

## 論文内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 23 年度博士課程 進学  
氏 名 澁谷 大輝  
指導教員名 渡邊 嘉典

### 論文題目

哺乳類の減数分裂期に染色体末端“テロメア”に形成される  
新規タンパク質複合体の同定と機能解析

### 1. 序論

我々哺乳類の体は DNA にコードされた遺伝情報とその緻密な発現制御によって形成され、維持されている。DNA は種々の構造タンパク質と結合し染色体と呼ばれる構造体を形成する。細胞は分裂の際に染色体を正確に複製・分配することで遺伝情報を次世代へと伝えており、その分配異常は様々な遺伝子疾患の原因となることが知られている。特に、配偶子形成に特化した細胞分裂である減数分裂時における染色体分配の異常は、不妊症やダウン症、タナー症候群など、重度な先天的遺伝子疾患を引き起こすことが知られており、医学的な観点からも、その分子メカニズムの解明は早急な課題である。

近年、分裂酵母を用いたモデル研究から、染色体末端構造であるテロメアが減数分裂時の染色体制御において重要な機能を持つことが明らかにされた (Hiraoka, 2006)。通常、染色体分配の際には染色体のセントロメア領域が動きの起点（動原体）として働くが、減数第一分裂前期にはテロメアが起点となり、染色体は核膜に沿った運動を行う。平岡らは、分裂酵母において減数分裂期特異的に発現するテロメアタンパク質 Bqt1/2 が、核膜タンパク質複合体 SUN/KASH と結合することでこの染色体運動を促進していることを見いだした。SUN/KASH は核膜を貫通し、その核質側でテロメアと、細胞質側で Dynein-Dynactin などの細胞質モータータンパク質と結合する。この橋渡しにより、細胞質モータータンパク質による駆動力が核内の染色体へと伝達される。この運動は最終的に相同染色体の対合・組換えを促進することで減数第一分裂における正常な染色体分配を保証している。

哺乳類を代表するモデル生物であるマウスにおいても、核膜タンパク質 SUN1/KASH5 が正常な減数分裂の進行に必須であることが報告されているが、分裂酵母 Bqt1/2 のようなこれらと相互作用するテロメアタンパク質は知られていない。また細胞内で実際にテロメアを起点とした染色体運動を観察した例も存在せず、その制御メカニズムは現象の存否もふくめて不明であった。酵母等のモデル生物と比較し

て、マウスにおける遺伝学的研究が遅れている主な要因は、その遺伝子操作の困難さにある。高等動物の減数分裂前期の進行には組織内で隣接して働く支持細胞の働きが必要であり、酵母等の単細胞生物やヒト培養細胞等に用いられる *in vitro* での簡便な遺伝子操作が適用できない。従って、その解析には遺伝子導入マウスや KO マウスなど個体レベルでの遺伝子操作を必要とする。

本研究で筆者らは、電気穿孔法による生体マウス減数分裂組織内への一過的な外来遺伝子導入システム (*in vivo electroporation* 法) を導入し、条件検討の結果、マウス精母細胞へと効率よく外来遺伝子を発現させることに成功した。そして *in vivo electroporation* 法を用いた GFP 融合タンパク質の発現やそれによる減数分裂期染色体運動の live 観察、新規遺伝子の局在スクリーニングを行い、減数分裂期テロメアによる染色体制御分子メカニズムを明らかにした。

## 2. 減数分裂期前期における染色体運動の live 観察

脳神経科学の分野でマウス脳組織への遺伝子導入技術的として確立・応用されている生体内電気穿孔法 (*in vivo electroporation*) を用い、マウス精巣内への外来遺伝子の一過的な導入を試みた。DNA 濃度やマウスの週齢、パルス電圧などのパラメーターの至適化を行った結果、外来遺伝子をコードした組換え Plasmid DNA を生体マウスの精母細胞内へと効率よく導入することに成功した。この技術をもとに、蛍光タンパク質 GFP と融合させたテロメアタンパク質 TRF1 (GFP-TRF1) を一過的に精母細胞内に発現させ、減数分裂期におけるテロメア動態の live 観察を行った。その結果、酵母等のモデル生物と同様に、第一分裂前期特異的に染色体のテロメア領域が核膜へと連結され、連結されたテロメアを起点として染色体全体がダイナミックに運動する様子が観察された。微小管重合阻害剤である Nocodazole の添加でこの運動が抑圧されたことや、免疫染色法により細胞質モータータンパク質 p150 (Dynactin) のテロメアへの集積が観察されたことから、細胞質微小管および微小管結合モータータンパク質がこの運動に寄与していることが示唆された。

## 3. 減数分裂期特異的なテロメアタンパク質 TERB1 の同定

次に、DNA マイクロアレイなどの遺伝子発現データベースから減数分裂組織 (精巣・卵巣) で発現が高いことが予測されていた遺伝子群 349 遺伝子に着目し、実際にマウスの各組織から抽出した RNA をテンプレートに用いた RT-PCR 法により、各標的遺伝子 mRNA の組織特異的な発現量を査定した。その結果、うち 4 つの遺伝子が減数分裂前期で特異的に発現していることを見いだした。これら 4 つの遺伝子に GFP を融合させ、*in vivo electroporation* 法によりマウス精母細胞内へと発現させた結果、新規遺伝子 *Ccdc79* がコードするタンパク質が染色体末端に特異的な局在を示すこと

