

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012年度

課題番号：23770003

研究課題名（和文） 減数分裂期組換え開始の空間的制御機構の解明

研究課題名（英文） Spatial regulation mechanism of initiation of meiotic recombination

研究代表者

久郷 和人 (KUGOU KAZUTO)

東京大学・大学院総合文化研究科・特任研究員

研究者番号：60554425

研究成果の概要（和文）：

減数分裂は、有性生殖を行う生物が配偶子を形成するための分裂である。この時、相同染色体間での遺伝的組換えが必要である。組換えが起こらなくなると、生物の多様性の減少や、染色体異常による疾患につながる。減数分裂期の染色体は様々なタンパク質と相互作用することで、ダイナミックに構造を変化させる。本研究では、ゲノムワイドな解析手法とバイオインフォマティクス技術を用いて、染色体の高次構造構築に重要な因子が、どの様に組換え開始制御機構に係わっているのか解析した。

研究成果の概要（英文）：

Meiosis is a special type of cell division for sexual reproduction and produces gametes. Genetic recombination between homologous chromosomes is required for meiosis. A defect in the recombination results in declining biodiversity and disorders caused by chromosomal abnormality. Meiotic chromosomes interact with various proteins. The interaction dynamically alters chromosome structure. In this study, we analyzed an initiation mechanism of meiotic recombination by a chromosomal structural protein using genome-wide analyses and bioinformatics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：減数分裂、相同組換え、染色体高次構造

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 減数分裂

減数分裂期には、DNA複製、相同染色体間での組換え（相同組換え）の開始、シナプトネマ構造の形成、相同染色体の分離・分配、姉妹染色分体の分配が、この順に秩序だてて実行される。特にDNA複製期には、染色体構造の大きな変化を伴うことが知られている。

## (2) 姉妹染色分体接着因子

染色体接着因子（コヒーシン）は4種類のタンパク質からなる複合体である。DNA複製によって形成された姉妹染色分体はコヒーシンによって接着され、正確な姉妹染色分体の分配が保証される。また、DNA修復や遺伝子発現制御などにも関与する。減数分裂期には、体細胞分裂期型 **Scc1** が減数分裂型 **Rec8** に置換され、減数分裂期特有の高次染色体構造の構築に関与する。興味深いことに、減数分裂期であっても、少数ではあるが **Scc1** を含むタイプのコヒーシンが染色体上に残

存する。しかし、その意義はまだよく分かっていない。

### (3) 減数分裂期相同組換えの開始反応

相同組換えは、DNA が二本鎖切断 (DSB) を受けることによって開始される。DSB 形成には、DNA 切断の活性中心をもつ Spo11 タンパク質とその他数個の補助タンパク質が必要である。DSB は染色体上で一様な頻度で形成される訳ではないことから、位置を決定するための空間的な制御機構があると考えられている。

### (4) DSB 形成と減数分裂期型コヒーシ

減数分裂期型コヒーシの構成タンパク質である Rec8 と組換えの関係は以前から報告されていた。しかし、Rec8 による DSB 形成制御機構という点で、ほとんど分かっていなかった。これまでに、Spo11 と Rec8 の関係について解析することで、Rec8 あるいは Rec8 を介した染色体高次構造に依存した Spo11 の DSB 部位への誘導配置機構の存在を初めて明らかにした。興味深いことに、DSB 形成が Rec8 に依存している領域と、依存していない領域があることも明らかになった。しかし、なぜ領域によって依存性が異なるのか、非依存領域では異なる機構により DSB 形成が制御されているのか、そのメカニズムはどのようなものなのかについては明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

DSB 形成は時空間的に厳密な制御を受けている。これまで、DSB 形成の位置決定制御の研究を行ってきた。その中で、染色体接着因子 (コヒーシ) に依存して DSB が形成される領域と、形成されない領域が存在することを示した。本研究では、以下の解析を通じて、コヒーシ非依存・依存型の DSB 分布制御機構の全容の解明を目指す。

### (1) 全染色体における Rec8 非依存領域の特定

従来の結果は、旧型のタイリングアレイを使用していたため、一部の染色体についてしか解析ができていない。そこで、全染色体について解析が可能なタイリングアレイを導入し、全ゲノムレベルで Rec8 非依存領域を明らかにする。

### (2) データマイニングによる特徴分析

Rec8 非依存領域に存在する DSB 部位について、配列的特徴を情報解析により分析する。

### (3) 体細胞分裂期型コヒーシの役割

減数分裂期に残存する体細胞分裂期型コヒーシ Scc1 の役割に注目する。Scc1 の結

合領域を全ゲノムレベルで解析し、Rec8 非依存領域との関連を調べる。また、減数分裂期に Scc1 を Rec8 の代わりに発現させ、DSB 形成の分布にどのような変化が生じるかを検証する。

