

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18477

研究課題名(和文) 卵母細胞における減数分裂前期の染色体の出会いを制御する分子メカニズム

研究課題名(英文) Understanding molecular mechanisms ensuring meiotic chromosome pairing and synapsis during meiotic prophase in meioticocytes

研究代表者

佐藤 綾 (Sato, Aya)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・特定研究員

研究者番号：40595112

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：減数分裂において染色体を分離する際、ホロセントリック生物である線虫は、2つの染色体領域(染色体の長腕と短腕)を確立し、それぞれの領域で染色体を切り離している。減数分裂前期、線虫の相同染色体は、各1個ずつ交叉を染色体上に形成し、交叉から見て近い方の染色体末端までが短腕、遠い方までの染色体末端までが長腕となる。我々は、一旦交叉が形成されると、リン酸化されたシナプトネマタンパク質 SYP-1と、それに結合するPLK-2キナーゼが、染色体短腕のみに局在し、これが染色体の非対称性(長腕と短腕)を確立するカスケードの上流にあたること、この短腕の確立が減数第一分裂に重要であることを発見した。

研究成果の概要(英文)：Accurate chromosome segregation in meiosis requires regulated two-step loss of cohesion between chromosomes to keep them together between the first and second meiotic divisions. While centromeres serve as the locus of cohesion retention in most organisms, the nematode *C. elegans*, which lacks single centromeres, has innovated special mechanisms to determine this locus de novo for each chromosome at each meiosis. We have shown that phosphorylation of the synaptonemal complex central element SYP-1 in early meiotic prophase is required for early steps in establishing the short and long arm distinction. Once crossovers are made, phosphorylated SYP-1 and its binding partner PLK-2 become asymmetrically localized to short arms. Our results show that PLK-2 bound to SYP-1 acts upstream of a mechanism that ensures confinement of the chromosome segregation machinery to the short arm subdomain and promotes correct segregation of chromosomes in meiosis I.

研究分野：染色体生物学

キーワード：減数分裂 線虫 シナプトネマタンパク質

1. 研究開始当初の背景

減数分裂の前期、まず、相同染色体同士が接触すると、未知の認識機構により相同性が認識される。次に、複数のタンパク質(シナプトネマ蛋白質と呼ばれる)が染色体間に重合し、相同染色体を安定に架橋する(この現象はシナプシスと呼ばれる)。減数分裂前期に、相同染色体が正しくペアになっていることが、減数第一分裂での正しい染色体分離に必須である。しかし、相同染色体同士が、お互いの DNA 配列の相同性を認識し、ペアになるメカニズムは未知である。特に、線虫では、染色体対合は相同組換えに全く依存しないことが知られている(Dernburg et al., Cell, 1999)。染色体間の Watson-Crick Base Pairing を介することなく、染色体が、自分と相同な配列の染色体を見つけるメカニズムは、未解明である。現在、染色体上にのったタンパク質同士の相互作用が、染色体同士をひっつかせるという仮説もあるが、確定的証拠はない。これまで、モデル生物での解析より、姉妹染色体結合因子コヒーシと、シナプトネマ蛋白質が、相同染色体の対合に必須であることが知られている(Ishiguro et al. EMBO 2011)。近年、習慣性流産の患者や、男性不妊症例に、減数分裂特異的コヒーシ(STAG3)の変異や、シナプシス蛋白質(SYCP3, HORMAD1)の変異が、有意に検出されることがわかった。減数分裂の失敗は、ヒトの不妊症や染色体異常などに繋がることから、相同染色体がペアになるメカニズムの解明は、喫緊の課題である。

申請者は、卵母細胞が豊富なモデル生物線虫を用いて、染色体対合に不具合の出る変異体を探索した(Sato-Carlton et al., PLOS Genetics 2014)。その結果、*pph-4* (*Ser/Thr protein phosphatase*) 変異株を発見し、本申請の前提となる以下の項目を発見した。

(1) 線虫 PPH-4 (*Ser/Thr* タンパク質脱リン酸化酵素)変異株が、非相同染色体間でシナ

プシスを起こすことを発見した。*pph-4* 変異株では、非相同な染色体同士がペアになってしまう。これは、野生型 PPH-4 タンパク質が、シナプシス蛋白質の重合を、相同染色体間に限定し、無差別なシナプシスを防いでいることを示す。

(2) *pph-4* phosphatase-dead 点変異株の解析より、PPH-4 のフォスファターゼ活性が機能に必須であることを示した。

(3) PPH-4 は、フォスファターゼなので、*pph-4* 変異株では、基質のリン酸化が増加するはずである。そこで、基質の候補を同定するために、*pph-4* 変異株と野生株を用いたリン酸化プロテオミクス解析を行った。その結果、*pph-4* 変異株でリン酸化が増加する、既知の減数分裂因子群：シナプトネマ蛋白質(SYP-1)を同定し、そのリン酸化配列 12 箇所も同定した。PPH-4 は、SYP-1 の脱リン酸化を介して相同染色体の対合を制御する可能性が示された。

