## 科学研究費助成事業研究成果報告書



平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号: 11301 研究種目: 若手研究(B) 研究期間: 2015~2017

課題番号: 15K18475

研究課題名(和文)配偶核にて発見した新奇な「ゲノムの切断と修復」の機構と機能の解明

研究課題名(英文) A novel formation of double-strand DNA breaks in the haploid germline nuclei of Tetrahymena thermophila. Study for its molecular mechanisms and biological roles

#### 研究代表者

福田 康弘 (Yasuhiro, Fukuda)

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号:50527794

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):繊毛虫テトラヒメナの有性生殖では,減数分裂を終えた半数性の核ゲノム DNA が切断される.そして直ちに切断された DNA は修復され,これが配偶核として受精へ進む.このゲノムの切断と修復は,配偶核の発達に不可欠な現象である.ゲノム切断の分子メカニズムを紐解くと,よく知られていた遺伝子の新規機能であったことが明らかとなった.また DNA 修復を終えた核を解析したところ,核クロマチンは再構築されていることを示す結果が得られた.すなわちゲノムの切断と修復は,次世代のオリジンとしての配偶核の成熟に不可欠なクロマチンの初期化を誘発している考えられる.

研究成果の概要(英文): In this study, molecular mechanisms and biological roles of a novel formation of post-meiotic DNA double-strand breaks (DSB) in the haploid micronuclei (pronuclei) of Tetrahymena thermophila were analyzed. After completion of meiosis, the Topll, and Spo11 mediated DSB formation in all the four pronuclei. Soon thereafter, DNA repair including histone replacement took place in the pronucleus that was adjacent to the mating-junction. This nucleus then began an additional mitosis as the selected pronucleus to produce gametic nuclei, while the other three unselected nuclei with persistent DSB eventually disappeared from the cytoplasm. Defective DSB formation in mutant strains abolishes not only nuclear selection but also histone replacement. These results suggest that the post-meiotic DSB is likely an intrinsic developmental program of the pronucleus and potentially contributes to chromatin remodeling to produce gametic nuclei capable of forming a zygotic nucleus.

研究分野: 分子生物学

キーワード: クロマチン再構築 DSB テトラヒメナ 配偶核

### 1.研究開始当初の背景

繊毛虫は機能的に分化した 2 核(大核・小核)を 1 つの細胞質内にもつ.大核は再配列されたゲノムをもち,活発な子遺伝子発現をおこなうことで細胞の代謝の維持を担う,体細胞系としての役割を果たす.一方,小核は静的な核であり,繊毛虫としての再配列されていないゲノムを保持する生殖系である.

繊毛虫は接合と呼ばれる有性生殖を行う.接合では,まず小核が減数分裂して 4 つの半数体核が作られる.このうち 1 核が配偶核へ発達して受精へ進み,やがて次世代の新小核と新大核へ分化する.親世代の大核はオートファジーで細胞質内から除去されることで,世代が交代する(引用 ).

接合には世代交代を制御しているチェックポイントがあると考えられていた.しかし, チェックポイントが存在する時期や分子システムの詳細などは全く不明であった.

### 2.研究の目的

我々はモデル繊毛虫であるテトラヒメナを用いて研究をすすめ,SSA5 (HSP70) が受精における配偶核の融合に関与することを明らかにした(引用 ). この研究から,世代交代のチェックポイントは受精よりも前の時期に存在することが示唆された.そこで減数分裂から配偶核発達までの過程について解析を進めたところ,ヒストン H2AX  $K139ph: \gamma H2AX$  が減数分裂を終えた 4 つ全ての半数性核に現れ,そして 1 核のみで  $\gamma H2AX$  は消失し,その核が配偶核へ発達するという新奇な現象を発見した.

γH2AX は DNA 二重鎖切断 (DSB) のエ ピジェネェティクス指標である.このことか ら,配偶核の発達には,DSBによるゲノムの 切断と切断された DNA の修復が重要であ ることが考えられる .また γH2AX が消えた 半数性核では,新生ヒストンタンパク質の導 入を示すマーカーが観察された.これらの結 果をもとに,1)ゲノムの切断と修復によっ てクロマチンが再構築され, 受精後に大核と 小核のどちらへも分化できる多能性を配偶 核のゲノムが獲得する.そして,2)配偶核 ゲノムのリプログラミングの完了がチェッ クポイントで監査される.という仮説を構築 した.本研究では,この作業仮説を検証する ことにより,ゲノムの切断から始まる世代交 代を支配している分子機構の解明に取り組 んだ.