が明らかになった。CCDC79 はヒトを含む哺乳動物間に広く保存されたタンパク質であり、その後の解析から既知のテロメアタンパク質 TRF1 とヘテロ複合体を形成することでテロメアリピート DNA に配列特異的に結合し、テロメアへと局在することが示された。上記の結果から筆者らは、この新規タンパク質を TERB1 (Telomere repeat binding bouquet formation protein) と命名した。

#### 4. TERB1 はテロメアを起点とした染色体運動を促進する

Gene trap 法により *Terb1* 遺伝子の発現を欠損させたマウス (*Terb1*KO) を作製し、その表現型解析を行った。その結果、*Terb1*KO マウスは雌雄共に一見正常な発育を示したが、減数分裂進行の異常により配偶子形成が起きず、不妊の表現型を示すことが明らかになった。次に、減数分裂の過程で具体的にどのような異常が生じているかについて免疫染色法による検証を行った。まずテロメアの動態を観察すると、野生型では、TERB1 が局在する減数第一分裂前期を通じてテロメアが核膜へと連結されていたのに対して、*Terb1*KO マウスでは多くのテロメアが核膜から離脱している様子が観察された。さらに GFP-TRF1 を発現させ live 観察を行ったところ、野生型で観察されたテロメアを起点とした染色体運動が *Terb1*KO マウスでは著しく抑圧されていることが明らかになった。同様の異常は *Sun1*KO マウスでも観察された。さらに、SUN1/KASH5 タンパク質や細胞質モータータンパク質 p150 の局在を精査したところ、いずれも野生型ではテロメアに局在したのに対し、*Terb1*KO ではそれらの局在が完全に消失していた。以上の結果から、TERB1 が SUN1/KASH5/p150 のテロメア局在を介してテロメアと核膜の結合および続く染色体運動を制御していることが示唆された。

#### 5. TERB1 は cohesin 局在を介してテロメア DNA を構造的に補強する

酵母 two-hybrid 法により TERB1 と相互作用する因子の網羅的スクリーニングを行った結果、減数分裂期において染色体軸構造形成に働くことが知られている cohesin 複合体のサブユニット SA3 が同定された。その後の解析から SA3 は TERB1 の Myb ドメインを含む C 端領域と結合することが明らかになった。さらに免疫染色法により cohesin 複合体のテロメア局在を観察すると、野生型では染色体の軸形成前段階からテロメアへと集積し、軸形成後もその末端においてテロメアと共局在したのに対して、*Terb1*KO マウスでは顕著にその局在が減少しており、cohesin の減少に起因することが報告されているテロメア DNA 間の異常な連結や伸張が頻繁に観察された。これらの表現型は *in vivo* electroporation 法による野生型 TERB1<sup>Full</sup> の発現により有意に抑圧されることが明らかになった。さらに live の結果、*Terb1*KO で低下した染色体運動が TERB1<sup>Full</sup> の発現によって有意に回復する様子が観察された。一方で、

Myb ドメインを欠いた TERB1<sup>ΔMyb</sup>を発現させた細胞では cohesin のテロメア局在やテロメア構造異常が抑圧されないばかりか、より重度のテロメア構造異常が引き起こされた。これは cohesin の集積がないまま、染色体運動が回復したためだと考えられる。実際に、live 観察の結果、TERB1<sup>ΔMyb</sup>を発現した場合には TERB1<sup>Full</sup> より弱いものの染色体運動の回復が観察された。以上の結果から、TERB1 を介した cohesin のテロメア集積が、染色体駆動力に耐えうる強固なテロメア構造を形成することや、それによりその駆動力を染色体全体へと効率良く伝搬することに働いていることが示唆された。

## 6. 総括

本研究により高等動物であるマウスにおいても、染色体のテロメア領域が減数第一分裂前期特異的に染色体運動の起点“テロメア動原体”として重要な働きを担っていることが明らかになった。またその分子メカニズムは、SUN1/KASH5 との協調的な作用など、分裂酵母で示された枠組みと類似した点が見られる一方で、cohesin を介したテロメア DNA の補強など、進化の過程で獲得されたと考えられる、より複雑化した制御が働いていることも同時に示唆された。cohesin は染色体分配の際に動きの起点として働くセントロメア/動原体においてもその構造維持に働いている事が知られており、共通した制御が“テロメア動原体”で観察されたことは大変興味深い知見である。また、本研究で導入された *in vivo* electroporation 法は哺乳類減数分裂期における分子機能解析において有用なツールになり得るばかりか、遺伝子欠損マウスに対する表現型相補にも応用可能であったことから、将来的にはヒト不妊症患者に対する遺伝子治療への応用が期待される。

## 発表論文

Morimoto A\*, Shibuya H\*, Zhu X, Kim J, Ishiguro K, Han M, Watanabe Y.

**“A conserved KASH domain protein associates with telomeres, SUN1, and dynactin during mammalian meiosis.”**

*The Journal of Cell Biology*. 2012. 198, 165-172. (\*同等貢献)

Shibuya H, Ishiguro K, Watanabe Y.

**“The TRF1-binding protein TERB1 promotes chromosome movement and telomere rigidity in meiosis.”**

*Nature Cell Biology*. in press.