

## 90. 非コード RNA が相同染色体を対合させる仕組みの解明

平岡 泰

Key words : 染色体, 細胞核, 生細胞蛍光イメージング,  
減数分裂, 分裂酵母

大阪大学 大学院生命機能研究科  
細胞ネットワーク講座  
細胞核ダイナミクス研究室

### 緒 言

減数分裂は、ヒトでは卵子や精子を作る特殊な細胞分裂がそれに相当し、そこでの失敗は不妊やダウン症などの異常につながるために、減数分裂の仕組みの解明は世代を越えたゲノムの継承のために重要な課題となっている。

減数分裂においては、体細胞分裂と異なり、1回のDNA複製の後に、2回の染色体分配が連続して起こることによって染色体数を半分にする。その間、父母に由来する2本の相同染色体が対合し、相同染色体間で組換えが生じる。1回目の分配では相同染色体が分離し（還元分配）、姉妹染色分体は2回目に分離する（均等分配）。このような減数分裂を特徴づける染色体の挙動は、ヒトやマウスなどの高等動物から単細胞真核生物である分裂酵母まで普遍的に見られる。しかし、ヒトやマウスなどの高等動物では、減数分裂は卵巣や精巣など体内で、かつ長い時間をかけて起こるために、その過程や分子メカニズムを解明するのは困難である。それに対して、分裂酵母においては、培地から窒素源を枯渇させるだけで減数分裂を誘導でき、短時間（8時間ほど）で減数分裂が完了する。私たちは、分裂酵母の利点を活かし、分子遺伝学的手法とバイオイメージング技術を併用して、減数分裂の染色体ダイナミクスの研究を進めてきた。分裂酵母では、体細胞分裂から減数分裂に移行すると、核内の染色体配置がセントロメアクラスターからテロメアクラスターへと劇的に変化すること示し、さらにその分子メカニズムを明らかにしてきた<sup>1)</sup>。この分子メカニズムが高等動物でも普遍的にみられ、発生過程での形態形成など広範な高次生命現象に関わる。

本研究では、分子遺伝学的手法により分裂酵母のさまざまな変異株を作製し、生細胞蛍光イメージングや超解像蛍光イメージングを用いることにより、減数分裂期に特有の染色体構造およびそのダイナミクスを解析し、非コードRNAが相同染色体の対合に寄与することを明らかにした。

### 方 法

#### 1. 生細胞蛍光イメージング

分裂酵母の染色体を生細胞で蛍光イメージングするために、染色体の特定の部位にlacO配列のリピート配列を挿入した細胞株を作製し、lacO配列に特異的に結合するlacリプレッサータンパク質にGFP（緑色蛍光タンパク質）を融合させたLacI-GFPにより蛍光標識した（図1）。これにより、相同染色体の対合を生細胞で連続的に追跡することが可能になった<sup>2)</sup>。また、テロメア配列に特異的に結合するタンパク質をGFPまたはRFP（赤色蛍光タンパク質）で蛍光標識することにより、テロメアを可視化した。

また、相同染色体の対合部位の網羅的な検索を行う目的で、ゲノムワイドに約100 kbp間隔でlacOリピート配列を挿入した一群の分裂酵母細胞株を作製した。これにより染色体の約130箇所を生細胞可視化できるようになった。これは染色体のダイナミクスを研究する様々な実験に活用できる有用な資源となる。

#### 2. 超解像蛍光顕微鏡

高分解能でクロマチン構造を観察するために、超分解能顕微鏡法として、3D-SIM (Three-Dimensional Structured Illumination Microscope) を活用した。分裂酵母の細胞核は非常に小さい（直径2マイクロメートル）ため、蛍光量が

少なく暗いのが問題であったが、光学系の調整・観察条件の最適化により、3D-SIMによって分裂酵母の染色体繊維をトレースできる（図2）。減数分裂期の染色体構造の観察には、この方法を用いた。