#### 3.研究の方法

PFGE とサザンブロットを組み合わせた 解析から  $\gamma$ H2AX が示した DSB による半 数性核ゲノムの切断の直接的証拠を捉える ことを試みた.

DSB の実行因子を特定するため,テトラヒメナのゲノムデータベースを活用して関

与が疑われる候補遺伝子をリスト化した.リスト化された遺伝子について,タグ融合遺伝子発現株や遺伝子欠損・発現抑制株を作成し,機能解析を進めた.

γH2AX が消えた半数性核では,新生ヒストンタンパク質の導入を示すマーカーが観察された.このことから,DNA 修復に伴うクロマチン再構築を完了した核が配偶核として発達している我々は仮定した.そこでDNA の修復に伴うクロマチン再構築を検証するため,ゲノム DSB 修復時にリクルートされる ATP 依存性クロマチン再編成因子の特定,また配偶核で特異的に観察されるエピジェネティクス変化:ヒストン修飾の探索を行った.

#### 4. 研究成果

PFGE とサザンブロットの解析では 減数分裂前期の相同組替えとは明らかに異なる断片化されたゲノムが減数分裂後の時期の細胞集団から検出された.サザンブロットのシグナルは,ゲノムが約 3 Mbp を主とする4-2 Mbp 程度の長さに断片化されていることを明らかにした.この結果から,減数分裂を終えた後に半数性核のゲノムは確かに切断されており,我々が発見した新たなγH2AX 形成は,半数性核ゲノムの切断に対する応答であることが確認された.

リスト化された候補遺伝子について局在と機能解析を進めた.その結果,減数分裂後の半数性核に生じる DSB は,小核特異的に局在する Topoisomerase II (Top2)と,さらにSPO11 によって誘導されていることが突き止めた.とくに SPO11 が減数分裂後の DSB 誘導に関わっていたことは驚くべき事である.従来,SPO11 は減数分裂前期における相同組替えの誘導において不可欠,かつ限定的に機能している DNA 切断酵素として考えられている.従って本研究の結果,SPO11 が相同組替えとは全く異なる DSB においても役割を果たしていることが初めて明らかになった.

Top2 および SPO11 の欠損・発現抑制株では、DSB による半数性核ゲノムの切断とγH2AX 形成の両方が著しく抑制された.これら半数体核の DSB 形成が抑制された細胞では、配偶核へ発達する半数体核の選択が起こらず、接合は中断された.したがって、Top2および Spo11 が誘導する DSB は、配偶核形成に不可欠な役割を果たしていることが明らかになった.

配偶核へ発達する核について,市販の様々な抗ヒストン修飾特異的抗体を用いたIF による観察を行った.その結果,すでに明らかにしている新生クロマチンタンパク質の蓄積を示すマーカーである H3K56ac および Asfl に加え,ヒストン H3 でのリジン 2

残基,H4 でのリジン 1 残基で配偶核特異的な修飾が DNA 修復後に現れることが明らかになった.これらのリジン残基は,クロマチン構造の転換と遺伝子発現活性化のエピジェネティクスマーカーとして知られるものである.この結果は,小核が減数分裂することで生じた半数性核から配偶核へと発きする過程において,クロマチンの状態はあった.そしてクロマチンの変化には,DSB にするゲノム DNA の切断と DNA 修復が不可欠である.

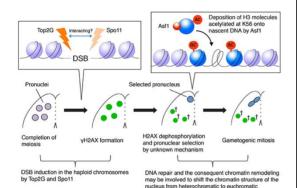


図 1: 本研究で明らかになった配偶核から 発見された新奇な「ゲノムの切断と修復」の 分子メカニズムの概要(業績: 雑誌論文 よ り)

## <引用文献>

AKEMATSU Takahiko, FUKUDA Yasuhiro, ATTIQ Rizwan, RONALD Pearlman E., Role of class III phosphatidylinositol 3-kinase during programmed nuclear death of Tetrahymena thermophila. autophagy. 2014, doi.org/10.4161/auto.26929