## 3. 研究の方法

ChIP-chip 法や ChIP-Seq 法による全ゲノムレベルの染色体因子の動態解析、分子生物学的なアプローチと、バイオインフォマティクス手法による解析を組み合わせ、Rec8 非依存的な DSB 形成の空間制御機構を解析する。

### (1) 全染色体における Rec8 非依存領域の特定

野生型株と *REC8* 遺伝子欠損株について、DSB 形成複合体結合部位の比較を行い、*REC8* 遺伝子欠損株で影響が生じる領域を全染色体上にマッピングした。

まず、野生型株または *REC8* 遺伝子欠損株であり、DSB 形成複合体の構成タンパク質遺伝子に FLAG エピトープタグを付加した株を作製した。減数分裂誘導を行い、DSB 形成時の細胞を回収し、FLAG エピトープタグに対する抗体を用いて、クロマチン免疫沈降を行った。回収した DNA を Affymetrix 社のタイリングアレイ (GeneChip *S. cerevisiae* Tiling 1.0R Array) を用いて検出した。目的タンパク質の結合領域を決め、両者の比較を行った。

### (2) データマイニングによる特徴分析

特定した Rec8 非依存領域について、種々のバイオインフォマティクスのツールを用いて解析を行った。

具体的には、領域内に含まれる遺伝子の機能 (GO アノテーション)、トランスポゾンの局在、DNA 複製開始点などの機能配列、GC 含量、染色体上の位置などの視点で共通点の探索を行った。

### (3) 体細胞分裂期型コヒーシの役割

一部の染色体領域では、体細胞分裂期型コヒーシ (Scc1 型) が減数分裂期型コヒーシ (Rec8 型) の代わりをしているのではないかと考え、体細胞分裂期型コヒーシの関与を検討した。

まず、HA エピトープタグを付加した Scc1 を発現する株を作製した。次に、*REC8* ORF に HA エピトープタグ配列を挿入した *SCCI* 配列を挿入した株を作製した。両者を減数分裂期に誘導し、DSB 形成時期の細胞を回収し、HA エピトープタグに対する抗体を用いて、クロマチン免疫沈降を行った。回収した DNA を次世代シーケンサー (Illumina 社) を用いて検出した。それぞれの株について、Scc1 の結合領域を解析した。

#### 4. 研究成果

ゲノムワイドな解析手法とバイオインフォマティクス技術を駆使し、染色体高次構造の構築に重要なコヒーシオンに着目して解析することで、減数分裂期相同組換え開始反応である DSB 形成と染色体高次構造についての新たな知見を得ることができた。

これまで一部の染色体についてしか分かっていなかった減数分裂期型コヒーシオン非依存的な DSB 形成領域を、全ゲノムレベルで明らかにした。さらに、それらの領域について共通点の探索を行った。これまで詳細は不明であった体細胞分裂期型コヒーシオンの減数分裂期における局在を明らかにした。また、研究の過程で、減数分裂期における ChIP-Seq 法（ゲノムワイドにタンパク質の染色体への結合領域を検出する方法）の解析方法を確立した。

##### (1) 全染色体における Rec8 非依存領域の特定

Rec8 非依存的な DSB 形成領域の全貌を明らかにするために、ゲノムタイリングアレイを用いた ChIP-chip 法を行った。当初は DSB 形成複合体の中心的な活性を示す Spo11 を想定していたが、Spo11 よりも早いタイミングで染色体に結合すると考えられる Rec114 について解析を行うこととした。解析の結果、全染色体について、Rec8 非依存的な Rec114 結合領域を明らかにすることができた（図）。これまでの研究から、これらの領域は Rec8 非依存的な DSB 形成領域に対応すると考えることができる。

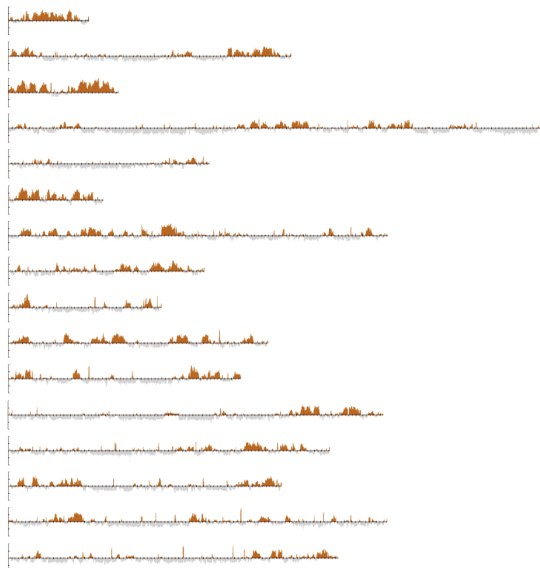


図. Rec8 非依存的な Rec114 結合領域  
染色体番号順に昇順で並べた。オレンジが結合部位。

##### (2) データマイニングによる特徴分析

バイオインフォマティクス技術を駆使して、Rec8 非依存的な DSB 形成領域の特徴を明らかにした。

Rec8 非依存的な DSB 形成領域は、各染色体に数十 kb のドメインをつくっているような分布を示していた。そのため、共通なモチーフ配列を探索することはできなかった。また、染色体の末端付近に分布しているケースが比較的多い傾向がみられた。

