

減数分裂過程の染色体ダイナミクスとその制御機構に関する研究

Chromosomal dynamics and its regulation during meiosis

(日本分子生物学会推薦)

代表研究者 東北大学 東谷 篤志 Tohoku University Atsushi Higashitani

協同研究者 東北大学 高浪 タカ子 Tohoku University Takako Takanami

Meiosis is essential for generating haploid gametes during sexual reproduction. In the course of meiotic prophase 1, homologous recombination is accompanied by dynamic chromosomal changes. The *Ce-rdh-1/rad-51* gene is the only bacterial *recA*-like gene in the nematode *Caenorhabditis elegans* genome. Upon depletion of *Ce-rdh-1/rad-51* using the RNA interference method, abnormal "kinked" chromosomes can be observed in mature oocytes at diakinesis, whereas synapsis between homologous chromosomes during the pachytene stage is normal. Following fertilization, *Ce-rdh-1/rad-51*-depleted embryos die early in embryogenesis. From epistasis analyses with *Ce-spo-11* defective mutant and ionizing

radiation, it is indicated that *Ce-rdh-1/rad-51* functions after double-strand break (DSB) formation of meiotic recombination. Under the *Ce-chk-2* defective condition, whose meiotic synapsis and meiotic recombination between homologous chromosomes are completely inhibited, the *Ce-rdh-1/rad51* is normally expressed in the gonadal cells. Moreover, it seems that exogenous DSBs in the *Ce-chk-2* defective nuclei at pachytene stage can be repaired between sister chromatids by *Ce-rdh-1/rad-51* dependent manner. These results indicate that *Ce-rdh-1/rad51* functions after both endogenous and exogenous DSBs formation during meiosis, but not as “pairing centers” for meiotic synapsis. We also found that the *syp-1*, *syp-2* and *syp-3* genes are essential for meiotic synapsis at pachytene stage.

<<本文>>

研究目的

有性生殖を行う生物は、配偶子の接合により遺伝情報の混合を行い子孫に遺伝的多様性を与えている。配偶子の接合によって染色体数が倍加する有性生殖サイクルにおいて、染色体数の半減を行う減数分裂は非常に重要な必須の過程である。さらにこの過程では、体細胞分裂に比べて極めて高い頻度で相同染色体間遺伝子組換えが起こり、その結果、子孫の遺伝的多様性は、より高まることが知られている。また減数第一分裂の前期過程は、そ

の染色体ダイナミクスの特徴から、倍加した姉妹染色分体が細糸状に観察されるレプトテン期、相同染色体間での対合形成が開始されるザイゴテン期、相同染色体間全体に渡ってシナプトネマ構造を介した対合形成が完了するパキテン期、対合が解かれ組換えの結果生じるキアズマが観察されるディプロテン期、染色体が凝集し核膜から離れるディアキネシス期の 5 つの時期に分けることができ、この過程は酵母から植物、動物に至る真核生物全般に広く保存されている。

なかでも相同染色体間での遺伝子組換えは、ザイゴテン期からパキテン期初めにかけて、減数分裂特異的なトポイソメラーゼ様酵素 SP011 が DNA 鎖に二本鎖切断 (DSB) を入れることで開始される。SP011 遺伝子は出芽酵母で最初に見出されたが、その後、線虫、シロイヌナズナ、マウスやヒトにおいても普遍的に存在し、その欠損変異では相同組換えが起こらず、減数分裂は異常を来し配偶子形成が不全となることが報告されている。

本研究では、これら減数分裂過程のなかで最も特徴的な相同染色体間での対合、遺伝子組換え、そしてキアズマ形成に至る染色体ダイナミクスとその制御機構を分子レベルで明らかにすることを究極の目的とし、研究材料として、逆遺伝学的ならびに遺伝学的解析が比較的容易な線虫 (C エレガンス) を用いた。着目した遺伝子としては、線虫ゲノム上に存在する唯一の *recA* 様遺伝子 *Ce-rdh-1/rad-51* (*_rad51, _dmc1/lim15 homolog 1*)、対合形成に必須な *Ce-chk-2* 様キナーゼ遺伝子、その他、対合に関わるシナプトネマ構造蛋白質、減数分裂特異的な染色体接着因子などで、これらの機能解析を通して有性生殖を行う真核生