2. 研究の目的

本研究は、SYP-1リン酸化の機能解析を突破口として、減数分裂前期に母方、父方の相同染色体が正しくペアになるメカニズムの解明を目指す。具体的には、以下の項目について研究を行う。

1. 前述のプロテオミクス解析から明らかになった、SYP-1タンパク質について、そのリン酸化の働きを、生化学的、遺伝学的、細胞生物学的に解析する。

2. SYP-1をリン酸化するキナーゼを、生化学的、細胞生物学的に探索する。フォスファターゼ PPH-4、基質群、キナーゼの機能的関係を、遺伝学的、細胞生物学的に明らかにし、この3者が、相同な染色体同士のペアの形成を保障し、正常な卵母細胞を生み出すメカニズムの全体像を明らかにする。

3. 研究の方法

基質候補タンパク質(SYP-1)のリン酸化部位を置換し、非リン酸化型(Ala 置換)、疑似リン酸化型(Glu, Asp 置換)の基質変異株をMos-SCI 法(Frokjaer, Nat. Method. 2008)で作製する。作製した基質因子の変異株を用いて、その表現型を解析し、基質の脱リン酸化・リン酸化修飾の機能を明らかにする。具体的には、(1)染色体対合を、ZIMタンパク質などの染色体対合マーカータンパク質に対する免疫染色を用いて定量化し、(2)シナプシスと交叉形成は、マーカータンパク質(HIM-3, COSA-1 などの免疫染色より解析する。

4. 研究成果

同定した 12 箇所の SYP-1 リン酸化部位の機能を明らかにするため、全 12 箇所に非リン酸化型置換(アラニン置換)を入れた線虫変異株(12A 株)を作製し、その表現型を解析した。この 12A 非リン酸化型変異株は、野生株と比較して約 40% 減少した progeny viability を示し、また、DAPI 染色で減数第一分裂期の染色体を観察すると、Anaphase chromosomal bridge が見られ、減数第一分裂に不具合を生じることを発見した。次に、免疫染色を用いて 12A 変異株の表現型解析を行った。この結果、12A 変異株において、相同染色体のペアリングは正常なタイミングで起こっているが、シナプシス(シナプトネマタンパク質の重合)は野生株に比べて少し遅れることがわかった。しかしながら、12A 変異株では、遅れながらも減数分裂前期パキテン期の最後には、シナプシスも完了し、交叉もほぼ野生株と同じレベルで形成されることから、これら減数分裂前期のザイゴテン期、パキテン期に見られる減数分裂進行の遅れだけでは、40%の不妊率を説明できないことが明らかとなった。そこで、次に、減数分裂の直前にあたる、前期のディプロテン期、ディアキネシス期の染色体構造を可視化し

たところ、本来、ディアキネシス期までに確立させているべき染色体の短腕と長腕の区別が 12A 変異株では、確立されていないことがわかった。

減数分裂における染色体分離は、二段階の分離(第一段階における相同染色体の分離と、第二段階における姉妹染色体の分離)を必要とする。セントロメアが一箇所に限定されるモノセントロメリック生物は、セントロメアと、セントロメア以外の染色体領域に分けてこの二段階分離を実現するが、ホロセントリック生物(セントロメアが染色体全体につくられる)である線虫は、この2つの染色体領域(染色体の長腕と短腕)を、生殖核ごとに決定することで、減数分裂を実現している。減数分裂前期に、線虫の相同染色体ペアは、必ず1つの交叉を形成することが知られており、この交叉から見て近い方の染色体末端までが染色体短腕、遠い方の染色体末端までが長腕になり、いくつかの染色体結合タンパク質が短腕特異的、もしくは長腕特異的に局在することが知られている。例えば、野生株では、ディプロテン、ディアキネシス期には、短腕局在タンパク質(SYP-1, -2, -3 タンパク質)、長腕局在タンパク質(HTP-1/2)がそれぞれの腕に非対称に局在し、これが最終的に、短腕、長腕において染色体を物理的につないでいるコヒーシン分子の分解を誘導する染色体因子 CPC(chromosomal passenger complex)複合体の短腕局在に繋がる。12A 変異株では、短腕、長腕特異的に局在すべきこれらの SYP や HTP-1/2 タンパク質が、短腕、長腕両方に局在しており、腕の区別がつかないことから、最終的にコヒーシンを分解するエリアを指定する CPC 複合体が、染色体短腕に局在できなくなるため、染色体分離に不具合がでることを発見した。

