

令和 3 年 10 月 20 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 2019 年度

受付番号 201960461

氏 名 野崎慎

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。
なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：マサチューセッツ州ケンブリッジ市（国名： 米国 ）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

減数分裂期における相同配列検索機構の解明に向けたライブセルイメージング

3. 派遣期間：平成 31 年 4 月 1 日 ～ 令和 3 年 9 月 30 日（914 日間）

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名： Harvard University

部局名： Department of Molecular and Cellular Biology

【記載事項】

- ・ 研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等
 - ・ 新型コロナウイルス感染症の影響にかかる特例措置のうち、国内採用開始・採用期間延長・翌年度渡航のいずれかの適用を受けた場合は、当該措置の適用による影響等
- (注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

[本研究課題の目的]

本研究では、減数分裂時に相同染色体がどのようにお互いを認識・検索し、ホモログペアリングとそれに続く相同組換えを起こすことができるのかについて、その分子・物理メカニズムを明らかにすることを目的としている。減数分裂の相同組換えという現象は、100年近く前からその存在が知られているが、どのようにして相同染色体間のペアリングが起きるのかについては、未解決の問題として残されている。他の転写因子などによるDNA情報検索と比べて、相同染色体間におけるDNA情報の検索は以下の点から非常に困難であるように思える。まず、間期の核において、染色体の拡散速度は非常に遅い。核内において、DNAに結合せずに自由拡散しているタンパク質の拡散係数が $10^0-10^2 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 程度であるのに対して、染色体の拡散係数は $10^{-3}-10^{-2} \mu\text{m}^2/\text{s}$ 程度であり、非常に遅い。これは染色体が非常に巨大な高分子であり、かつ核膜や核小体に結合していることに起因する。さらに、数の観点から見ても、相同染色体は1セットしか存在しないのに対して、転写因子はその数を増やすことで並列検索が可能となる。減数分裂におけるペアリングは、第一減数分裂において、相同染色体を厳密に分配するために必須であり、ホモログペアリングの失敗や、非相同染色体間におけるペアリングは染色体異数性に関連する遺伝性疾患の原因となる。これらの点から、減数分裂時における相同検索は、細胞にとって困難であるように見えるが例えば、出芽酵母は数十分-数時間の間にペアリングを済ませることができるため、細胞はこの問題を解決するための何らかの仕組みを持ち合わせているようだ。本研究では、出芽酵母において、減数分裂の始まりからMI/MIIの細胞分裂までの間に、蛍光標識した相同染色体上の領域がどのように振舞うかを観察し、そのメカニズムを明らかにしようとした。

[本研究課題の成果]

相同染色体の 2 色長期ライブセルイメージング

本研究の実施一年目であった2019年度は、相同染色体上の相同領域に対して、TetOアレイとTetR-mEGFPを用いた単色によるラベリングを行うことで、減数分裂中の相同染色体の振る舞いを観察し、明らかにしようとした。しかし、解析を進めるとともに、単色ではその解像度の問題から300-500 nm以内にスポットが接近した場合、その結果と解析の説得力が弱く、ペアリングの定義を行うことが困難であることが問題として浮上した。そのため、単色によるイメージングの結果を補強するために、二年目の2020年度は相同染色体の相同領域をTetO/TetR-mCherryとLacO/LacI-mEGFPの2色によるラベリングを行うことでイメージングを行った。一年目の段階で、2色イメージングを避けた理由は、減数分裂に誘導する際に、大規模なタンパク質分解が起これ、蛍光タンパク質によるラベリングが不明瞭になることが原因であった。そのため、成熟時間が非常に短い蛍光タンパク質を選択する必要性があり、緑色系タンパク質としてはmEGFP、そして、赤色系タンパク質としては成熟時間が短いmCherryを選択した。mCherryはmEGFPと比べて蛍光強度が低いいため、タンデムに2個のmCherryを連結させることで、蛍光強度を上昇させた。mEGFPは、これまでの単色系イメージングとして、TetO/TetR-mEGFPのイメージングを行っていた際は問題が見られなかったが、LacO/LacI-mEGFPのイメージングを行なった場合は減数分裂開始後に極端に蛍光強度が減衰した。この問題を克服するために、減数分裂中にも誘導することが可能であるCUP1プロモーターに接続したLacI-mEGFPを用い、さらにCuSO₄を培地成分中に追加することで、LacI-mEGFPの発現量の補強を行った。その結果、減数分裂に誘導後、1.5時間程度からMI/MIIの分裂まで、5-10時間程度の間、TetO/TeR-mCherryとLacO/LacI-mEGFPの二色の輝点を、1分ごとに観察することが可能になった。