物の配偶子形成に広く保存された減数分裂機構を分子レベルで理解することに努めた。

研究経過

1. 線虫 *Ce-rdh-1/rad-51* 遺伝子の機能解析

モデル生物の一つである線虫雌雄同体の成虫体内には、大きく発達した 1 対の生殖腺が存在し、その先端部では減数分裂前の生殖幹細胞が盛んに体細胞分裂を行い、生殖腺の途中からそれらは減数分裂へと移行し卵母細胞が形成され、さらに自家受精した後、初期胚形成までの連続的な発生・分化が観とめられる。なかでも、卵母細胞形成における減数第一分裂前期の染色体ダイナミクスは大変観察し易い (Fig. 1)。成熟した卵母細胞では、第一分裂前期のディアキネシス期で停止し、倍加した二価相同染色体が最も凝縮しキアズマを介して繋がった常染色体 5 対と性染色体 1 対の計 6 対がみとめられ、貯精巣を通過する際に受精し、その後、減数第一、第二分裂が引き続き生じる。従って、*SPO11* の発現を RNA 干渉法 (RNAi) で抑制した場合やその欠失変異体においては、キアズマが形成されず成熟した卵母細胞において凝縮した相同染色体が離れて計 12 本の染色体ドットとして観察される (Fig. 2)。

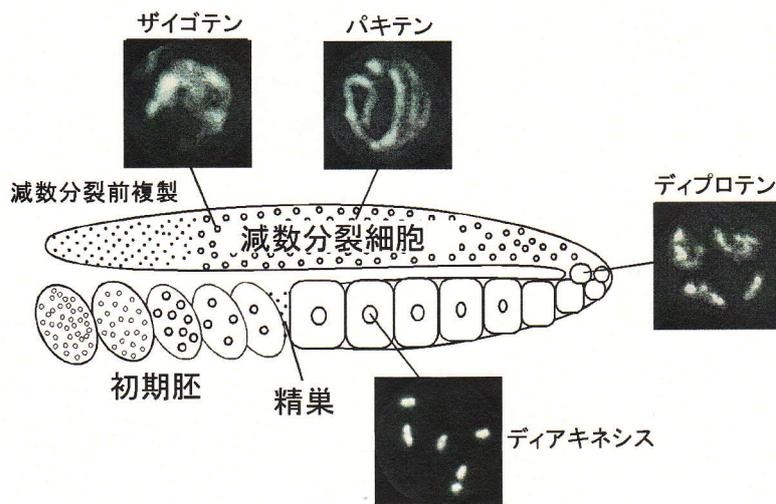


Fig. 1. Chromosomal dynamics during meiotic prophase 1 in the nematode *Caenorhabditis elegans*.

また真核生物の相同的遺伝子組換えに関わる大腸菌 *recA* 様遺伝子には、大きく 2 つのタイプ、*Rad51* と *Dmc1* とが存在することが、酵母から植物、ヒトに至る多くの真核生物において報告されている。これら両者のアミノ酸配列は大変類似性が高く、構造的にも生化学的な酵素活性としても大変類似している。しかしながら、遺伝子発現の組織特異性に関しては、*Rad51* タイプは体細胞と減数分裂細胞の両方で、*Dmc1* タイプは減数分裂細胞で特異的に発現し、減数分裂過程における相同染色体間での遺伝子組換えには *Dmc1* タイプがより深く関わることを示唆されている。一方、全ゲノム構造が明らかになった線虫のゲノム上には、*recA* 様遺伝子が一種類 (*Ce-rdh-1*: *C. elegans rad51, dmc1/lim15 homolog 1* と命名) しか見出せないこと、またその遺伝子の発現を RNA 干渉法 (RNA interference: RNAi) で抑制した場合、正常な減数分裂ディアキネシス期への移行がさまたげられ、染色体がランダ

