

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：12608

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07422

研究課題名(和文) 減数分裂特異的に相同染色体間の接着を媒介するメカニズムとその制御

研究課題名(英文) Understanding the mechanisms for ensuring timely destruction of the synaptonemal complex during meiosis

研究代表者

坪内 英生 (TSUBOUCHI, Hideo)

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教

研究者番号：20283822

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：シナプトネマ複合体は減数第一分裂前期特異的に染色体上に形成される高次構造で、その際凝縮した相同染色体同士がその全長に渡って密着し相同染色体間で遺伝情報の交換を促進する。シナプトネマ複合体は細胞周期が第一分裂中期に移行するに従い速やかに解離するがその制御機構の多くは不明であった。本研究ではその制御において、主要な細胞周期調節キナーゼであるDDK(Dbf4依存性Cdc7キナーゼ)、ポロキナーゼ、CDK1キナーゼが協調的に機能することを示した。また、シナプトネマ複合体の解離に伴い体細胞分裂期型相同組換え機構が再活性化することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The synaptonemal complex (SC) is a proteinaceous macromolecular assembly that forms during meiotic prophase I and mediates adhesion of paired homologous chromosomes. We showed that DDK (Dbf4-dependent Cdc7 kinase) is central to regulating SC destruction happening at the prophase I exit. Dbf4, the regulatory subunit of DDK, directly associates with and is phosphorylated by the Polo-like kinase Cdc5. In parallel, upregulated CDK1 activity also targets Dbf4. SC destruction relieved meiotic inhibition of the ubiquitous recombinase Rad51, suggesting that the mitotic recombination machinery is reactivated following prophase I exit to repair any persisting meiotic DNA double-strand breaks. We propose that the concerted action of DDK, Polo-like kinase, and CDK1 promotes efficient SC destruction at the end of prophase I to ensure faithful inheritance of the genome.

研究分野：分子遺伝学 細胞生物学

キーワード：減数分裂 相同組換え シナプトネマ複合体 染色体 細胞周期

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

減数分裂に特徴的なのは減数第一分裂である。その過程においては、体細胞分裂で姉妹染色分体が分配されるのと大きく異なり、相同染色体が分配される。その為には相同組換え、およびその結果生じる相同染色体間の交叉型組換え体形成(キアズマ)が必須である。私はこれまで出芽酵母をモデルとして、減数分裂前期において相同染色体の認識とキアズマ形成を促進する過程で働く生体分子の同定と解析を行ってきた。

減数第一分裂前期において、DNA レベルでの相同性の認識は染色体レベルでの相同性の認識、更には相同染色体間の対合を引き起こす。その過程で、染色体が凝縮するのに伴い、クロマチンループを束ねる染色体軸が形成される。この染色体軸が足がかりとなり、接着を媒介するタンパク質が入り込み、あたかも洋服のジッパーが閉じるかの様に相同染色体同士が接着する。この構造をシナプトネマ複合体と呼ぶ。シナプトネマ複合体は特徴的な3層構造により構成され、外側の2層を側方因子、真ん中の層を中心因子と呼ぶ。出芽酵母では、Zip1 タンパク質が接着を直接媒介する事が分かっている。よって、Zip1 の重合の制御を理解する事がシナプトネマ複合体形成のメカニズムを理解する上で重要である。Zip1 の結合様式は極めて規則的で、Zip1 タンパク質のN末端同士が中心部分で、それぞれのC末端が相同染色体軸と相互作用する。

シナプトネマ複合体が染色体分配に先立ち染色体上から取り除かれる事は第一分裂で染色体が正常に分配される為には必須であるが、その分子機構はほとんど分かっていない。研究代表者の研究グループは、シナプトネマ複合体の分解反応が細胞周期依存的キナーゼである DDK (Dbf4-dependent Cdc7 kinase) と Polo キナーゼの連携により制御されている事を見出していた。この中で、DDK における活性制御因子である Dbf4 が第一分裂前期終了と共に Polo キナーゼによりリン酸化されるという知見を得ていた。この高度に保存された二種類の細胞周期キナーゼが細胞周期特異的なシナプトネマ複合体の解離とどのような関係にあるのか、その分子機構の解明に強い興味を持たれた。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまで、シナプトネマ複合体の解析が最も進んでいる出芽酵母を用いて、その構築と分解の鍵となる因子を特定した。本申請研究では、シナプトネマ複合体が染色体分配に先立ちどのように解体されるのか、その制御機構を分子レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

出芽酵母の取り扱い、変異体の作成などは一般的プロトコルに従った (Methods in

Enzymology: Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology 194, 3-933 (1991))。分子生物学的実験、細胞生物学的実験に関しては Method in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual に準じて行った。

