

「生殖細胞系列温度感受性における染色体-タンパク質高次構造体の機能」

近畿大学大学農学部

篠原 美紀

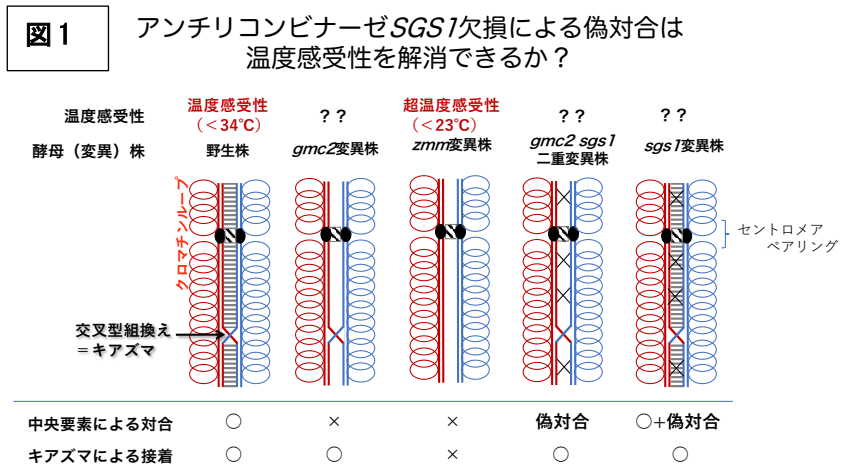
1 研究の背景と目的

生殖細胞系列における減数分裂期交叉型組換えは有性生殖を採用する生物にとって次世代に種を継承する唯一の手段であり、生物の種の多様性を生む原動力でもある。原始的な真核生物である出芽酵母とヒトを含む哺乳類の間でも基本的な分子メカニズムは保存されている特殊なシステムである。ヒトの減数分裂の過程は高温に弱いことが知られており、男性の生殖細胞系列細胞では、病気などによる高発熱後に精子形成ができなくなることが知られている。出芽酵母でも同様に、通常 30°C の生育温度から 4°C 上昇すると、増殖には影響がない一方で、減数分裂期は正常に行うことができず胞子を形成できなくなる。私たちは、栄養飢餓シグナルによって全ての細胞を生殖細胞へと変換することができる出芽酵母を用いて、減数分裂期特異的な染色体高次構造体因子の機能に依存した減数分裂の高温感受性の原因がどこにあるのかを明らかにする。減数分裂期の温度感受性の原因を知り、それを克服するための知見を得ることがこの研究の目的である。

2 研究方法・研究内容

シナプトネマ複合体を構成する 8 つの ZMM 因子 (Zip1, 2, 3, Mer3, Msh4, 5, Spo16, 22) をどれか一つでも欠失させると、正常な交叉型組換えが起こらずキアズマ形成が不全となり、結果として減数第一分裂で染色体不分離をおこし、染色体数が通常と異なる異数体の配偶子 (精子・卵子・胞子など) を生じる。異数体配偶子はヒトでは流産の原因になり、実際にヒトの Zip3 相同遺伝子の変異は若年性習慣流産の原因になり、Spo22 相同遺伝子を欠損した植物では種子が出来ないことが知られている。元々、減数分裂期は温度の許容範囲は高温側に厳しいが、酵母における *zmm* 因子の変異株 (*zmm* 変異株) では超温度感受性となり通常の生育温度よりも低い温度でなければ胞子が形成されない。つまり、温度を下げることで、キアズマ形成が促されることで減数分裂期交叉型組換えの頻度が改善すると考えられるが、具体的にどの段階が改善されるのかは未だ解っていない。私たちは出芽酵母 *zmm* 変異株と、対合に同じように欠損を示すが組換え制御の機能は正常な *gmc2* 変異株、疑似シナプトネマ複合体を形成する *sgs1* 変異株 (図 1) を用いて、減数分裂期の温度感受性の原因となる反応がどこにあるのか、その分子機構について以下の実験から明らかにする。さらに特に小さな

サイズの染色体は、交叉型組換えの確率的にチャンスが大きな染色体と比較して少なく、様々な組換え減少圧に弱いことが解っていることから、温度上昇によって小さな染色体でのキアズマ形成が不全になるかどうか