ムに絡まった状態となり減数第一分裂前期の異常となること (Fig. 2)、ならびに放射線による DNA 損傷に高感受性となることなどを見出してきた。

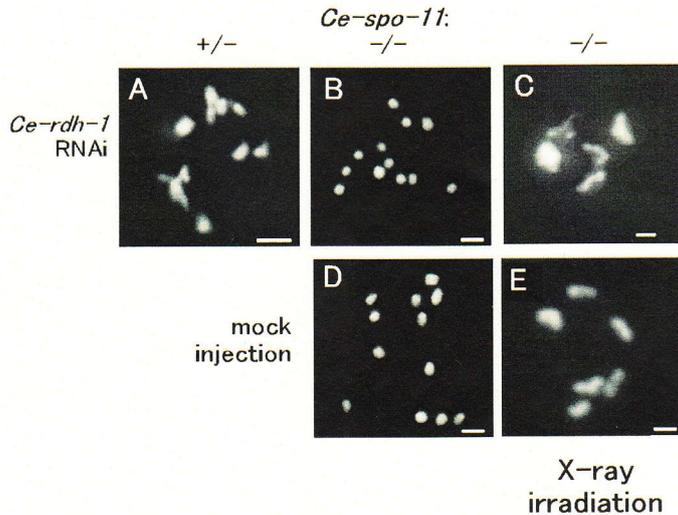


Fig. 2. Influence of the *Ce-spo-11* mutant background on abnormal diakinesis chromosomes induced by *Ce-rdh-1/rad-51* RNAi treatment. Scale bars represent 2 μ m.

そこで、はじめに *Ce-rdh-1/rad51* と *Ce-spo-11* 遺伝子との減数分裂過程における遺伝的エピスタシスを調べる目的で、*Ce-spo-11* の遺伝的変異体に対して、*Ce-rdh-1/rad51* の RNAi を行い、その影響について検討した。その結果、*Ce-rdh-1/rad51* の RNAi による染色体がランダムに絡まった状態となる減数第一分裂前期の異常が、*Ce-spo-11* の遺伝的変異バックグラウンドでは観察されず、*Ce-spo-11* 単独の変異である相同染色体が離れた計 12 本の染色体ドットとして観察された (Fig. 2)。従って、*Ce-rdh-1/rad51* は *Ce-spo-11* の下流で機能する遺伝子であることが確かめられた。また、*Ce-spo-11* 単独の変異に放射線を照射し、人為

的な DNA の DSB を導入することで、正常な 6 対の二価相同染色体となることが高頻度に観察されたが、*Ce-rdh-1/rad51* と *Ce-spo-11* の二重抑制においてみられた上記の 12 本の染色体ドットは、放射線の照射により、正常な 6 対ではなく染色体がランダムに絡まった状態となることが明らかになった (Fig. 2)。

次に、減数分裂過程の相同染色体間の対合形成において、*Ce-rdh-1/rad51* が必要であるか確かめる目的で、*Ce-rdh-1/rad51* の RNAi を行った際の生殖腺内パキテン期の減数分裂核について、5S-リボソーム遺伝子をプローブとした FISH 観察を行った。その結果、*Ce-rdh-1/rad51* の RNAi による発現抑制においても、相同染色体間の対合形成は正常に行われることが明らかになった。

これらの結果から、*Ce-rdh-1/rad51* は減数分裂過程の遺伝子組換えに必須であり、その機能としては、組換えの初期反応である SP011 による DNA の DSB や放射線など外因的な DNA の DSB 損傷に対して、相同的組換え修復を行うことが明らかになった。一方で、*recA* 様遺伝子は、生化学的に DNA のアニリング活性や DNA の相同性認識を行うことが知られているが、線虫における減数分裂過程の相同染色体間の対合形成には必須でないことが示唆された。

2. 相同染色体間の対合形成に関わる遺伝子群

酵母やヒトにおいて細胞周期のチェックポイントシグナル伝達に関わる CHK2/CDS1 キナーゼの線虫における構造的相同な遺伝子 *Ce-chk-2* の解析を行った。その結果、線虫 *Ce-chk-2* は、DNA 損傷のチェックポイント修復系には必要性が認められなかったが、減数分裂過程のキアズマ形成には必須であることを見出してきた。その発現を RNAi により抑制した個体の減数分裂過程においては、減数第一分裂前期ディプロテン期の染色体上にキアズマが形成されず、*Ce-spo-11* 単独の変異である相同染色体が離れた計 12 本の染色体ドットと同様になることを見出した (Fig. 3C)。