4. 研究成果

(1) 減数分裂期細胞周期制御には DDK と Polo キナーゼの相互作用が重要である
減数分裂期特異的に相同組換えに関与する遺伝子を欠損させると減数分裂開始時に誘導される相同組換えが異常を来し細胞周期の進行が遅延、もしくは停止する。我々はこの表現型が Dbf4 を高発現することで抑制されることを見出した。更に *DBF4* 遺伝子に積極的に変異を導入し、上述の効果が通常の発現レベルで得られる *DBF4* 変異をスクリーニングした結果 *dbf4-E86V* 変異を得た。Dbf4 において、その 83~88 アミノ酸残基は Cdc5 (出芽酵母の Polo キナーゼ) との相互作用部位であることが知られているが、その中でも E86 は相互作用に必須ではないアミノ酸である。そこで、Dbf4 と Cdc5 の相互作用の強度を、fluorescence polarization assay 及び免疫沈降法で調べた。相互作用に必須なアミノ酸である R83 を E に置換したもの (Dbf4-R83E) では、相互作用が予想通り失われていたものの、今回単離した Dbf4-E86V では Cdc5 との相互作用が野生型の Dbf4 より強くなっていることが明らかとなった。よって、DDK と Cdc5 の相互作用は細胞周期進行の促進に働くことが示唆された。

(2) 細胞周期進行の促進には Rad51 の活性化が関与している

減数分裂期組換えは減数第一分裂前期特異的に形成される DNA 二重鎖切断 (DSB) により誘導される。体細胞分裂期においては DSB は相同組換え酵素である Rad51 を中心とした相同組換え機構により修復される。一方減数分裂期においては、減数分裂期特異的な相同組換え酵素である Dmc1 が必須の役割を担う。この間 Rad51 の活性は様々な機構により抑制されている。この為 Dmc1 の機能が欠損すると Rad51 が存在するにも関わらず、DSB は修復されず細胞周期は滞る。このような細胞周期の遅延、停止は DDK と Cdc5 の相互作用の上昇により抑制され、細胞周期が進行するようになる。そこで細胞周期の進行が Dmc1 非存在化での DSB の修復に伴うかどうかをサザンブロット法により直接検証した。

dbf4-E86V においては Dmc1 非存在下でも徐々に DSB が修復され、その修復は Rad51 に依存することが明らかになった。このことから DDK と Cdc5 の相互作用は減数分裂期に生じる Rad51 の抑制効果を解除する働きのあることが示唆された。

(3) DDK とポロキナーゼの相互作用はシナプトネマ複合体の主要構成タンパク質の分解を引き起こす

これまでの報告により、シナプトネマ複合体の側方因子が減数分裂期特異的な Rad51 の阻害において重要であることが分かっている。よって、DDK と Cdc5 の相互作用の強さが側方因子の主要成分である Red1 に及ぼす影響を調べたところ、相互作用の度合いと Red1 の安定性には強い相関関係のあることが分かった。つまり DDK と Cdc5 の相互作用が強い時は Red1 の分解が促進された。また、Red1 タンパク質の不安定下に引き続き、シナプトネマ複合体の中心部を形成する Zip1 タンパク質の不安定下も引き起こされることが判明した。よって DDK と Cdc5 の相互作用はシナプトネマ複合体の構成タンパク質の分解を促進し、その結果シナプトネマ複合体の染色体からの解離を誘導することが示唆された。

(4) Dbf4 はポロキナーゼと CDK1 により重複的リン酸化を受ける

減数分裂期における Dbf4 の挙動を調べる過程で Dbf4 のリン酸化と Dbf4 と Cdc5 との相互作用の度合いには強い相関のあることが明らかとなった。一方で、Cdc5 との相互作用が欠損する *dbf4-R83E* 変異でも Dbf4 のリン酸化が完全には消失しないことから Dbf4 は Cdc5 以外のタンパクキナーゼからもリン酸化を受けていることが強く示唆された。私たちはケミカルバイオロジーの手法を用いることで、この DDK 非依存的なリン酸化の大部分が CDK1 に由来することを示した。減数第一分裂前期終了と共に Cdc5 及び CDK1 の活性調節サブユニットであるサイクリン B1 の発現誘導が起こることから、その過程で活性化される DDK 及び CDK1 が Dbf4 を強くリン酸化することによりシナプトネマ複合体の分解が誘導されるのではないかと考えた。