について細胞生物学的手法解析を行った。

### 3 研究成果

#### 概要

出芽酵母をモデル生物として、生殖系列細胞の配偶子(孢子)形成における温度感受性がどのような減数分裂期過程の機能不全により引き起こされるのか、染色体構造の温度による変化に焦点をあてて高温条件下での減数分裂期の欠損が①シナプトネマ複合体中央要素による相同染色体の対合、②ZMM nodule による交叉型組換え促進、③単純に物理的な相同染色体の対合のいずれのイベントがうまくいかないことによるのかを明らかにするために解析を行った。その結果、高温条件下では染色体の軸構造タンパク質の染色体上局在が不安定になることが示唆された。軸構造の形成はシナプトネマ複合体中央要素の形成と交叉型組換えの促進の両方に必須であることが知られている。つまり、今回の結果は、高温条件下で減数分裂期の軸構造が不安定になることで複合的にその後におきるべきイベントが阻害されることによる可能性が示された。この結果は、未だ不明の部分の多い構造形成過程の分子機構の理解により減数分裂期の温度感受性メカニズムの解明につながることを示唆している。

#### I. *zmm* 変異株の超温度感受性の原因の分子メカニズム解析

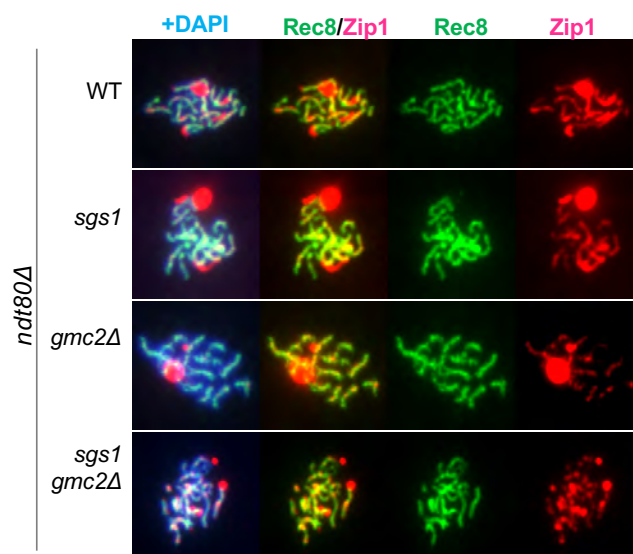
野生株においては、キアズマ形成に先んじて減数分裂期特異的な染色体高次構造体シナプトネマ複合体が形成される。シナプトネマ複合体構成因子は染色体全長にわたって、複製後の2対の姉妹染色体軸構造(相同染色体)を対合させる機能を持つタンパク質群からなる。さらに、シナプトネマ複合体因子は、中央要素(Zip1 タンパク質)と ZMM nodule (Zip3 タンパク質)の2つの機能的サブコンプレックスに分類される。一方、組換え酵素の機能を抑制する Sgs1 タンパク質のアンチリコンビナーゼ機能を欠損する *sgs1ΔC* 変異株では DNA 鎖交換

反応を相同染色体の間で過剰におこし、相同染色体の物理的接着を促すことで疑似シナプトネマ複合体を形成することが報告されている(図2)。

今回、A. 野生株、B. ZMM nodule を形成しない *zmm* 変異株、C. 中央要素形成に欠損を持つ *gmc2* 変異株、D. 疑似シナプトネマ複合体を形成する *gmc2 sgs1ΔC* 変異株の4種について、さらに染色体構造変化に特化して解析を行うために減数分裂期の進行をパキテン(染色体構造解離前の段階)で停止する *ndt80* 変異の遺伝的背景で解析を行った。これら変異株をそれぞれ、酵母の至適生育温度である 30°Cと、高温の 34°Cの異なる温度において減数分裂を進行させ、その間の染色体構造について解析を行った。染色体構造は減数分裂期酵母細胞からクロマチン構造を分画し、軸タンパク質(Rec8)と中央要素(Zip1)を関節蛍光抗体法で可

