

平成 27 年 5 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23688036

研究課題名(和文) 哺乳類減数分裂におけるコヒーシンとコンデンシンの役割

研究課題名(英文) Roles of cohesin and condensin in mammalian meiosis

研究代表者

李 智博 (LEE, Jibak)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50372660

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 16,900,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類の減数分裂における染色体の動きを制御する分子メカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。マウス卵母細胞およびマウス初期胚において、コンデンシンIとIIと呼ばれる2種類のタンパク質複合体が染色体の凝縮と分離に関与することを初めて示した。また、染色体の接着に必要なコヒーシンと呼ばれるタンパク質複合体には、減数分裂時に特殊なサブユニットRAD21LとREC8が発現することが知られているが、両方のタンパク質の染色体上の詳細な局在位置を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study is to reveal the molecular mechanism underlying chromosome behavior during meiosis in mammals. We revealed for the first time that condensins I and II are involved in chromosome condensation and segregation during meiosis and early embryonic development in mice. We also showed the detailed localization of meiotic cohesin subunits, RAD21L and REC8, both of which are known to be essential for synapsis and recombination of homologous chromosomes in mammalian meiosis.

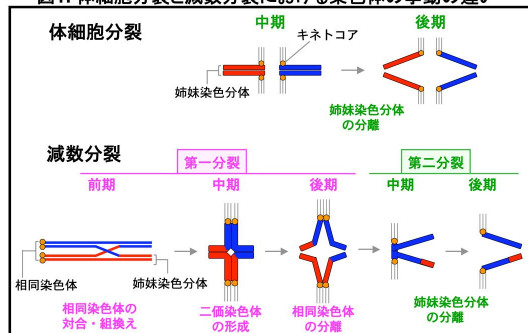
研究分野：発生工学

キーワード：減数分裂 染色体 コヒーシン コンデンシン 卵母細胞 精母細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 減数分裂は、次世代に遺伝情報を伝える生殖細胞だけが行う特殊な分裂である。しかし現存するほとんどの動植物が減数分裂を伴う生殖を行うことから明らかなように、種の進化と保存を支える普遍的な生命現象であると言える。減数分裂では、染色体数を半減するために、DNA複製後に2段階の分裂が起こり、とりわけ第一減数分裂では染色体は特徴的な動きを示す。すなわち、前期における相同染色体の対合・組換え、中期における二価染色体の形成、後期における相同染色体の分離が、第一減数分裂と、体細胞分裂や第二減数分裂とを異質なものにしている(図1)。

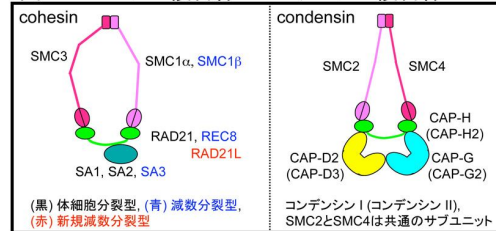
図1. 体細胞分裂と減数分裂における染色体の挙動の違い



(2) 近年、体細胞分裂において、姉妹染色分体の接着を担うコヒーシン複合体や染色体の構築に関与するコンデンシン複合体(図2)が発見され、酵母からヒトまでその基本的な構造や機能は保存されていることが分かってきた。申請者は、これらタンパク質複合体にいち早く着目し、哺乳類減数分裂の系において解析してきた。まず、減数分裂特異的コヒーシンサブユニット REC8 をマウスの精母細胞や卵母細胞を材料に解析し、REC8の染色体腕部からの消失およびセントロメア部分からの消失が、それぞれ第一減数分裂における相同染色体の分離と第二減数分裂における姉妹染色分体の分離を引き起こすことを明らかにした(Leeら、2002、2003、2006)。また、第一減数分裂において相同染色体が分離するとき、shugoshin(Sgo2)タンパク質が、セントロメア部分のREC8を保護することによって、姉妹染色分体の接着が維持されることを証明した(Leeら、2008)。これらの研究成果により、哺乳類減数分裂における染色体の接着・分離の機構については、その理解が大き

く進展した。一方、第一減数分裂前期に起こる相同染色体の対合・組換え、第一減数分裂中期における二価染色体の構築と姉妹キネトコアの同一方向性の確立に関しては、その分子メカニズムはほとんど分かっていない。

図2. コヒーシン複合体とコンデンシン複合体



2. 研究の目的

本申請課題では、以下のことを明らかにすることを目的とする。

- (1) 相同染色体の対合と組換えにおける RAD21L の役割と3種類のコヒーシンの時空間制御機構
- (2) 減数分裂におけるコンデンシン I とコンデンシン II の個々の役割