(5) DDK と CDK1 はシナプトネマ複合体の分解に必要である

DDK と CDK1 がシナプトネマ複合体の分解を制御している可能性を検証するため、DDK もしくは CDK1 が欠損した状態でシナプトネマ複合体構成タンパク質の挙動を観察した。DDK と CDK1 は共に生存に必須の遺伝子であるため、遺伝子破壊株を作製できない。DDK の機能を欠損させるため、anchor-away technique を使って核内の DDK を一過的に核外に排除することに成功した。一方 CDK1 においては、キナーゼ活性を有する Cdc28 に点変異を導入し、特定の ATP アナログに対して感受性をもつ *cdc28-as1* 株を作製し、培地に ATP アナログを付加することで条件的に CDK1 の不活性化を誘導出来る系を作製した。これらの系を使い DDK と CDK1 を不活性化したところ、シナプトネマ複合体主要構成タンパク質である Red1 と Zip1 は高度に安定化した。これらのことは DDK と CDK1 が共にシナプト

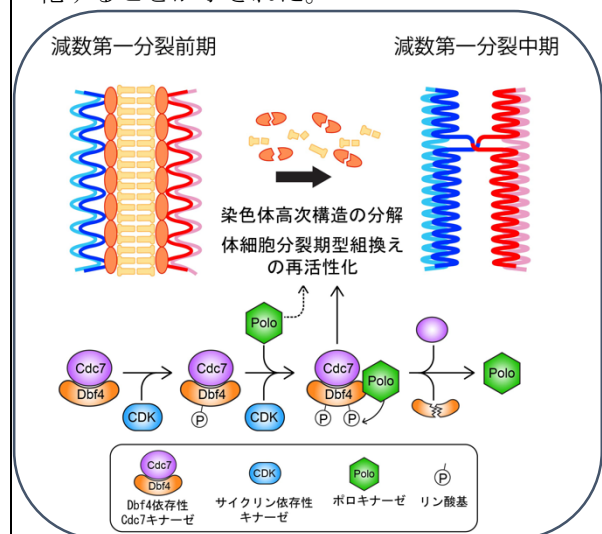
ネマ複合体の分解を促進する因子であることを示している。

(6) Dbf4 のリン酸化はシナプトネマ複合体の分解に必要である

出芽酵母の近縁種間で保存されるそれぞれの Dbf4 間でアミノ酸配列を比較し、高度に保存されているセリン及びスレオニンに対し体系的に変異を導入、そのリン酸化の状態を調べることにより Dbf4 のリン酸化に必要なアミノ酸を4箇所同定した。これら4つのアミノ酸である S318、S319、S374 及び T375 を A に置換すると Dbf4 のリン酸化がほぼ完全に消失し、この変異体では Red1 及び Zip1 が高度に安定化された。よって Dbf4 のリン酸化がシナプトネマ複合体の分解制御に重要な役割を持つことが示された。

(7) まとめと今後の展望

本研究より減数第一分裂前期の終了に伴うシナプトネマ複合体の染色体からの解離は3つの細胞周期キナーゼ (DDK、ポロキナーゼ、CDK1) が重要な働きをすること、その制御の中核は Dbf4 のリン酸化が担っていること、シナプトネマ複合体の解離はその主要構成タンパク質の分解を通じて制御されていることが示された。また、第一分裂前期から中期にかけてシナプトネマ複合体の分解に伴い、第一分裂前期で抑制されていた Rad51 が再活性化することが示された。



DDK、ポロキナーゼ、CDK1 は極めて一般性の高い細胞周期キナーゼであることから、これらが協調して関わる細胞周期依存的且つタンパク質分解を伴った制御機構が他にも多数存在することが予想される。また、このメカニズムにおいてターゲットのリン酸化を伴うタンパク質分解がどのような機構を介して行われているのか今後明らかにする必要がある。

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）

① Polo is not solo in meiosis.

Argunhan B, Tsubouchi T, Tsubouchi H.
Cell Cycle. 2018;17(3):273-274 (査読有り)

② Exiting prophase I: no clear boundary.

Tsubouchi H, Argunhan B, Tsubouchi T.
Curr Genet. 2018 Apr;64(2):423-427 (査読有り)

③ Fundamental cell cycle kinases collaborate to ensure timely destruction of the synaptonemal complex during meiosis.

Argunhan B, Leung WK, Afshar N, Terentyev Y, Subramanian VV, Murayama Y, Hochwagen A, Iwasaki H, Tsubouchi T, Tsubouchi H.
EMBO J. 2017 Sep 1;36(17):2488-2509 (査読有り)

〔学会発表〕（計1件）

坪内英生、Bilge Argunhan、岩崎博史、坪内知美

減数分裂期特異的に形成される高次染色体構造を解消するメカニズム

第24回DNA複製・組換え・修復ワークショップ（2017）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.iwasakilab.bio.titech.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪内 英生 (TSUBOUCHI Hideo)

東京工業大学・科学技術創成研究院・助教
研究者番号：20283822

(4) 研究協力者

ビルゲ アルグンハン (ARGUNHAN Bilge)

研究者番号：30792759

坪内 知美 (TSUBOUCHI Tomomi)

研究者番号：70754505