一部の領域では、特殊な染色体構造をとることで、遺伝子発現制御や配列機能維持を行っている可能性も考えられる。そこで、その領域に存在する遺伝子について機能や転写という点で共通点がないか、あるいはその領域に特別な機能配列がないかを調べた。Rec8 非依存的な DSB 形成領域に含まれる遺伝子を抽出して、特定の遺伝子機能 (GO アノテーション) を含む遺伝子が有意に多く含まれていないか解析を行ったが、その様な傾向はみられなかった。トランスポゾン、DNA 複製開始点、セントロメアなどの機能配列との位置との比較も行ったが、特に特徴的な傾向をつかむことはできなかった。GC 含量との比較も行ったが、関係はみつからなかった。以上のことから、クロマチン構造やヒストン修飾、核内配置などと関与している可能性が高いと考えられる。

##### (3) 体細胞分裂期型コヒーシオンの役割

減数分裂期に体細胞分裂期型コヒーシオンと減数分裂期型コヒーシオンが存在することから、減数分裂期においてこれらのコヒーシオンが機能分業を行っている可能性も考えられる。そこで、Scc1 について減数分裂期における染色体上の局在を ChIP-Seq 法を用いて解析した。その結果、減数分裂期型コヒーシオンと似た分布をすることが明らかになった。特に、Rec8 非依存的な DSB 形成領域との相関はみられなかった。

次に、Rec8 非存在下でのみ Scc1 が染色体に結合し、Rec8 の機能を部分的に代替する可能性が考えられる。そこで、*REC8* 遺伝子破壊株 (*REC8* の ORF に *SCC1* の ORF 置き換えた株) を用いて Scc1 の ChIP-Seq 法を行った。しかし、Rec8 共存下と同様な分布を示した。さらに、現在、その株を用いて Rec114 の局在が正常に起こるのかを解析中である。

非依存領域はドメインを形成して分布しており、染色体末端に比較的多く分布している傾向が見られた。全ての領域についての共通点は見つかっていないことから、クロマチン構造やヒストン修飾、核内配置などと関与している可能性も考えられる。それらについてさらに解析を行うことで、減数分裂期型コヒーシオンに依存しない新規の組換え開始部位決定の制御機構を明らかに出来る可能性がある。

#### 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 2 件)

(1) Tomoichiro Miyoshi, Masaru Ito, Kazuto Kugou, Shintaro Yamada, Masaki Furuichi, Arisa Oda, Takatomi Yamada, Kouji Hirota, Hisao Masai, and Kunihiro Ohta, A central coupler for recombination linking chromosome architecture to S phase checkpoint, *Molecular Cell*, 査読有、Vol. 47, 2012, pp.722-733  
DOI: 10.1016/j.molcel.2012.06.023

(2) 太田邦史、久郷和人、山田真太郎、小田有沙、次世代シーケンサーによる非コード DNA 配列解析、*実験医学*、査読無、30 巻、2012、2209-2214  
[https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/s\\_edit\\_list2012.html](https://www.yodosha.co.jp/jikkenigaku/s_edit_list2012.html)

[学会発表] (計 6 件)

(1) 伊藤将、染色体高次構造と S 期チェックポイントを減数分裂期組換えの開始と関係させるリエゾニン因子、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日～2012 年 12 月 14 日、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡 (福岡)

(2) 伊藤将、複製チェックポイントと染色体高次構造を仲介する新規因子による遺伝的組換え開始制御、日本遺伝学会 84 回大会、2012 年 9 月 24 日～2012 年 9 月 26 日、九州大学医学部 (福岡)

(3) 久郷和人、Mde2 は複製チェックポイントと染色体高次構造を仲介する新規の組換え開始因子である、第 29 回染色体ワークショップ、2012 年 1 月 25 日～2012 年 1 月 27 日、秋保温泉 (宮城)

(4) 伊藤将、Higher-order chromosome structure and the regulation of meiotic recombination initiation、BMB2011、2011 年 12 月 13 日～2011 年 12 月 16 日、パシフィコ横浜 (神奈川)

(5) 久郷和人、REC8 欠損時の相同組換え開始反応複合体形成の解析、BMB2011、2011 年 12 月 13 日～2011 年 12 月 16 日、パシフィコ横浜 (神奈川)

(6) 久郷和人、減数分裂期相同組換え開始反応複合体形成への Rec8 の関与、日本遺伝学会第 83 回大会、2011 年 9 月 20 日～2011 年 9 月 23 日、京都大学 (京都)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

久郷 和人 (KUGOU KAZUTO)  
東京大学・大学院総合文化研究科・特任研究員  
研究者番号：60554425