相同染色体の振る舞いとホモログペアリング

相同染色体の振る舞いを明らかにするために、相同染色体上の相同領域をTetOアレイとLacOアレイによりラベルした。その際、TetR-mCherryとLacI-mEGFPを用いた。2色3次元イメージングでは単色イメージングよりも明確なペアリング/非ペアリング状態を示すことができた。相同染色体間におけるペアリングが開始する以前は、相同領域のスポットが平均1.5 μm 程度離れていたのに対し、ペアリング開始後は0.4 μm 程度まで距離が減少した。そして、この距離はMI分裂が始まる直前まで維持された。この現象は観察した全ての相同染色体上の相同領域のスポットと細胞で観察された。したがって、減数分裂期の出芽酵母においては一般的な現象であると考えられる。これらのペアリング開始を定量的に示すために、FRET解析で用いられる統計手法を応用することで、非ペアリング期間とペアリング期間を明確に定義することができた。さらに、相同染色体間におけるペアリング開始点は、染色体上の領域により小さな差はあるものの、1分から10分というかなり早い時間で完了することが明らかになった。更なる詳細を明らかにするために、1秒間隔の高時間解像度で、2色3次元イメージングを行なった。その結果、20秒程度で2 μm 以上離れていた騒動領域のスポットがペアリングを開始した例も見られた。このことから30秒-10分程度という短いスパンで、1.5 μm 以上離れていた相同染色体上の領域が0.4 μm 程度まで距離を縮め、相同染色体間ペアリングを開始することが明らかになった。

ホモログペアリングに必要な要素

このペアリングを可能にするメカニズムを明らかにするために様々な解析を行なった。まず、このペアリングが相同染色体間において特異的に観察されることを証明するために、非相同染色体における非相同領域の蛍光ラベリングとその観察を行った。2番染色体のLYS2サイトと15番染色体のADE2サイトをラベリングして観察したところ、MI分裂までに相同染色体間のペアリングは見られなかった。この結果から、減数分裂中に見られるペアリングは相同染色体間に限定されることが明らかになった。次に、相同組換えの始まりに必要なプログラムDNA二本鎖切断(DSB)を引き起こすSPO11タンパク質の変異株を観察した。SPO11の変異体であるspo11Y135Fは、二本鎖切断のみを特異的に阻害する。spo11Y135Fの変異株において、相同染色体上の相同領域を蛍光ラベリングして観察したところ、MIが開始するまでの間、ペアリングは観察されなかった。この結果から、減数分裂中のペアリングは相同染色体間において、DSB依存的に開始されることが明らかになった。さらに、減数分裂で重要とされる3つの遺伝子に注目した。その内の2つはRAD51とDMC1である。これらの遺伝子はRecAタンパク質のホモログであり、真核生物において、二本鎖切断されたDNAの修復を担う。RAD51は体細胞分裂期と減数分裂期、ともに機能するが、DMC1は減数分裂期においてのみ機能する。それぞれの変異株を観察した結果、ともに80%程度の細胞においてはペアリングが観察されなかった。しかし、残りの20%程度の細胞では、野生株と比べてルーズであるものの、ペアリングが観察された。次に、RAD51とDMC1が互いに機能を補完している可能性が考え、RAD51とDMC1の両方の変異体を持つ株を作成し、観察した。しかしながら、それでもなお、10%程度の細胞ではペアリングが観察された。このことから、DSB後の修復メカニズムがホモログペアリングに重要であるものの、他にもホモログペアリングを成立させることができる経路が存在することが示唆された。そこで、減数分裂期において、重要な遺伝子であるZIP1の変異株を観察した。ZIP1は減数分裂期特異的に、相同染色体間で見られるシナプトネマ複合体の形成を開始する重要な遺伝子である。しかし、ZIP1の変異株では、RAD51やDMC1と異なり、野生株と同様のホモログペアリングが観察された。このことから、シナプトネマ複合体自体は、ホモログペアリング後の相同組換えには重要であるが、ホモログペアリングの開始のために必要ではないことが示唆された。RAD51,DMC1,ZIP1のお互いのさらなる補完関係を調べるためには、3遺伝子の変異株を作成する必要があるが、まだ作成には至っていない。これらの結果から、減数分裂におけるホモログペアリングは、相同染色体間で、DSBにより開始し、シナプトネマ複合体に関連するZIP1は必要ないが、DMC1とRAD51は多くの場合において必要であることが示された。

