

Molecular and Cellular Biological Analyses of the Chromosomal Behavior in Meiosis, Using Medaka Fish as an Experimental Model

(メダカを用いた減数分裂における染色体動態の分子細胞生物学的解析)

学位論文内容の要旨

減数分裂は、有性生殖を行う生物にとって自らの遺伝情報を子孫に伝えることで、生命の連続性を維持するために必須の機構であるばかりか、次世代に多様性をもたらすためにも重要な仕組みである。減数分裂は一回の DNA 複製と二回の細胞分裂からなり、体細胞分裂とは大きく異なった機構や分子によって制御されている。特に、第一減数分裂前期における相同染色体の対合は、組み換えや中期における紡錘体赤道面への正確な染色体の配置などに関わる重要な機構である。相同染色体の対合には減数分裂に特異的な多くの分子が関わっていることが知られており、近年その研究は飛躍的に進んでいる。酵母や哺乳類などのモデル生物を用いた研究により、減数分裂時の染色体動態の制御機構に生物種間で大きな違いがあることが示された。脊椎動物における研究は哺乳類に限られており、下等脊椎動物では全くなされていない。従って、減数分裂時の染色体動態の制御機構において、酵母から哺乳類までの全ての真核生物で共通の部分と、それぞれの種において異なる部分を明確にするためには、より多くの生物種で研究を進めなくてはならない。

そこで、申請者は、下等脊椎動物のモデル生物として、近年、遺伝学的、発生生物学的な情報が集積しつつあるメダカを用いて、減数分裂時の染色体動態の制御機構の分子細胞生物学的解析を行った。

第1章

コヒーシンは、酵母から哺乳類まで良く保存された姉妹染色体の結合に関わるタンパク質複合体である。減数分裂における染色体動態は体細胞分裂と大きく異なり、減数分裂に特異的なコヒーシンタンパク質がその制御を担っている。実際、酵母では減数分裂特異的なコヒーシンタンパク質として Rec8 が、哺乳類ではこれに加えて SMC1 β と STAG3 が減数分裂時の特徴的な染色体動態を制御している。しかし、脊椎動物では哺乳類以外の報告がなく、その機構が脊椎動物で共通なのかどうかは不明である。そこで、申請者は、下等脊椎動物のメダカを用いて、コヒーシンタンパク質の減数分裂時における動態を観察した。まず、コヒーシンサブユニットの SMC1 α 、SMC1 β 、SMC3、Rad21 の cDNA を単離し、その特異的な抗体を作製し、局在を観察した。SMC1 β はこれまで哺乳類での

み存在が確認されていたが、今回の研究から哺乳類だけではなく脊椎動物に一般的に存在することが示された。さらに精巣での発現を観察した結果、SMC1 β は哺乳類では減数分裂特異的であるが、メダカでは生殖細胞特異的であることが明らかになった。また、メダカのSMC1 β は第一減数分裂中期において染色体全体に局在し、セントロメア部分にのみ局在する哺乳類のSMC1 β とは大きく異なること、体細胞分裂型コヒーシサブユニットであるSMC1 α とRad21は哺乳類では減数分裂にも関与することが示唆されているが、メダカでは減数分裂時には発現しておらず、減数分裂には関与しないことなどを明らかにした。申請者が明らかにしたコヒーシサブユニットの挙動が脊椎動物内でも種により異なるという事実は、減数分裂に特異的な染色体分配を制御する仕組みが、全生物に共通の部分のみで成り立っているのではなく、種特異的な部分も多く存在することを示す。

第2章

減数分裂時には、体細胞分裂時には観察されない特異的な構造が存在する。それは、パキテン期に完成し、組み換えや相同染色体の対合に関わる梯子状の構造のシナプトネマ複合体である。シナプトネマ複合体は、全生物の減数分裂時に観察される構造であるが、その構成タンパク質は種によって大きく異なり、アミノ酸レベルでの相同性はほとんどない。メダカを含む魚類でもシナプトネマ複合体は形態学的に観察されているが、その構成タンパク質に関する報告はない。そこで、申請者は、シナプトネマ複合体の構成要素であるSCP1とSCP3のメダカホモログをクローニングし、特異的抗体を作製し、それらの局在を観察した。発現時期は哺乳類での報告と同様であったが、前述のSMC1 β の染色体上での局在と同様、メダカSCP3の局在は哺乳類と異なっていた。これらの結果からも、減数分裂時の染色体動態の制御機構は種によって大きく異なることが示唆された。

第3章

メダカには近縁種が多数存在し、様々な組み合わせの雑種が報告されている。ニホンメダカとハイナンメダカの雑種では、雌雄ともに減数分裂時に相同染色体の対合に異常をきたし、減数分裂が停止する。申請者は、この異常にコヒーシンとシナプトネマ複合体が関与する可能性を、本雑種におけるこれらタンパク質の発現と局在を調べることで検証した。その結果、雑種ではシナプトネマ複合体の中心要素の構成要素であるSCP1の発現量が低下し、不完全なシナプトネマ複合体を形成することが分かった。雑種での配偶子形成異常は多くの生物で観察される現象であるが、その原因分子を明らかにした例はほとんどなく、少なくとも脊椎動物では本研究が初めての成果と考えられる。