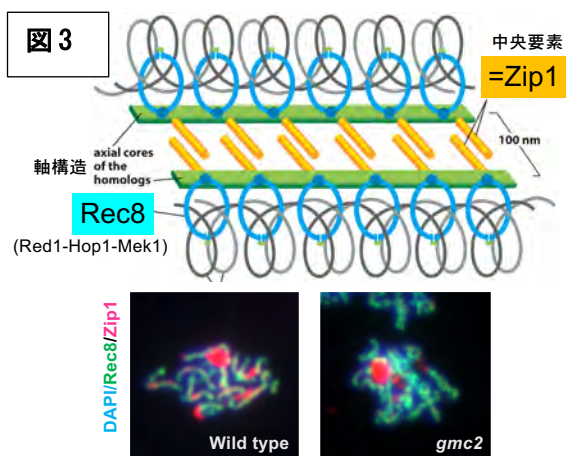
図 2

減数分裂期染色体の疑似対合を人工的に作り出す



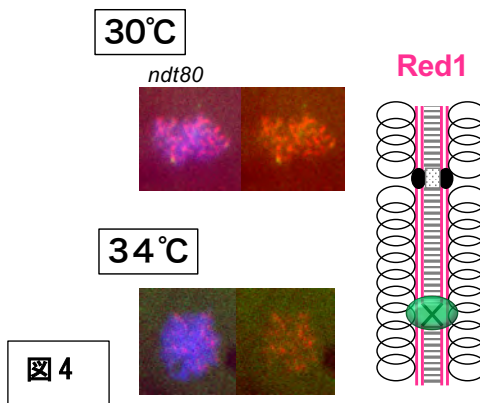
視化し、蛍光顕微鏡観察を行った。

野生株では、シナプトネマ複合体は2本の軸構造の間に中央要素が挟まった様に見える3重構造 (tripartite structure) を形成することが確認できた(図3)。一方で、中央要素形成に欠損を示す、*gmc2* 変異株では ZMM nodule のところに野生株の様に線状ではなくドット状の Zip1 タンパク質が観察された。また、染色体腕部では Zip1 タンパク質の局在は観察されず軸構造 (Rec8 タンパク質で可視化)が開いて対合がうまくできていないことが確認された。また、前述の軸同士対合に欠損を示した *gmc2* 変異に、さらに *sgs1* 変異を加えた二重変異株では、中央要素 (Zip1) は線状に伸長していないにもかかわらず、軸構造 (Rec8) は対合が復活したような染色像が観察された。つまり予想模式図で示したとおりの染色体構造が各変異株の核内で構築されていることがわかった。



そこで、次に野生酵母株 (*ndt80* 変異株)において至適生育温度である 30°C と高温条件下である 34°C において減数分裂期を進行させ同様に染色体構造について解析を行った。その結果、34°C の高温条件下では軸構造 (Rec8) が線状に十分伸長しておらず、また、ZMM nodule がほとんど観察されないことがわかった。Rec8 は減数分裂期特異的なコヒーシンサブユニットであり、これとは異なる構造体因子である Red1 について解析しても同様に軸構造伸長に欠損が見られたことから、高温条件下での減数分裂期の欠損は軸構造形成の欠損に由来することを示す結果を得ることができた。また、*gmc2* 変異株でも同様に軸構造の欠損が観察され、またその欠損は *sgs1* 変異導入による疑似シナプトネマ複合体形成で抑制することはできなかった。(むしろ欠損はよりシビアになることがわかった)

### 高温で染色体軸構造が不安定化する



減数分裂期染色体の軸構造は、シナプトネマ複合体、減数分裂期組換えの足場として必要不可欠であることから、その構造欠損はその後に起こる全てのイベントの欠損を引き起こすと考えられた。このことは、高温条件下で交差型組換えに必須の ZMM nodule (Zip3 タンパク質で可視化) が観察されなかったことから明らかである。減数分裂期染色体の軸構造がどのようにして構築されるのかまだ分子機構については詳細は明らかになっていない。今回の我々の解析はその構築過程に温度感受性の原因になる過程があることを示唆している。

酵母で超温度感受性になるシナプトネマ複合体の構成因子について、ヒトではこれらの因子の変異は若年性習慣流産を引き起こす原因遺伝子として知られている。このことはヒトの生殖細胞形成においてもこれら因子が減数分裂期において重要な機能であると考えられ、さらに上述の若年生習慣流産が生殖細胞系列の温度感受性に起因する可能性がある。本研究によって今回、減数分裂期染色体軸構造の形成欠損が高温条件下で観察された。また、組換え上昇による疑似対合はその欠損を抑制することはできなかった。温度感受性の原因は減数分裂期軸構造形成過程にあることが明らかにできたことから、今後、未だ不明の部分の多い構造形成過程の分子機構の理解により高熱による精子形成阻害や、若年性流産の原因究明、さらに農作物の育種における温度による組換え制御などに活用することが期待できる。