次に、*Ce-chk-2* の RNAi 個体におけるパキテン期の相同染色体間の対合状況について FISH 法により調べた。その結果、正常な対合が形成されていれば本来 1 ヶ所にシグナルが検出されるどころ、Fig. 3B に見られるように RNAi 個体では相同染色体間の対合形成が阻害され、シグナルが大きく 2 ヶ所に離れて検出され、さらに各 1 ヶ所のシグナルがそれぞれ姉妹染色体由来の 2 個として高頻度に観察された。また、*Ce-chk-2* の遺伝的変異バックグラウンドでは、*Ce-rdh-1/rad51* の RNAi の効果がみられず (絡まった染色体とならない)、相同染色体間の遺伝子組換えの初期反応である SP011 による DNA の二本鎖切断が導入されないことが示唆された (Fig. 3E、F)。さらに *Ce-spo-11* 単独の変異に放射線を照射した場合と異なり、*Ce-chk-2* の遺伝的変異に放射線を照射した場合では計 12 本の染色体ドットのまま変化せず、人為的な DSB を導入しても対合が形成されないため相同染色体間での遺伝子組換えが生じず、結果としてキアズマが形成されないことが明らかになった。一方で、これ

ら人為的な DSB は *Ce-rdh-1/rad51* に依存した形で、姉妹染色体間で組換え修復されることが明らかになった (Fig. 3 G H)。

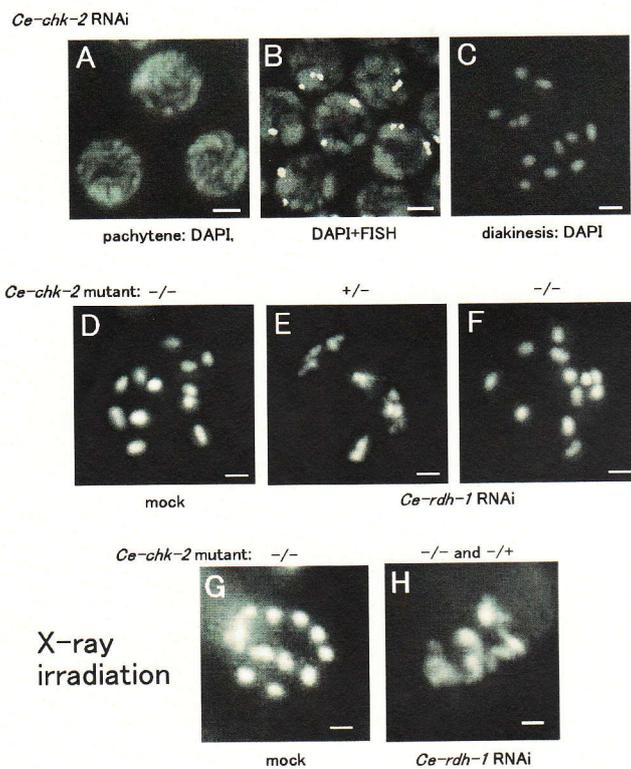


Fig. 3. The effects of *Ce-chk-2* RNAi on meiotic synapsis and the influence of the *Ce-chk-2* null mutant background on the abnormal diakinesis chromosomes produced by *Ce-rdh-1/rad-51* RNAi treatment.

また同様に、シナプトネマ構造タンパク質 SYP1、SYP2、SYP3 や HIM3 タンパク質の発現

抑制や欠失変異においても、相同染色体間での対合形成が阻害され、その結果、相同組換えが生じず、ディアキネシス期の卵母細胞で計 12 本の染色体ドットとして観察されことも明らかにした。

考察

本研究では、減数分裂過程の染色体ダイナミクス、なかでも最も特徴的な第一分裂前期にみられる相同染色体間での対合形成と遺伝子組換えの関係について、線虫の唯一の *recA* 様遺伝子 *Ce-rdh-1/rad-51* (*rad51, dmc1/lim15 homolog 1*) と *Ce-chk-2* 様キナーゼ遺伝子の機能解析を通じた研究を中心に展開してきた。これまでマウスなどでは、減数分裂期の遺伝子組換えに関わる *recA* 様遺伝子 *DMC1* の遺伝子破壊によって、減数分裂パキテン期以降の生殖細胞にアポトーシスが生じ、遺伝子機能の欠損に起因する染色体異常を観察することが大変難しかった。しかしながら、線虫においては本研究にみられるように比較的アポトーシス活性が弱く、また RNAi など簡便な遺伝子発現の抑制法による影響を容易に観察することができ、*Ce-rdh-1/rad-51* 遺伝子は、減数分裂期の遺伝子組換えに必須で、組換えの初期反応である SP011 による DNA の DSB 後に働くことが明らかになった。

