂期特異的な新規動原体因子である MEIKIN が Moa1 と機能的に類似しているかを検証する目的で、MEIKIN の KO マウスや、生殖細胞において Polo 様キナーゼ (Plk1) の活性阻害を行ったうえで染色体動態などを観察することで、Moa1 や MEIKIN が一方向性結合の確立やセントロメアコヒースンの分解保護に果たす分子機構の解明、およびその進化的保存性の検証を試みた。さらに、本申請者らはこれまでの解析から、高度に保存されたリン酸化酵素、I 型カゼインキナーゼ (CK1) が、分裂酵母の減数分裂期組換え、特に DNA 二重鎖切断の導入に必要であることを見出していた。そこで、CK1 の減数分裂期組換えに果たす分子的役割を解析する目的で、既知の組換え因子のほぼ全てに対して CK1 により *in vitro* でリン酸化する方法でその基質因子の同定を試みた。

4. 研究成果

一方向性結合の制御に果たす Plk1 の機能に関して、まず Moa1 との結合を介して動原体に局在すること、さらに自身のリン酸化酵素活性が、姉妹動原体の融合の維持、および一方向性結合の確立に必須であることが判明した。また、Moa1 の破壊株では、一方向性結合だけでなく、セントロメアコヒースンの分解保護機能も欠損していることが明らかになっていたが、出芽酵母において同様な表現型を示す因子として Spo13 が知られていた。そこで、Moa1 と Spo13 の機能的な相関を検証した結果、分裂酵母の減数分裂期細胞内で、動原体に局在させた出芽酵母 Spo13 は、*moa1* 破壊株の表現型を有意に抑制され、一方で Polo 様キナーゼと結合できない Spo13 の変異体では抑圧能は顕著に低下することが明らかになった。また、マウスにおいて単離されていた新規の減数分裂期特異的な動原体因子である MEIKIN は、Moa1 と同様に CENP-C との結合を介して動原体に局在化し、さらに Polo 様キナーゼを動原体へとリクルートする因子であることが判明した。さらには、MEIKIN の KO マウスや Polo 様キナーゼの阻害剤で処理した生殖細胞において、*moa1* 破壊株同様に、一方向性結合の確立が不全になり、コヒースンの分解保護に欠損を示すことが明らかになった。よって、Spo13-Moa1-MEIKIN の三者が機能的なホモログであることが示唆された。また、他のグループの解析から、マウスにおいても減数第一分裂期における姉妹動原体のコヒースンによる融合が一方向性結合の確立に必要であることが示唆されており、今回の結果も踏まえると分裂酵母で明らかになって

きた機構が哺乳類においても保存されていることを強く示唆している。

コヒースンの分解保護に働く因子シュゴシンは、Bub1 によってリン酸化されたヒストン H2A によってセントロメアへとリクルートされる。また、体細胞分裂期における Bub1 は、動原体因子である Spc7 がキナーゼである Mph1 によってリン酸化されると Spc7 に結合して動原体へと局在化する。そこで、減数第一分裂期において Moa1 がどのようにセントロメアコヒースンの分解保護を制御するのか、その分子機構の解明を試みた結果、Moa1 によって局在化した Plk1 は、Mph1 と同様な Spc7 サイトをリン酸化し、Mph1 と同様に Spc7 と Bub1 との結合を促進することが明らかになった。また、*moa1 mph1* の二重破壊株では Bub1 およびシュゴシンのセントロメア局在やコヒースンの保護機能が消失した。また、この Polo 様キナーゼと Mph1 による協調的なシュゴシンの制御機構はマウス生殖細胞でも保存されていることが明らかになった。

さらに、分裂酵母をモデルとして CK1 が減数分裂期組換えに果たす役割の解析を通じて、減数分裂期組換えの開始に関わる機構の解析を行った。その結果、染色体上に点在し姉妹染色分体の接着を担うコヒースン複合体が CK1 によってリン酸化されること、さらにそれを目印に、減数分裂組換えの開始に必須な様々な因子群が染色体上へと連続的に集まってくる結果、組換え反応が開始されるという機構を明らかにした。この機構が失われると、減数分裂期組換えの著しい低下と共に、その後の染色体分配と配偶子形成も異常になることが明らかになった。コヒースン複合体やカゼインキナーゼの分子としての進化的保存性と同様、分裂酵母で今回明らかになった機構も進化的に保存されていることが期待される(下図)。

