

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月16日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22770001

研究課題名（和文） 高等動物における新規の減数分裂特異的染色体分配因子の解析

研究課題名（英文） Study on a novel meiosis specific chromosomal factor in vertebrate

研究代表者 石黒 啓一郎

(Ishiguro Kei-ichiro)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：30508114

研究成果の概要（和文）：マウス精巣から、生殖細胞特異的に発現する新規コヒーシンスブユニットRad21Lを同定するに至った。減数分裂の前期において相同染色体の上でRad21LはRec8と相互排他的なパターンを示していることが判明した。それぞれのコヒーシンの欠損マウスを用いて、シナプトネマ複合体の形成過程について解析を行った。その結果、Axial Element構造および相同染色体の対合に部分的な異常が見られ、さらにRAD21LおよびREC8の二重欠損株ではAxial Elementの形成および相同染色体の対合がほぼ完全に消失していることが判明した。

研究成果の概要（英文）： We identified a novel cohesin subunit RAD21L which is specifically expressed in meiotic prophase. The meiosis-specific cohesins REC8 and RAD21L have been shown to localize along axial elements in a mutually exclusive manner until pachytene in mammalian meiosis. We examined the processes of axial element (AE) formation by comparably analyzing Rec8KO, Rad21LKO and Rec8/Rad21L double KO. Disruption of both REC8 and RAD21L abolishes AE formation, suggesting that meiotic cohesins are essential for AE formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：減数分裂

染色体

生殖細胞

コヒーシン

## 1. 研究開始当初の背景

生殖細胞の減数分裂における染色体分配は、相同染色体どうしの対合による二価染色体の形成と引続いて起こる連続した2回の染色体分離を経て行われ、体細胞に見られる均等分裂のそれと著しく異なる。体細胞分裂では、複製された姉妹染色分体は、その動原体部分で反対方向からのスピンドル微小管により引っ張られるのに対し、減数第一分裂では姉妹染色分体が同一極からのスピンドル微小管によって捕らえられ、対合していた父方と母方由来の相同染色体は反対方向へ分配されることになる（紡錘体微小管の一方方向性結合）。次いで減数第二分裂では体細胞分裂と同様の様式で姉妹染色分体の均等分裂が起きる。体細胞分裂と比較した場合、減数分裂では第一分裂に見られる還元型の染色体分配過程が余分に挿入されているだけで、ここにゲノムを半分にする減数分裂と体細胞分裂との本質的な違いがある。減数分裂前期においてコヒーシ複合体は姉妹染色分体の接着のみならず、Axial Elementと呼ばれる染色体軸構造の形成・減数分裂組換え・シナプトネマ複合体の形成など、この時期に特有の染色体構造変換の素過程においても何らかの役割を果たすものと推定されているが、その詳細は依然不明のままである。とりわけ減数分裂期に見られる染色体構造の変換は、正常な染色体分配に必須の役割を果たしている。もしこの機構が破綻した場合、相同染色体の分配エラーが生じる結果、正常とは異なる染色体数を持つ配偶子（卵・精子）が生じてしまう。本研究分野では、減数第一分裂期の染色体構造を構成する因子の同定とその機能解明が長年の懸案とされていた。

## 2. 研究の目的

本研究では高等動物における減数分裂と

体細胞分裂の染色体分配の素過程の違いを生み出すメカニズムの解明を目的とする。とりわけ減数分裂特異的に染色体分配および相同染色体の構造形成に寄与する新規の因子の同定とその分子レベルの解析を試みた。さらに本研究ではこれらの因子の機能欠損マウスの解析を通して、減数分裂過程の染色体構造形成と相同染色体の対合過程に及ぼす影響を検討した。これらの研究を通して減数第一分裂期の染色体構造を規定するメカニズムを明らかにしようと試みた。

## 3. 研究の方法

(1) affinity 精製と質量分析法による新規染色体タンパク質の同定

マウス精巣からセントロメアタンパク質 CENP-C に対する抗体を用いた affinity 精製と質量分析法により染色体を構成するタンパク質の同定を行った。

(2) RT-PCR 法を用いた発現組織の特異性の検討

スクリーニングで得られた候補となる因子については、RT-PCR 法を用いて発現組織の特異性について検討し、生殖細胞に特異的な発現を示すものに焦点を絞った。特に精巣と卵巣においてのみ発現を示すものがないか検討を行った。

(3) 免疫蛍光染色法を用いた新規染色体因子の局在の検討

これらの因子に対する抗体を作製して、免疫蛍光染色法を用いて、生殖細胞の染色体における局在と発現時期について検討を行った。オス精巣より精原細胞を、また胎児期メス卵巣より減数分裂前期の卵原細胞を分取し染色体上の局在について検討を行った。