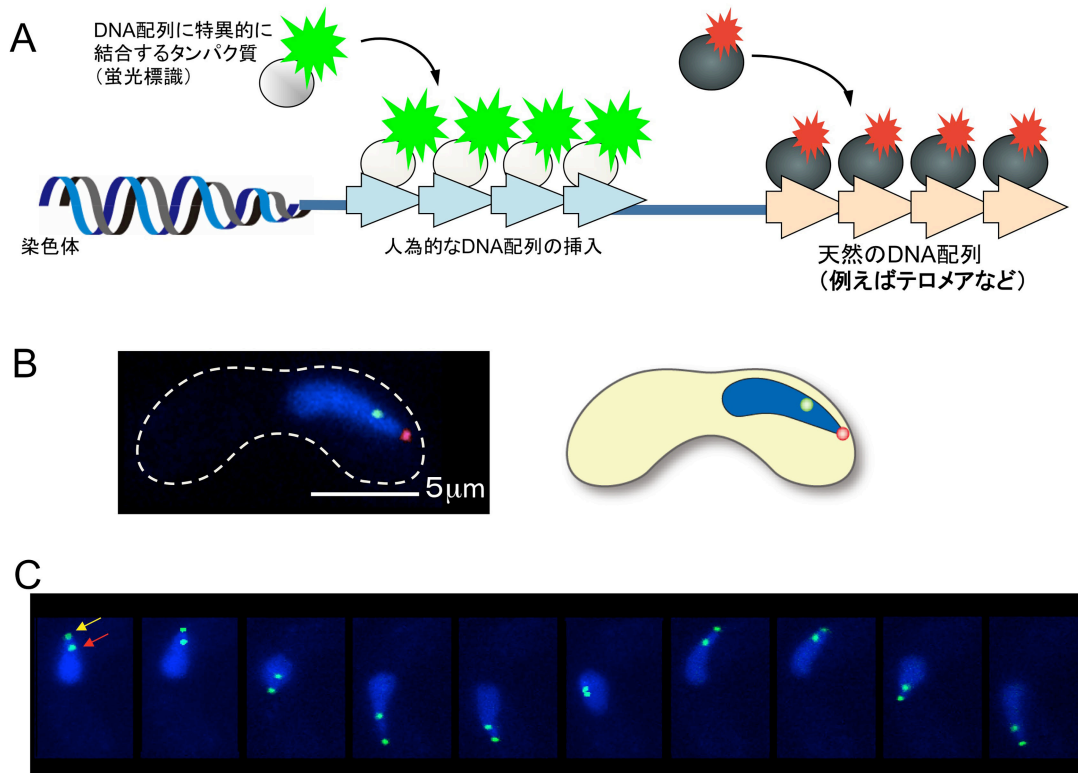


図1. 染色体の生細胞蛍光イメージング.

A) 染色体の特定部位を生きたままの細胞で蛍光標識する方法. B) 染色体上の2箇所（緑と赤）を蛍光標識した分裂酵母細胞の蛍光顕微鏡像. 核の形状はDNA 特異的蛍光色素で染色した（青）. 右は模式図. C) 蛍光標識した染色体部位を生細胞で連続観察. 同じ細胞で動きを追跡できる（左から右に時間変化）.

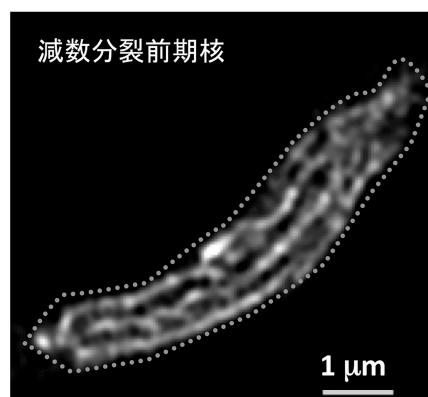


図2. 超解像顕微鏡イメージング.

減数分裂前期の細胞核. ヒストン GFP で染色したクロマチン繊維.

## 結果および考察

### 1. 減数分裂期の相同染色体対合における RNA の役割

染色体上に蓄積する非コード RNA が相同染色体対合に果たす役割を明らかにするために、まず、減数分裂期の染色体の挙動を、生きた細胞で観察するための蛍光顕微鏡法を開発し、相同染色体対合での染色体構造の動態を解析した<sup>3)</sup>。つぎに、RNA と相互作用するクロマチン因子を同定することを試みた。

これまでの研究から、我々は、Sme2 遺伝子から転写される meiRNA と呼ばれる非コード RNA が染色体上に蓄積すること、その蓄積が相同染色体の対合に寄与することを明らかにしている (図 3)<sup>46)</sup>。本研究では、meiRNA と相互作用するタンパク質複合体を同定することを試みた。meiRNA の結合因子として Mei2 タンパク質がすでに知られているが、meiRNA の Mei2 結合配列を削除しても残りの RNA が対合を促進できることから、Mei2 タンパク質は対合に関与しないと結論できた。そこで新規な因子を同定するために、独自に作製した GFP 融合ライブラリから核内にドットを作るものを検索し、RNA と共局在する因子 10 数個を選別した。それぞれの因子の欠損変異株を作製し、相同染色体対合頻度が低下するものを選別した。この中には、RNA のポリ A 付加に関与する因子群が含まれたことから、転写された RNA がポリ A 付加と連動して染色体に蓄積することが相同染色体対合に必要であることが示唆された。また、非コード RNA のポリ A 付加サイトを欠失させると染色体に蓄積しなくなり、相同染色体対合頻度が低下した (Ding et al., 未発表)。このことから、転写された RNA がポリ A 付加と連動して染色体に蓄積すること、RNA の染色体蓄積が相同染色体対合に必要であることが明らかとなった。