SP011 遺伝子や *recA* 様遺伝子などは、酵母から線虫、シロイヌナズナ、マウスやヒトにおいても普遍的に存在し、このことは、真核生物全般において減数分裂過程が大変高度に

保存された分子機構であることを伺わせる。一方で、相同染色体間での組換えと対合形成との関係において、酵母やマウスなどの *SP011* 変異では組換えと対合形成の両方が起こらなくなる事、しかしながら、線虫やショウジョウバエの *SP011* 変異においては、組換えは阻害されるが対合形成は正常に行われることから、組換えと対合形成の制御関係には生物種による違いがあることが示唆される。また本研究から、*recA* 様遺伝子は生化学的に DNA レベルでの相同性認識を行うことが知られているが、線虫の唯一の *recA* 様遺伝子も相同染色体間の対合形成には必要でなく、従って、対合形成には染色体レベルでの相同性を認識する何らかの機構 (pairing center) が存在することが強く示唆された。

今後、この pairing center の分子機構を理解する上で、対合に関わるシナプトネマ構造タンパク質 SYP1、SYP2、SYP3 や HIM3 タンパク質、減数分裂特異的な染色体接着因子 REC8 コヒーシンなどについての研究を展開したいと考えている。また *Ce-chk-2* の RNAi や変異体において、相同染色体間の対合形成が全く生じないため、この pairing center の機構に何らかのタンパク質リン酸化制御機構が存在することが強く示唆された。

また何れの生物種においても、一般的には、相同組換えが阻害された場合、その後の減数分裂で異常を来し配偶子形成が不全となる。線虫の *spo-11* 変異や *Ce-chk-2* 変異などにみられたキアズマがなく相同染色体間が離れた 12 本の染色体を持つ卵母細胞は、正常な精子と受精しても、受精直後に起こる減数第一分裂過程で、ランダムにこれら染色体が分離分配され、その後の卵の孵化率は数%にまで低下する。従って、減数分裂過程における相

同組換えは、子孫の遺伝的多様性を高めるための生物戦略の一つであると考えられがちであったが、組換えの結果であるキアズマにより、減数第一分裂まで相同染色体間を繋ぎ止め、配偶子に正しい染色体セットを分離分配するために必須の過程であるといえる。

また、これまで私たちは、線虫のパキテン期の核が放射線による DNA 損傷に超抵抗性を示すことを明らかにしてきた。さらにこの超抵抗性は、減数分裂の相同組換えに関わる *Ce-rdh-1/rad-51* を含めた酵素群が高発現していることに起因することを突き止めてきた。そこで減数分裂の組換えは、親個体において生じたランダムな DNA 損傷を最も正確な修復機構である相同的な組換え修復機構により、配偶子には損傷のない DNA へと浄化（タイムリセット）する役割を担うものとも考えることができる。

研究発表

学会発表

1. Takako Takanami, Yongzhao Zhang, Hidetoshi Aoki, Hideyuki Takahashi, Tomoko Abe, Shigeo Yoshida, and Atsushi Higashitani: Repair system for DNA damages in meiotic cells of *Caenorhabditis elegans*; 2nd International Workshop on Space Radiation Research (IWSSRR-2), 2002, 3, 奈良
2. Takako Takanami and Atsushi Higashitani: Characterization of meiotic recombination and DNA damage repair in the nematode *Caenorhabditis elegans*;

International Congress of Ecology VIII "Symposium #46 Molecular ecology and genetic diversity", 2002, 8, Seoul

3. 東谷篤志、高浪タカ子、堀内三郎、高橋秀幸：線虫を用いた減数分裂染色体ダイナミクスの研究：*recA* 様遺伝子の機能を中心に。日本分子生物学会第 25 回大会、ワークショップ、2002, 12, 横浜

論文発表

1. Takako Takanami, Akiyuki Mori, Hideyuki Takahashi, Saburo Horiuchi, and Atsushi Higashitani: *Caenorhabditis elegans Ce-rdh-1/rad-51* functions after double-strand break formation of meiotic recombination; *Chromosome Res.* 2003, in press
2. 高浪タカ子, 東谷篤志: 減数分裂過程における染色体ダイナミクスと放射線の影響; *化学と生物* 2003, 41, 138-141