

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770173

研究課題名(和文) 減数第一分裂を第二分裂に切り替える分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms for converting meiosis I to meiosis II

研究代表者

北島 智也 (Kitajima, Tomoya)

独立行政法人理化学研究所・発生・再生科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号：00376641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：減数第一分裂から第二分裂への移行期において、姉妹動原体ペア間の接着は解離することが知られている。本研究では、その解離のための分子機構を解明することを目的とした。マウス卵母細胞において動原体動態を高解像度ライブイメージングし、姉妹動原体ペア間の距離の変化を計測したところ、第一分裂の開始とほぼ同時に姉妹動原体ペア間の接着の解離が起こることが分かった。また、動原体部位においてRec8コヒーシンを切断するセパレーズの強い活性化が認められた。これらの結果は、セパレーズが動原体においてRec8コヒーシンを切断することで姉妹動原体ペア間の接着が解離するという仮説を支持する。

研究成果の概要(英文)：Cohesion between sister kinetochores is known to be released during the transition from meiosis I to meiosis II. This study aimed to reveal molecular mechanisms for the release of sister kinetochore cohesion. Live imaging of kinetochores at high resolution in living mouse oocytes indicated that sister kinetochores separated at the onset of anaphase I. Moreover, a newly developed biosensor detected a high activity of separase which cleaves Rec8 cohesin. Thus, these data support the idea that the release of sister kinetochore cohesion is mediated by cleavage of Rec8 by separase.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、分子生物学

キーワード：卵母細胞 ライブイメージング 動原体 染色体動態 減数分裂

1. 研究開始当初の背景

減数分裂は、二回の連続した細胞分裂（減数第一分裂と第二分裂）のそれぞれにおいて染色体分配を行うことで、染色体数を半減化し半数体の配偶子を形成する過程である。減数第一分裂においては相同染色体が分配されるのに対し、第二分裂においては姉妹染色分体が分配される。したがって、第一分裂から第二分裂へ移行する際には、染色体分配のためのメカニズムが変換される必要があると考えられる。

そのような変換として最も重要と考えられる一つが、姉妹動原体の構造変換である。第一分裂においては、姉妹動原体はタイトに接着して相同染色体の分配を助け、一方で第二分裂においては、姉妹動原体は離れ、姉妹動原体の分配を助けていると考えられている。すなわち、第一分裂から第二分裂へ移行する間に、姉妹動原体間の接着が解離するという構造変換が起こっているはずである。しかしながら、その解離のタイミングやメカニズムの詳細は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、減数第一分裂から第二分裂への以降において、姉妹動原体間の接着が解離する分子機構を明らかにすることを目的とした。さらに接着の解離がタイミング良く起こることが、第二分裂における効率的な紡錘体の形成に必要である可能性を検討した。

(1) まず、姉妹動原体間の接着が解離するタイミングを正確に記述することを目指した。これまでの抗体染色による結果から、減数第一分裂の後期にはすでに姉妹動原体間の接着が解離していることが知られているが、数十分にわたる第一分裂後期のどのタイミングで、どのようなキネティクスで姉妹動原体が別れていくのかは知られていない。

(2) 次に、姉妹動原体間の接着を解離させる実行因子を同定することを目指した。姉妹動原体間の接着の解離が減数第一分裂後期において起こるのであれば、この時期に特異的に活性化する分裂後期促進複合体(APC/C)やタンパク質切断酵素セパレーズが候補に挙がる。姉妹動原体間の接着を担うのは減数分裂特異的な染色体接着因子コヒーシン複合体であることが示唆されている(Sakuno et al 2009 Nature)。そこで本研究では、まずコヒーシンを標的とするタンパク質切断酵素であるセパレーズを、姉妹動原体間の接着の解離の実行因子として第一候補に挙げ、その可能性の検討を行った。セパレーズが動原体において実際に活性があるかは知られていないため、まずこの点について解析した。

(3) さらに、姉妹動原体間の接着のタイミング良い解離が、減数第二分裂の染色体分配のための効率的な準備に必要である可能性に

ついて検討した。特に、第二分裂における紡錘体形成の効率について解析を行った。

(4) また、動原体機能および紡錘体形成を制御するマスター因子の一つである Plk1 キナーゼの機能解析を通じて、姉妹動原体解離と紡錘体形成の時空間制御機構を理解することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 姉妹動原体間の接着が解離するタイミングの同定には、マウス卵母細胞における高解像度ライブイメージング(Kitajima et al, Cell 2011)を用いた。蛍光動原体マーカーEGFP-CENP-C と染色体マーカーH2B-mCherry をコードする RNA を試験管内合成した。卵核胞期にある卵母細胞に合成した RNA を顕微注入し、数時間培養して RNA から蛍光マーカーが翻訳されるのを待った後、培地を交換して卵母細胞の減数第一分裂を再開させた。

培地交換からおよそ7時間後に、卵母細胞をレーザー走査型共焦点顕微鏡下におき、培養を継続した。蛍光マーカータンパク質を発現する卵母細胞のうち、減数第一分裂中期にあり、染色体の中期板が焦点面に平行なものを選択してライブイメージングを行った。