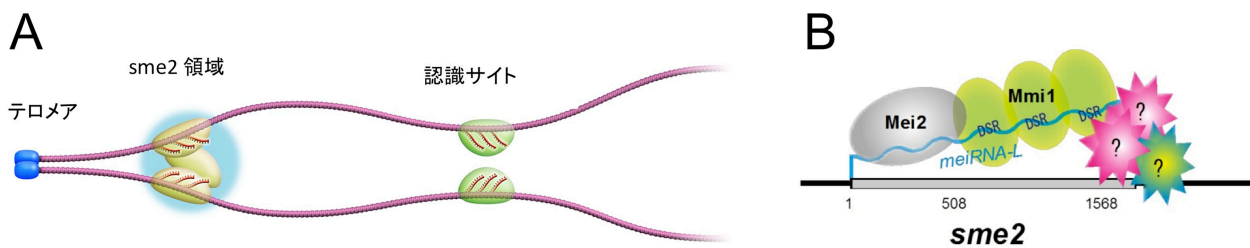


図 3. 相同染色体対合の仕組み.

A) RNA が相同染色体の対合を促進する仕組み. B) RNA が染色体に蓄積する仕組み.

### 2. 減数分裂の進行に影響を与える染色体と細胞核の構造

減数分裂期に形成される特有の染色体構造が、染色体の正常な機能にどのように関わるか解析を行った。まず、生細胞蛍光イメージングを用いて、テロメアクラスターに障害があると、減数分裂期のスピンドルの形成に異常が出ることを明らかにした<sup>7)</sup>。また、DNA 複製に障害があると減数分裂前期の遅延が起こることも明らかにした<sup>8)</sup>。さらに、クロマチンタンパク質であるコヒーシンについて、減数分裂期の染色体構造に対する役割を検討した。コヒーシンは、複製された染色体を接着させる因子であり、減数分裂期では、体細胞分裂型 (Rad21) から減数分裂型 (Rec8) に置換されることが知られている。これまでの研究から、Rec8 の変異体ではクロマチン構造が変化することがわかっていたが<sup>3)</sup>、本研究では、相同染色体の対合と分離に対する影響を解析した。超分解能顕微鏡法である 3D-SIM を用いて、減数分裂期の染色体繊維をトレースすることによって染色体構造を解析した。その結果、減数分裂型コヒーシン Rec8 の変異体では、染色体腕部・セントロメアおよび *sme2* 遺伝子座のいずれの部位においても相同染色体の対合が低下していた。このことから、相同染色体の対合のためには、減数分裂型コヒーシンによって形成されるクロマチン構造が必要であると結論した (Ding et al., 未発表)。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、大阪大学の浅川東彦および情報通信研究機構の丁大橋、近重裕次、原口徳子である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Hiraoka, Y. & Dernburg, A. F. : The SUN rises on meiotic chromosome dynamics. *Dev. Cell*, **17** : 598-605, 2009.
- 2) Ding, D.-Q., Yamamoto, A., Haraguchi, T. & Hiraoka, Y. : Dynamics of homologous chromosome pairing during meiotic prophase in fission yeast. *Dev. Cell*, **6** : 329-341, 2004.
- 3) Ding, D.-Q., Sakurai, N., Katou, Y., Itoh, T., Shirahige, K., Haraguchi, T. & Hiraoka, Y. : Meiotic cohesins modulate chromosome compaction during meiotic prophase in fission yeast. *J. Cell Biol.*, **174** : 499-508, 2006.
- 4) Ding, D.-Q., Okamasa, K., Yamane, M., Tsutsumi, C., Haraguchi, T., Yamamoto, M. & Hiraoka, Y. : Meiosis-specific non-coding RNA mediates robust pairing of homologous chromosomes in meiosis. *Science*, **336** : 732-736, 2012.
- 5) Ding, D.-Q., Haraguchi, T. & Hiraoka, Y. : Chromosomally-retained RNA mediates homologous pairing. *Nucleus*, **3** : 516-519, 2012.
- 6) Ding, D.-Q., Haraguchi, T. & Hiraoka, Y. : The role of chromosomal retention of noncoding RNA in meiosis. *Chromosome Res.*, **21** : 665-672, 2013.
- 7) Chikashige, Y., Yamane, M., Okamasa, K., Mori, C., Fukuta, N., Matsuda, A., Haraguchi, T. & Hiraoka, Y. : Chromosomes rein back the spindle pole body during horsetail movement in fission yeast meiosis. *Cell Struct. Funct.*, **39** : 93-100, 2014.
- 8) Ruan, K., Yamamoto, T. G., Asakawa, H., Chikashige, Y., Masukata, H., Haraguchi, T. & Hiraoka, Y. : Meiotic nuclear movements in fission yeast are regulated by the transcription factor Mei4 downstream of a Cds1-dependent replication checkpoint pathway. *Genes Cells*, **20** : 160-172, 2015.