3. 研究の方法

第一減数分裂前期において3種類のコヒーシンがどのような時空間制御を受けているかを明らかにするため、次世代光学顕微鏡を用いた観察とChIP-Seq法による解析を行い、各コヒーシンのシナプトネマ構造におけるジオメトリーとゲノムワイドな局在位置を決定する。また、免疫沈降法とLC-MS/MS解析により、減数分裂型コヒーシンと相互作用するタンパク質を探索する。さらに、RAD21L や2つのコンデンシンの減数分裂における機能を調べるため、抗体による機能攪乱実験や、ロックアウトマウス(RAD21L:コンベンショナル、コンデンシン:コンディショナル計3種類)を作製し、その表現型を解析する。

4. 研究成果

(1) 減数分裂における二価染色体構築の分子メカニズムを明らかにするため、各種のコンデンシンサブユニットに対する抗体を作製し、マウス卵母細胞におけるコンデンシンIとコンデンシンIIの発現パターンを明らかにした。また、マウス卵母細胞に抗体をインジェクションすることにより、コンデンシンの機能を攪乱した。その結果、コンデンシンIとIIはともに、二価染色体の正常な構築や姉妹キネトコアの同一方向性の確立に必要であることを示唆する結果が得られた。この成果は、Mol Biol Cell誌 [vol 22 (18)]に掲載され、その号の表紙にも採用された。

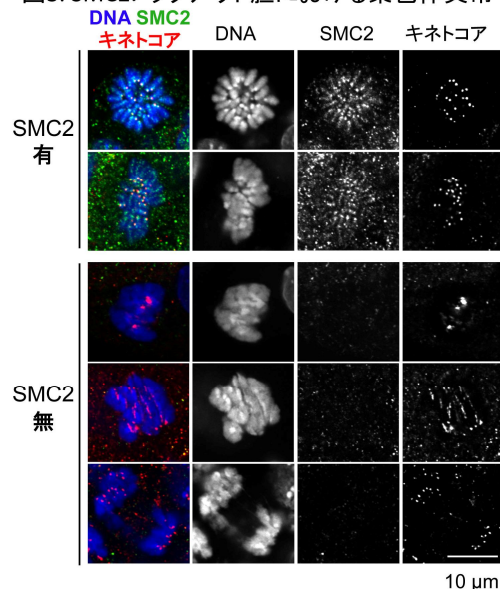
(2) これまでの結果から、減数分裂期コヒーシンサブユニットのRAD21LとREC8は相同染色体の対合・組換えの場となるシナプトネマ複合体上で、お互いに排他的に局在することが示唆されている。従来の顕微鏡よりも分解能の高い次世代光学顕微鏡システム3D-SIMを用いて、シナプトネマ複合体におけるRAD21LとREC8の位置関係を調べた。その結果、対合状態の相同染色体において、RAD21LとREC8は必ずしも鏡像の局在を示さなかった。このことは、RAD21LあるいはREC8を含むコヒーシンの位置は染色体全体に渡って固定的に決まっているわけではないことを意味する。また、対合状態の2本の軸構造(axial elements)のより内側にRAD21LもREC8も局在するが、RAD21Lの方がより内側に局在する傾向が見られた。さらに、組換え中間体であるMSH4とのシグナルのオーバーラップ率は、RAD21Lの方がREC8よりも高かった。このような局在の違いはRAD21LとREC8がそれぞれ独自の機能を持つことを示唆しており、RAD21Lが組換えにより深く関与することを暗示している。

(3) 上記のコヒーシンサブユニットのゲノムワイドな局在位置を明らかにするために、精巢抽出液を材料に、ChIP-Sequence解析を行った。体細胞分裂型のコヒーシンサブユニットRAD21に対する抗体を用いた解析では、これまでにヒトHeLa細胞で報告されているモチーフ配列と同様のDNA塩基配列を抽出することができた。一方、RAD21LやREC8に対する抗体を用いた場合には、そのような配列を抽出できなかった。このことは、減数分裂型コヒーシンには、ゲノム上で特に集積しやすい塩基配列モチーフが存在しないか、解析上のなんらかの問題のためにモチーフ抽出には至っていない可能性を示唆している。RAD21LやREC8は、本申請課題の進行中に、別の国内外の研究グループにより、ノックアウトマウスを利用して減数分裂前期の相同染色体の対合と組換えに非常に重要な働きがあることが示されたが、両者のゲノム上の局在を決める分子メカニズムについては手がかりがない。今後、さらにChIP-Sequence法の解析系を改良して、両者のゲノムワイドな局在位置を調べる必要がある。