仮説

ここまで見てきた 30 秒-10 分程度で完了する減数分裂中のホモログペアリングは、これまでの研究では報告されておらず、減数分裂期の相同染色体の挙動を示すととともに、初めての発見である。ホモログペアリングの基本構成要素に関して解析を行ってきたが、ここで3つの仮説を考えてその検証に移った。最初の仮説はアクチンとテロメアの相互作用を介した染色体の高速移動による検索の効率化によるものである。二つ目の仮説は、今回のイメージングで観察することができていない、染色体上の他の領域においてペアリングが維持されているというものである。そして、三つ目の仮説としては、過去に報告されている触手仮説(Kim et al., 2010 Cell)のように、DNA の一部、または何かの構造物が染色体間をブリッジしているというものである。

アクチン-テロメアの相互作用による染色体の高速移動

減数分裂の出芽酵母においては、核外のアクチン繊維と核内のテロメアがLINCというタンパク質複合体とMyo2タンパク質を介することにより、染色体の高速移動を可能にしていることが明らかとなっている。染色体の蛍光ラベリングと3Dイメージングを駆使することにより、このテロメアのさらなる挙動を明らかにした(Nozaki et al., 2021 accepted)。しかし、依然としてこの染色体の高速移動がホモログペアリングに重要であるかについては議論が続けられている。LINC複合体の一部であるNDJ1の変異株をつくることで、ホモログペアリングがどのように変化するかを観察した。その結果、ホモログペアリングは行われるものの、一部の細胞では遅延が起これ、さらに一部の細胞ではペアリングに必要な時間が延長された。この結果から、染色体の高速移動が失われた状態でも、ホモログペアリングは観察されるが、その一部には障害が起きていることが明らかになった。このことから、染色体の高速移動は、何かしらの検索効率化に必須であることが示された。

染色体上の複数領域の蛍光標識イメージング

染色体上の1領域だけを蛍光標識したイメージングでは染色体の他の領域がどのようになっているのか、例えばペアリングが早い段階で行われていて、それが維持されているのか、明らかではない。そのために、出芽酵母の16本の染色体の中でも、短い部類に含まれる3番染色体を選択し、その両端に近い部分であるHIS4LEU2領域とHMR領域をそれぞれTetOとLacOで蛍光ラベリングし、観察した。その結果、減数分裂期では、HIS4LEU2領域とHMR領域がともに2 μm 以上離れた状態から1-2分でペアリングが完了することが明らかになった。この際、HMRとHIS4LEU2の蛍光スポットのうち、それぞれの組み合わせは2組あるが、コントロールとして行なった相同染色体の一方だけを蛍光ラベリングしたイメージングにより、減数分裂期の間、HMR領域とHIS4LEU2領域の距離は1 μm を超えないことが明らかになった。これらの結果を合わせることで、HMRとHIS4LEU2の蛍光スポットがそれぞれ2 μm 以上離れている場合は、3番染色体の相同染色体はそれぞれ完全に独立しており、1-2分のうちに、急激に相同染色体が引き寄せられ、ペアリングが始まることが明らかになった。

その他の物体がブリッジしている可能性

触手仮説に代表されるようなDSB後のクロマチンループの先端が、染色体間を繋いでいる可能性も考えられるが、2 μm という距離は計算上非常に難しい。他にも核内アクチンやチューブリンなどのタンパク質が橋渡ししている可能性もあるが現状そこまで研究を進められていない。

COVID19による影響とこれからの展望

減数分裂期における急激なホモログペアリング開始の現象について、長時間3Dライブセルイメージングを用いることで明らかにすることができた。このホモログペアリング開始の挙動についてはこれまで報告がされていない新しい知見である。しかし、ホモログペアリング開始の詳しい分子メカニズムと物理メカニズムの解明には至っていない。申請者の受け入れ研究期間であるハーバード大学が所在するアメリカ合衆国マサチューセッツ州は、2020年3月から、COVID-19の影響により、3/16から6/8まで大学が完全に閉鎖され、研究を中断することが余儀なくされ

た. 再開後も一年近くの間, ラボ使用率を25-50%程度に削減する必要があり, 研究の実施はかなり困難を極めた. このようなCOVID19の影響もあり非常に大変な時期となったが, 考える時間をとることもできたおかげで今回のような観察結果を得ることができた. 特に特別措置により延長された半年間の中に多くの結果を得ることができた. 発表予定だったMeiosis Gordon conference 2020 とEMBO meiosis 2021の両方がキャンセルとなり, 発表の機会を失ったが, 一部のイメージングシステムとその解析結果に関しては論文にまとめることができた (Nozaki et al., accepted 2021). ビザの関係もあり, この後どれだけアメリカに滞在できるかについては不明瞭であるが, 残りの時間を用いて, これまでに得られた結果を論文としてまとめながら, ホモログペアリングの分子/物理メカニズムについていろいろと検証していきたいと考えている. そして, すでに申し込みをしているMeiosis Gordon conferenceで, 2022年の6月には発表したいと考えている.