(4) 遺伝子欠損マウスの作製と解析

in vivo における機能解析を行うため、RAD21L 遺伝子欠損マウスの作製に着手した。さらに Rec8 遺伝子欠損マウスとともに比較解析を行った。

## 4. 研究成果

マウス精巣クロマチン分画から生殖細胞特異的に発現する新規コヒーシサブユニット Rad21L を同定するに至った。免疫染色法を用いた染色体上の局在パターンについて検討を行った結果、RAD21L 型および REC8 型コヒーシ複合体は減数分裂初期の Leptotene から mid-pachytene にかけて、相

同染色体上において相互排他的なバーコード様の局在パターンを示すことが明らかとなった。この局在パターンから、2本の相同染色体のペアリングおよび対合を促進する上で、減数分裂特異的なコヒーシンが積極的な役割を果たしている可能性が示唆された (cohesin barcode 仮説)。さらに RAD21L または REC8 欠損マウスを用いて減数分裂初期の染色体構造について比較検討を行った。その結果、それぞれのコヒーシンの欠損により、Axial Element 構造および相同染色体の対合に部分的な異常が見られ、さらに RAD21L および REC8 の二重欠損株では Axial Element の形成および相同染色体の対合がほぼ完全に消失した。

#### 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 4 件)

(1) Kim J., Ishiguro K., Kudo N., Watanabe Y. Meiosis specific cohesins in mouse embryonic oocytes. **Methods in Molecular Biology** (2013) 957: 47-57. 査読有り

(2) Morimoto A, Shibuya H, Zhu X, Kim J, Ishiguro K., Han M, Watanabe Y. A conserved KASH domain protein associates with telomeres, SUN1, and dynactin during mammalian meiosis. **J Cell Biol.** (2012) 198:165-172. 査読有り

(3) Ishiguro K., Kim J., Fujiyama-Nakamura S., Kato S., Watanabe Y. A new meiosis-specific cohesin complex implicated in the cohesin code for homologous pairing: **EMBO report** (2011) 12 267-275 査読有り

(4) Tanno Y., Kitajima T., Honda T., Ando Y., Ishiguro K., Watanabe Y.: Phosphorylation of mammalian Sgo2 by Aurora B recruits PP2A and MCAK to centromeres: **Genes&Development.** 24, 2169-2179 (2010) 査読有り

[学会発表] (計 8 件)

(1) Kei-ichiro Ishiguro, Jihye Kim, Abrahan Hernandez, Aussie Suzuki, Tatsuro Fukagawa, Christer Höög, Yoshinori Watanabe.

Cohesin mediates DSB-independent homolog pairing in mouse meiosis 2012年12月13日 日本分子生物学会ワークショップ (福岡)

(2) Jihye Kim, Kei-ichiro Ishiguro, Watanabe Y. :PLK1 might regulate centromeric protection and mono-orientation at meiosis I in mouse oocyte 2012年12月13日 日本分子生物学会ワークショップ (福岡)

(3) 澁谷 大輝、石黒 啓一郎、渡邊 嘉典: 減数分裂期特異的な新規テロメアタンパク質によるコヒーシンを介した染色体動態の制御 2012年12月12日 日本分子生物学会ワークショップ (福岡)

(4) Kei-ichiro Ishiguro, Jihye Kim, Abrahan Hernandez, Aussie Suzuki, Tatsuro Fukagawa, Christer Höög, Yoshinori Watanabe. The REC8- and RAD21L-cohesins promote the initial homolog pairing in mouse spermatocytes. Gordon Research Conference (New Hampshire, U.S.A.) 2012年6月3日

(5) 石黒啓一郎、金智慧、鈴木應志、深川竜郎、渡邊嘉典: 減数分裂特異的コヒーシン複合体の相同染色体のペアリング過程における役割 2012年1月27日 染色体ワークショップ (仙台)

(6) Kei-ichiro Ishiguro, Jihey Kim, Sally Fujiyama, Shigeaki Kato, Yoshinori Watanabe A novel meiosis specific MeiRad21L cohesin is implicated in “cohesin code” for chromosome dynamics in mammalian meiosis 2011年1月11日 染色体ワークショップ (小松)

(7) Kei-ichiro Ishiguro, Jihye

Kim, Fujiyama-Nakamura S., Kato S.,  
Watanabe Y. Identification and  
characterization of a novel cohesin subunit  
in vertebrate meiosis. ENS de Lyon-  
Workshop (Lyon, France) 2010年11月9日

(8) Keiichiro Ishiguro, Jihey Kim, Sally  
Fujiyama, Shigeaki Kato, Yoshinori  
Watanabe: Identification and  
characterization of a novel cohesin subunit  
in vertebrate meiosis 2010年12月10日 日  
本分子生物学会 (神戸)

〔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

石黒 啓一郎 (ISHIGURO KEI-ICHIRO)  
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教  
研究者番号：30508114

### (2) 研究分担者

無し ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者  
無し ( )

研究者番号：