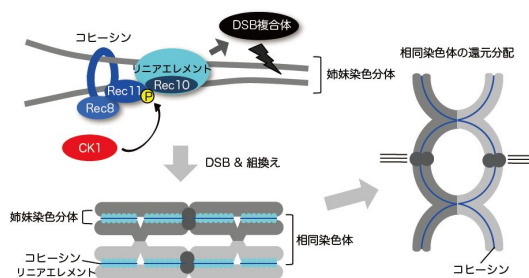


図2. CK1によるコヒースンのリン酸化を介した組換え制御機構

これら一連の成果により、減数第一分裂期における染色体分配の制御機構の理解が大きく進展したと考えられる。また、当初計画にあった一方向性結合の制御に必須な Polo 様キナーゼの基質に関しては、質量分析からコヒースン複合体内に複数のリン酸化残基を同定し、それらの非リン酸化およびリン酸化模倣型変異体を作製し表現型を

観察した。しかしながら、現時点では *moa1* 破壊株と同様な表現型を示す非リン酸化型変異株は得られておらず、これは今後の課題として残った。

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7件)

. Miyazaki S, Kim J, Sakuno T and Watanabe Y. Hierarchical regulation of centromeric cohesion protection by meikin and shugoshin during meiosis I. *Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol.: Chromosome Segregation & Structure*, 82, 033811 (2017) 査読有り
doi: 10.1101/sqb.2017.82.033811.

. Miyazaki S^s, Kim J^s, Yamagishi Y, Okada Y, Tanno Y, Sakuno T and Watanabe Y. Meikin-associated polo-like kinase specifies Bub1 distribution in meiosis I. *Genes to Cells*. 22, 552-567 (2017) 査読有り
doi: 10.1111/gtc.12496.

. Yamashita A, Sakuno T, Watanabe Y and Yamamoto M. Analysis of *Schizosaccharomyces pombe* meiosis. *Cold Spring Harbor Protocols*. pdb. top079855 (9) (2017) 査読有り
doi: 10.1101/pdb.top079855.

. Yamashita A, Sakuno T, Watanabe Y and Yamamoto M. Live imaging of chromosome segregation during meiosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cold Spring Harbor Protocols*. (9) pdb. prot091769 (9) (2017) 査読有り
doi: 10.1101/pdb.prot091769.

. Sakuno T and Watanabe Y. Phosphorylation of cohesin Rec11/SA3 by casein kinase 1 promotes homologous recombination by assembling the meiotic chromosome axis. *Developmental Cell*. 32, 220-230 (2015) 査読有り
doi: 10.1016/j.devcel.2014.11.033.

. Kim J^s, Ishiguro K^s, Nambu A, Akiyoshi B, Yokobayashi S, Kagami A, Ishiguro T, Pendas A.M, Takeda N, Kitajima T.S, Tanno Y, Sakuno T and Watanabe Y. Conserved meiotic protein MEIKIN promotes mono-orientation and centromeric

protection. *Nature* 517,466-471 (2015) 査読有り
doi: 10.1038/nature14097.

. 澁谷大輝、作野剛士 : 「減数分裂における染色体分配のメカニズム」(秀潤社), 細胞工学, 34, 1057-1062 (2015) 査読無し

^s equal contribution

[学会発表] (計5件)

. 学会名 : 第50回 酵母遺伝学フォーラム
発表年 : 2017年
発表者 : 作野剛士
演題 : コヒーシンを介した減数分裂期における染色体の高次構造形成機構

. 学会名 : The second international meeting on SMC proteins
発表年 : 2017年
発表者 : 作野剛士
演題 : Molecular mechanisms of cohesin-mediated chromosome axis assembly in meiosis.

. 学会名 : 第49回 酵母遺伝学フォーラム
発表年 : 2016年
発表者 : 作野剛士
演題 : コヒーシンを介した減数分裂期における染色体の高次構造形成機構

. 学会名 : 第48回 酵母遺伝学フォーラム
発表年 : 2015年
発表者 : 作野剛士
演題 : コヒーシンを介した減数分裂期における染色体の高次構造形成機構

. 学会名 : International Pombe meeting
発表年 : 2015年
発表者 : 作野剛士
演題 : Molecular mechanisms of cohesin-mediated chromosome axis assembly in meiosis.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

作野 剛士 (SAKUNO, Takeshi)
東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授
研究者番号 : 10504566