(4) コンデンシン I とコンデンシン II の共通のサブユニットである SMC2 のノックアウトマウスを用いて、初期胚発生過程におけるコンデンシンの機能解析も行った。*Smc2* 遺伝子ホモ欠損マウスは生まれなかったことを確認した。そこで、初期胚の発生過程を調べた結果、胚盤胞期の *Smc2* ノックアウト胚において様々な染色体態異常(個別化異常, 凝縮不全, 分離異常)を示す分裂期細胞の割合が高

かった(図3)。これらの結果から、哺乳類の初期胚発生過程において、コンデンシンは染色体の正常な形成と分離に必須であることが示唆された。また、*Smc2* ノックアウト胚においては、間期核内のヘテロクロマチンの配置にも、野生型胚と比較して差異が見られた。このことは、コンデンシンが、マウス初期胚において、間期核内のクロマチン配置にも関与することを示唆している。

図3. SMC2ノックアウト胚における染色体異常



今後の展望として、コンデンシンの減数分裂の前期における役割や、コンデンシン I と II の機能差を明らかにするために、それぞれに固有のサブユニットに対するコンディショナルノックアウトマウスを利用して、生体内機能の解析を行う予定である。

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 2 件)

Jibak Lee, Roles of cohesin and condensin in chromosome dynamics during mammalian meiosis, *J. Reprod. Dev.*, 2013, 59 巻, 431-436, 査読有

Jibak Lee, Sugako Ogushi, Mitinori Saitou, Tatsuya Hirano, Condensin I and II are essential for construction of bivalent chromosomes in mouse oocytes, 2011, 22 巻, 3465-3477, 査読有

DOI: 10.1091/mbc.E11-05-0423

[学会発表](計 10 件)

清水 萌子, 李 智博, マウス初期胚におけるコンデンシンサブユニット SMC2 の機能解析、日本畜産学会第 118 回大会、2014.3.26-29、つくば国際会議場(茨城県)

李 智博、美 栄、マウス卵母細胞におけるコヒーシンの解析、第 45 回精子研究会・神戸大学重点研究チーム学術講演会、2014.1.11、神戸大学統合研究拠点コンベンションホール（兵庫県）

松浦 倫子、李 智博、マウス発育前卵母細胞におけるコヒーシンサブユニット RAD21L および RAD21 の発現解析、第 106 回日本繁殖生物学会大会、2013.9.12-14、東京農工大学（東京都）

美 栄、松田 厚志、平岡 泰、李 智博、マウス精母細胞における減数分裂型コヒーシンの詳細な局在位置、第 106 回日本繁殖生物学会大会、2013.9.12-14、東京農工大学（東京都）

李 智博、マウス減数分裂における染色体動態の制御機構、分子細胞生物学セミナー、北海道大学先端生命科学研究院、2013.5.14、北海道大学先端生命科学研究院（北海道）

李 智博、減数分裂前期における染色体上のコヒーシンの位置、生殖系列の世代サイクルとエピゲノムネットワーク 第5回公開シンポジウム、2012.11.22、京都大学医学部芝蘭会館（京都府）

Jibak Lee、Regulation of meiotic chromosome dynamics by cohesin, condensin, and shugoshin in mouse oocytes, EMBO Workshop “Cell Biology of Early Mouse Development”、2012.9.10、Fitzwilliam College (Cambridge, UK)

李 智博、なぜコヒーシンとコンデンシンなのか？、生殖サイクル若手勉強会 2012、2012.7.27、秋保リゾート ホテルクレセント（宮城県）

李 智博、マウス卵母細胞の二価染色体構築におけるコンデンシン I と II の役割、第 29 回染色体ワークショップ、2012.1.27、仙台秋保温泉 ホテルニュー水戸屋（宮城県）

李 智博、減数分裂特異的な新規コヒーシンサブユニット RAD21L の動態、第 104 回日本繁殖生物学会大会、2011.9.15、いわて県民情報交流センター・アイーナ（岩手県）

〔図書〕(計 1 件)

李 智博、平野 達也 他、化学同人、染色体と細胞核のダイナミクス DNA を操る細胞の仕組み、2013、236 (95-114)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.kobe-u.ac.jp/~jibaklee/>

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