また、12A と並行して、リン酸化部位をグルタミン酸やアスパラギン酸に置換した、疑似リン酸化型変異株 12D, 12E 線虫株も作製し

たが、これらの表現型は、12A と全く同一であるため、グルタミン酸やアスパラギン酸置換が、リン酸化を擬似しておらず、異なるアミノ酸置換の非リン酸型変異の一つであることが示唆された。

次に、この12箇所のリン酸化の機能を詳細に調べるため、12箇所中、10箇所、8箇所、4箇所、2箇所、1箇所、にそれぞれ非リン酸化型のアラニン置換を入れた線虫変異株を作製し、その表現型を解析した。その結果、452番目のスレオニンのリン酸化が重要であり、その他のリン酸化部位は、アラニンに置換しても、ほとんど野生型と変わらない表現型を示すことがわかった。この452番目のスレオニンは、Polo キナーゼの結合配列を持っており、この Thr452 が他のキナーゼにリン酸化された場合、Polo キナーゼがこの結合配列に結合し、さらに周辺の分子をリン酸化することが予測された。そこで、Thr452をアラニン置換したT452A変異株において、線虫 Polo-like kinase 2 (PLK-2)の局在を免疫染色で解析した。野生株では、PLK-2は、パキテン期に SYP-1 と共局在し、シナプトネマ複合体に局在する。しかしながら *syp-1(T452A)*変異株では、予想通り、PLK-2はシナプトネマ複合体には局在できなかったため、野生株においてリン酸型 SYP-1 は、PLK-2 の結合箇所を作っていると考えられる。この *syp-1(T452A)*変異株の表現型は、前述の *syp-1(12A)*変異株と同様で、シナプシスの遅れが見られるが、交叉はほぼ野生株と同じレベルで形成されており、一方、ディプロテン、ディアキネシス期における短腕、長腕特異的なタンパク質の局在に不具合が出るのがわかった。

染色体分離面を指定する CPC 複合体を、染色体短腕に誘導するカスケードを明らかにするため、他のモデル生物で CPC 複合体の結合を誘導することが知られているヒストン H3 リン酸化型 H3Thr3(H3Thr3Phos)の局在を

免疫染色で解析したところ、線虫の減数分裂期染色体においても、H3Thr3Phos シグナルは、CPC 複合体と共局在することから、線虫においても H3Thr3Phos に CPC 複合体が結合していることが示唆された。さらに、*syp-1(12A or T452A)*などの変異株では、この H3Thr3Phos シグナルが有意に減少しており、CPC 複合体の短腕局在も有意に減少していることから、SYP-1 リン酸化が、CPC 複合体の誘導に必要なヒストン修飾をもたらすのに重要であることを明らかにした。次に、他のモデル生物では、H3Thr3Phos は、PP1 フォスファターゼにより脱リン酸化されていることから、線虫においてもこの脱リン酸化のメカニズムが保存されているかどうかを検証した。予想通り、線虫 PP1 変異株では、H3Thr3Phos シグナルが有意に増加したため、線虫でも H3Thr3 は PP1 に脱リン酸化される可能性が示唆された。

SYP-1 リン酸化のタイミングをさらに解析するため、リン酸型 SYP-1 に特異的な抗体を作製し、免疫染色解析を行った。リン酸型 SYP-1 は、減数分裂前期のはじめから pan-SYP-1 (全 SYP-1 を検出する抗体) と共局在し、シナプトネマ複合体全長に見られた。その後、減数分裂前期が進行し、パキテン期に交叉が形成されると共に、長腕からはリン酸型 SYP-1 のシグナルが失われ、短腕のみにリン酸型 SYP-1 のシグナルが検出された。この非対称なリン酸型 SYP-1 の分布は、交叉形成と、PLK-2 の存在に依存しており、交叉の形成できない *spo-11* 変異株や、*plk-2* 変異株では、リン酸型 SYP-1 がシナプトネマ複合体の全長に局在したままで、短腕への局在ができないことを明らかにした。

以上の結果より、SYP-1 リン酸化は、減数分裂前期における染色体の非対称性確立に機能することで、染色体分離、そして正常な生殖細胞の産出に貢献することが明らかになった。

上記の内容は、現在、論文投稿準備中である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Aya Sato and Peter Mark

Carlton. " Phospho-regulation of the SYP-1 protein ensures meiotic chromosome segregation " International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function, Awaji, Japan (Aug 2015)

〔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

<https://www.carltonlab.org/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

佐藤 綾 (SATO, Aya)

京都大学生命科学研究科 特定研究員

研究者番号： 40595112

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

Carlton Peter (CARLTPN, Peter)

京都大学生命科学研究科 准教授

研究者番号： 20571813