取得した画像を Fiji ソフトウェアを用いてバックグラウンド削減・ピーク増強のためのフィルタリング処理をした後、Imaris ソフトウェアにより三次元再構築した。すべての動原体の位置を検出し、それらの動きを三次元空間内でトラッキングした。これにより、動原体の位置情報を包括的に取得した。このデータをもとに、姉妹動原体間の距離を測定し、その時間変化を解析した。

(2) セパレーズが実際に動原体部位で活性化されているかを検討するために、セパレーズの局所的な活性をモニターできる新規プローブを開発した。この開発のための戦略は、すでに体細胞分裂において報告されたセパレーズ活性センサー(Shindo et al 2012 Dev Cell)のデザインを参考にした。減数分裂においてセパレーズの標的になる減数分裂特異的コヒーシンサブユニットである Rec8 の断片をサブクロニングし、その N 端側に EGFP を、C 端側に mCherry を融合させ、さらに mCherry の C 端側に動原体タンパク質 CENP-C を融合させるコンストラクト(EGFP-Rec8-mCherry-CENP-C)を作製した。これをコードする RNA を卵母細胞に顕微授精し、減数第一分裂再開の誘導後に顕微鏡下に置き、培養を継続したまま、EGFP と mCherry のシグナルを撮影した。

(3) 紡錘体形成の過程を詳細に記述するために、微小管マーカーEGFP-MAP4 と染色体マーカーH2B-mCherry を用いてライブイメージングを行った。得られた画像を Imaris ソフト

ウェアで三次元構築し、紡錘体の形状に対するパラメータを取得した。

(4) Plk1 機能解析のために、特異的阻害剤である BI2536 を用いた。BI2536 を含む培地において、EGFP-CENP-C と H2B-mCherry の挙動を高解像度ライブイメージングを行い、動原体を三次元追跡した。それにより得られた動原体の位置情報を定量的に解析することにより、Plk1 が染色体動態に果たす機能を探った。

4. 研究成果

(1) 減数第一分裂後期における動原体動態について時空間的高解像度でライブイメージングを行った。すべての動原体を三次元空間内で追跡することで、包括的に姉妹動原体間の距離変化を計測した。第一分裂後期においては、相同動原体が紡錘体の両極へ移動することによって染色体が分配される。この相同動原体間の距離変化を測定することで、分裂後期の開始時間を決定した。また、姉妹動原体間の距離の変化を計測し、0.3 μ m 以上離れているものを分離したものと定義した(図1)。この解析から、姉妹動原体の分離は減数第一分裂の開始とともに起こり、数分という極めて短い時間で完了することが明らかになった。

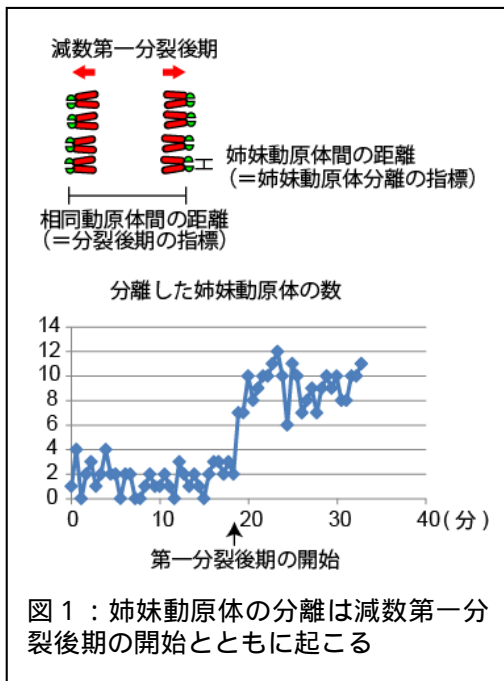


図1：姉妹動原体の分離は減数第一分裂後期の開始とともに起こる

(2) 上記の結果から、姉妹動原体間の接着を解離させる因子は、分裂後期の開始時に急激にその活性が上昇するものであることが考えられた。解離因子の候補として挙げた APC/C とセパレーズのうち、APC/C は第一分裂中期から後期開始まで数時間かけてその活性が上昇する (McGuinness et al, 2009 Curr Biol) のに対し、セパレーズは体細胞分裂後期開始に急激にその活性が上昇する(Shindo

et al, 2012 Dev Cell)ことが知られている。したがって、セパレーズが姉妹動原体間の接着を解離する因子として最も有力と考えられた。

セパレーズが実際に動原体部位において第一分裂後期開始の時間で急激な活性化が起こっているかを、新たに開発した動原体セパレーズ活性センサー (mEGFP-Rec8-mCherry-CENP-C) を用いて調べた。このセンサーは動原体に局在し、セパレーズによる切断が起こると、mCherry シグナルは動原体に維持されるのに対して mEGFP シグナルは細胞質に拡散する。したがって、mCherry シグナルに対する Rec8 シグナルの比を算出しその時間変化を見ることで、動原体部位におけるセパレーズ活性の変化を知ることができる。(1)と同様に、相同動原体間の距離の変化から、第一分裂後期の開始時間を決定した。この解析から、セパレーズは動原体部位において第一分裂後期の開始とともに急激に活性化されることが分かった。その活性は数分でピークに達する。このことは、セパレーズが姉妹動原体間の接着を解離する因子であるという考えと一致している。この考えを実証するためには、動原体部位においてセパレーズ活性を阻害による姉妹動原体間接着の解離への影響を調べる必要がある。