以上、本研究はこれまで減数分裂時の染色体動態の研究に使用されることのなかったメダカを材料に、減数分裂の制御機構の共通性と種特異性を明らかにすることを目的としたもので、独創性に富んだ研究である。本研究成果は、有性生殖を行う生物にとって重要な減数分裂の分子細胞レベルでの制御機構の理解に資するのみならず、この機構の進化を考察する上でも重要な基盤となるものである。

学位論文審査の要旨

| | | | |
|----|-----|----|----|
| 主査 | 教授 | 山下 | 正兼 |
| 副査 | 教授 | 高橋 | 孝行 |
| 副査 | 助教授 | 若原 | 正己 |
| 副査 | 助教授 | 木村 | 敦 |

学位論文題名

Molecular and Cellular Biological Analyses of the Chromosomal Behavior in Meiosis, Using Medaka Fish as an Experimental Model

(メダカを用いた減数分裂における染色体動態の分子細胞生物学的解析)

有性生殖を行う生物にとって、減数分裂は自らの遺伝情報を子孫に伝えることで、生命の連続性を維持するために必須の機構であるばかりか、次世代に多様性をもたらす重要な仕組みでもある。減数分裂は体細胞分裂とは異なる機構で制御されており、関与する分子も大きく異なる。さらに、酵母や哺乳類などのモデル生物を用いた研究から、減数分裂時の染色体動態の制御機構には種により異なる部分があることが示されている。これまで、脊椎動物における研究は哺乳類に限定され、下等脊椎動物ではなされていない。減数分裂時の染色体動態の制御機構において、酵母から哺乳類までの全ての真核生物で共通な部分と種特異的な部分を明確にするためには、より多くの生物種での研究が必要である。そこで本研究は、下等脊椎動物のモデル動物であるニホンメダカ *Oryzias latipes* を用いて、減数分裂における染色体動態の制御機構の解明を目的に行われた。

学位論文は3章からなる。第1章では、分裂期において姉妹染色分体を結合するコヒーシナンパク質複合体の各サブユニットをメダカでクローニングし、それらの抗体を作製して精巣における局在を観察した。その結果、哺乳類との相違点と共通点を明らかにすることができた。特に、第一減数分裂中期における染色体上での減数分裂特異的コヒーシンサブユニットである SMC1 β の局在の相違は、哺乳類とメダカで減数分裂における染色体の分離・分配機構に違いがあることを示す重要な発見である。

第2章では、減数分裂特異的なタンパク質複合体で相同染色体の対合に直接関わるシナプトネマ複合体の構成タンパク質の局在を観察した。シナプトネマ複合体は有性生殖を行う生物に共通に観察される構造であるが、その構成タンパク質にはアミノ酸レベルで相同性が見られない。そのため、シナプトネマ複合体を構成する複数のタンパク質の個々の役割は、種によって異なることが示唆されている。しかし、脊椎動物では哺乳類以外にはシナプトネマ複合体の構成タンパク質に関する情報は乏しく、メダカを含む魚類における報告は、これまで皆無であった。そこで本研究では、メダカシナプトネマ複合体の構成タンパク質(SCP1 と SCP3)を認識する抗体を作製し、それらの局在を詳しく観察した。その結果、メダカでの発現時期は哺乳類でのそれと同様であったが、SCP3 の染色体上における局在の違いが見られた。第1章で得られた結果と合わせると、減数分裂時の染色体動態の制御機構は、メダカと哺乳類で大きく異なることが示唆された。

第3章では、ニホンメダカの近縁種であるハイナンメダカ *O. curvinotus* とニホンメダカとをか

け合わせた雑種を用いた解析を行った。形態学的観察から、本雑種では雌雄ともに相同染色体の対合不全が起こり、減数分裂が異常になることが知られている。この異常にコヒーシとシナプトネマ複合体が関わる可能性を検討するため、これら構成タンパク質の発現と局在を調べた。その結果、雑種では SCP1 の発現量が低下し、その局在が異常であることが分かった。これは、一般的に知られる雑種での減数分裂異常に関して、分子レベルでの原因を明らかにした初めての成果である。

以上をまとめると、著者は、従来ほとんど研究が行われてこなかった下等脊椎動物であるメダカを用いて、減数分裂における染色体動態制御の分子細胞生物学的な解析を行った。その結果、いくつかの重要なタンパク質の動態解析に成功し、減数分裂時の染色体動態制御において普遍的な部分と種により異なる部分を明らかにすることができた。以上の成果は、有性生殖の基盤である減数分裂時の染色体動態制御機構の理解に貢献するところ大なるものがある。

よって著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格あるものと認める。