FUKUDA Yasuhiro, AKEMATSU Takahiko, ATTIQ Rizwan, TADA Chika, NAKAI Yutaka, RONALD Pearlman E., 2015. Role of The Cytosolic Heat Shock Protein 70 Ssa5 in the Ciliate Protozoan Tetrahymena thermophila. J Eukaryotic Microbiology. 2015, doi:10.1111/jeu.12203

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に は下線)

### 〔雑誌論文〕(計3件)

AKEMATSU Takahiko, FINDLAY Andrew, FUKUDA Yasuhiro, PEARLMAN E. Ronald, LOIDL, Josef, ORIAS Eduardo and HAMILTON P. Eileen., Resistance to 6-Methylpurine is Conferred by Defective Adenine Phosphoribosyltransferase in *Tetrahymena*, 查読有, Genes 2018, 9, 179; doi:10.3390/genes9040179

IWAMOTO Masaaki, OSAKADA Hiroko,

MORI Chie, <u>FUKUDA Yasuhiro</u>, NAGAO Koji, OBUSE Chikashi, HIROOKA Yasushi, and HARAGUCHI Tokuko. ompositionally distinct nuclear pore complexes of functionally distinct dimorphic nuclei in the ciliate *Tetrahymena*, 查読有, Journal of Cell Science (2017) 130, 1822-1834 doi:10.1242/jcs.199398

AKEMATSU Takahiko, <u>FUKUDA Yasuhiro</u>, GRAG Jyoti, FILLINGHAM S. Jeffrey S, PEARLMAN E. Ronald, LOIDL Josef, Post-meiotic DNA double-strand breaks occur in *Tetrahymena*, and require Topoisomerase II and Spo11, 查読有, eLife 2017;6:e26176. DOI: 10.7554/eLife.26176

### [学会発表](計6件)

二核性生物テトラヒメナの大小核核膜孔複合体の違い, 岩本 政明, 小坂田 裕子,森 知栄 福田 康弘 ,長尾 恒治 ,小布施 力史, 平岡 泰,原口 徳子,第40回日本分子生物学会年会(2017)

テトラヒメナの配偶核形成における DNA 二重鎖切断とその役割について

<u>福田 康弘</u>, 明松 隆彦, Ronald E. Pearlman, 多田 千佳, Josef Loidl, 中井 裕, 第39 回日本分子生物学会年会(2016)

繊毛虫テトラヒメナの半数体核に生じる DNA 二重鎖切断とメカニズム

<u>福田 康弘</u>, 明松 隆彦, Ronald E. Pearlman, 多田 千佳, Josef Loidl, 中井 裕, 第49 回日本原生生物学会(2016)

Immunofluorescent observation of histone H4 acetylation in micronuclei during the early stages of conjugation in Tetrahymena thermophila, <u>FUKUDA</u> <u>Yasuhiro.</u>, AKEMATSU Takahiko., TADA Chika., NAKAI Yutaka, Ciliate Molecular Meeting, (2015)

A novel formation of γ-H2AX in postmeiotic micronuclei and its relation to nuclear reprogramming in *Tetrahymena thermophila*, AKEMATSU Takahiko., <u>FUKUDA Yasuhiro.</u>, GRAG Jyoti., FILLINGHAM S. Jeffrey S, PEARLMAN E. Ronald, LOIDL Josef. Ciliate Molecular Meeting, (2015)

テトラヒメナの半数体核に生じる DNA 切断とクロマチン再構成について. <u>福田康</u> <u>弘</u>,明松隆彦,Ronald E. Pearlman, Josef LoidI,多田 千佳,中井裕,第48回日本 原生生物学会大会(2015)

[図書]

## 該当なし

## 〔産業財産権〕

# 該当なし

〔その他〕 ホームページ等

## 6.研究組織

(1)研究代表者

福田 康弘( FUKUDA Yasuhiro ) 東北大学・大学院農学研究科・助教 研究者番号:50527794

# (2)研究分担者

該当なし

# (3)連携研究者

該当なし

# (4)研究協力者

明松 隆彦 ( AKEMATSU, Takahiko )
Department of Chromosome Biology • Center for
Molecular Biology • University of Vienna •
INDICAR Fellow

## PEARLMAN, E. Ronald

Dept. of Biology • Core Molecular Biology Facility • York University • Director, University Professor Emeritus and Senior Scholar