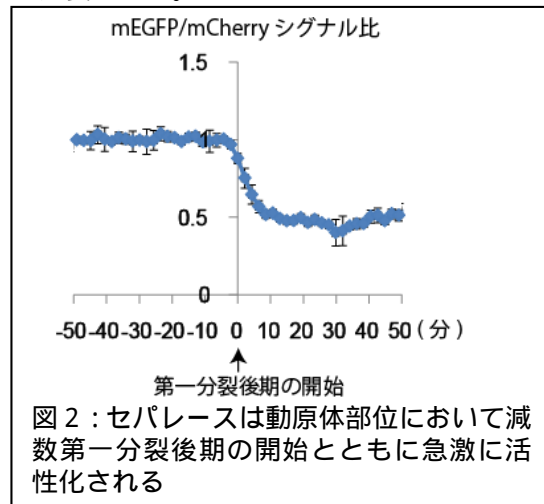


図2：セパレーズは動原体部位において減数第一分裂後期の開始とともに急激に活性化される

(3) 減数第二分裂の紡錘体が形成するタイミングとキネティクスを明らかにするために、EGFP-MAP4 と H2B-mCherry を卵母細胞に発現させ、紡錘体形成過程をライブイメージングした。得られた画像を三次元再構築し、第一分裂の後期から第二分裂の中期までの紡錘体の体積変化と形状変化について数値的に記述できる系を立ちあげた。

次に、第一分裂後期における姉妹動原体間の接着の解離を阻害し、それが第二分裂の紡錘体形成におよぼす影響を調べようとした。コヒーシンの保護因子であるシュゴシンや強いダイマー化活性を有するタンパク質の強制的な動原体局在により姉妹動原体間接着の解離の阻害を試みたが、現在のところ成功には至っていない。引き続き、セパレーズ

阻害因子であるセキュリンの強制的な動原体局在による阻害を試みる必要がある。

(4) BI2536 が 100nM の濃度で特異的にかつ効率的に Plk1 を阻害することを、BubR1 の Plk1 依存的なリン酸化を認識する抗体による染色から明らかにした。100nM BI2536 を含む培地で卵母細胞を培養し、動原体の動態を高解像度ライブイメージングした。動原体の三次元追跡結果から、Plk1 は減数第一分裂における動原体-微小管の安定な接続に必要であることが分かった。

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1件)

北島智也、卵母細胞における染色体分配と老化によるエラー、実験医学、査読無、32巻、2014、865-869

[学会発表](計8件)

Tomoya Kitajima, Chromosome dynamics during meiosis in mouse oocytes, The 11th Symposium on Molecular and Cell Biology, Kyoto University and Taiwan University, 2013年5月3日、京都大学(京都)
Shuhei Yoshida, Jan Ellenberg, Tomoya Kitajima, Systematic analysis of chromosome dynamics by complete kinetochore tracking in mouse oocyte meiosis, Dynamic Kinetochore Workshop 2013, 2013年5月17日, IMBC(Institute for Molecular and Cell Biology), Porto, Portugal

吉田周平、北島智也、前中期ベルト形成の機構とその役割、第65回日本細胞生物学会大会、2013年6月21日、ウインクあいち(名古屋)

北島智也、マウス卵母細胞の減数分裂における染色体分配、大阪大学大学院生命機能研究科研究交流会、2013年6月28日、大阪大学大学院生命機能研究科(吹田)

北島智也、Chromosome dynamics during meiosis in mammalian oocytes、第15回京大生命科学研究科シンポジウム、2013年7月4日、京都大学(京都)

北島智也、老化が卵母細胞における染色体分配に及ぼす影響、福井大学ライフサイエンスイノベーション推進機構セミナー第426回学内セミナー(大学院セミナー)、2013年8月19日、福井大学松岡キャンパス研究棟(福井)

吉田周平、北島智也、マウス卵母細胞の第一減数分裂では染色体の空間的配置が正確な動原体と微小管の結合を促進する、

第36回日本分子生物学会年会、2013年12月4日、神戸国際会議場(神戸)
北島智也、哺乳類卵母細胞における染色体分配のメカニズム、第45回精子研究会・神戸大学重点研究チーム、2014年1月11日、神戸大学総合研究拠点コンベンションホール(神戸)

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]
ホームページ等

<http://www.cdb.riken.jp/lcs/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

北島 智也 (KITAJIMA, Tomoya)

独立行政法人理化学研究所・発生・再生科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号：00376641

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし