

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770004

研究課題名(和文) Zip3タンパク質ネットワーク解明によるシナプトネマ構造構築メカニズムの理解

研究課題名(英文) Understanding of molecular mechanisms of synaptonemal complex organization by revealing Zip3 protein network

研究代表者

林原 加代子 (Hayashihara, Kayoko)

大阪大学・たんぱく質研究所・招へい研究員

研究者番号：00624389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：配偶子の染色体数に異常が生じると、流産や先天性疾患に繋がることがわかっているが、その多くが減数第一分裂における不正確な染色体分配に起因すると考えられている。今回、ヒトと類似の減数分裂機構を有する出芽酵母を用いて、減数第一分裂での正常な染色体分配に必須であるDNA二重鎖切断から交叉型組換えに至る分子メカニズムの解明を目指し、中心的な役割を果たすと推察されるZip3と協調して働く因子の探索を行った。本研究で、DNA二重鎖切断部位に局在する9-1-1がZip3の染色体上局在を促進し、さらにZip3はC末端領域を介して、組換え因子Msh4-Msh5をリクルートすることを見出した。

研究成果の概要(英文)：During meiosis, crossover formation between homologous chromosomes is essential for proper segregation of homologous chromosomes. In this study, mutation analysis of Zip3 and identification of Zip3-interacting proteins were performed to reveal how Zip3 contributes to meiotic crossover formation. I revealed that 9-1-1 clamp which localizes on DNA double-strand break sites promotes the localization of Zip3 on the chromosomes, then C-terminus of Zip3 recruits the recombination factor, Msh4-Msh5 complex, to the chromosomes.

研究分野：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 交叉型組換え シナプトネマ複合体 Zip3

1. 研究開始当初の背景

次世代に遺伝情報を繋ぐための重要な手段である減数分裂では、相同染色体間でゲノム情報の改変(相同組換え)がなされたあと、二度の細胞分裂(減数第一分裂、第二分裂)を経て半数体の配偶子が形成される。この際、減数第一分裂での均等な染色体分配に必須となるのが、相同染色体間の唯一の物理的結合であるキアズマと呼ばれる構造で、これは交叉型組換えを経て構築される。交叉型組換えの形成には、相同染色体間に梯子状に構築されるシナプトネマ複合体が必要だと考えられている。シナプトネマ複合体は酵母からヒトまで広く保存されているが、その構築メカニズムは理解が進んでいない。

出芽酵母の主要なシナプトネマ複合体構成因子として、これまでに ZMM 因子と呼ばれる 8 種類のタンパク質 (Zip1、Zip2、Zip3、Msh4、Msh5、Mer3、Spo16、Spo22) が同定されている。各 ZMM 因子破壊株の表現型解析を行ったところ、機能的なシナプトネマ複合体が構築されず、かつ他のすべての ZMM 因子も正常に局在しないのは、*zip3* 破壊株のみであった。よって、Zip3 が SC 構築において中心的な役割を担っていると考えられる (Shinohara M. et al., *Nat. Genet.*, 2008)。また出芽酵母以外でも、ヒトの Zip3 ホモログである RNF212 の SNP が組換え頻度に影響することが報告されている (Kong A et al., *Science*, 2008)。一方で他の ZMM 因子に関しては、破壊株の表現型解析はなされているものの機能解析はほとんど進んでいない。加えて、各因子間を繋ぐ研究や他の相互作用因子の同定が進んでおらず、このことがシナプトネマ複合体構築メカニズムの解明を妨げていると言える。

2. 研究の目的

これまでに Zip3 が減数分裂進行、特に減数第一分裂におけるシナプトネマ複合体構築および交叉型組換え反応において中心的な役割を担っていることは推察されているが、それ以上の機能解析は進んでいない。本研究では、Zip3 の相互作用因子を明らかにすることで、これまで未知であったシナプトネマ複合体構築や交叉型組換えの分子メカニズムの解明に近づくことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Zip3 の機能領域の特定

Zip3 の機能領域を特定するために、Zip3 の C 末端 FLAG タグ融合型変異体株 (N 末端領域にある Ring-finger モチーフに点変異を導入した Zip3^{H80F}-FLAG、C 末端側を欠失した Zip3¹⁻¹⁹⁶-FLAG と Zip3¹⁻³¹⁴-FLAG) を作製し、表現型解析を行った。

(2) Zip3 の相互作用因子の同定

相互作用因子を探索する手法として通常は細胞抽出液からの免疫沈降がよく用いられるが、Zip3 は酵母ライセート中では可溶性しないため、免疫沈降には適さない。そこで、タグ融合型 Zip3 組換えタンパク質を調製し、酵母ライセートと混合した後、タグを用いて Zip3 を含む複合体をプルダウンすることにした。

4. 研究成果

(1) Zip3 の機能領域の特定

Zip3 変異体株において、変異体 Zip3 タンパク質の局在解析を行ったところ、Zip3^{H80F}-FLAG は染色体上への非局在化を示した。一方で、C 末端側を欠失した Zip3¹⁻¹⁹⁶-FLAG および Zip3¹⁻³¹⁴-FLAG は、野生型同様に染色体上への局在を保持していた。このことから、Zip3 の染色体上局在には N 末端領域が必須であることがわかった。

続いて、各変異体株でシナプトネマ複合体の構築を観察したところ、Zip3¹⁻¹⁹⁶-FLAG と Zip3¹⁻³¹⁴-FLAG はいずれも野生型 (Zip3-FLAG) に比べてシナプトネマ複合体の伸張が不十分であった。加えて、Zip3¹⁻¹⁹⁶-FLAG と Zip3¹⁻³¹⁴-FLAG では欠損の度合いに大きな差は見られなかったことから、全長 482 アミノ酸のうち 315 番目以降の C 末端領域が機能部位であることが明らかとなった。

また、各変異体株でサザンプロット法を用いて交叉型組換えの産物量を調べたところ、Zip3^{H80F}-FLAG は *zip3* 破壊株同様に野生型のおよそ半量、Zip3¹⁻³¹⁴-FLAG は *zip3* 破壊株ほどではないものの、野生型に比べて有意な減少を示した。実際に、Zip3¹⁻³¹⁴-FLAG 株において、交叉型組換えに必須のタンパク質である Msh4-Msh5 複合体のうち Msh5 の局在を観察したところ、染色体上への局在が消失していた。さらに、Zip3¹⁻³¹⁴-FLAG 株と Zip3¹⁻³¹⁴-FLAG と *msh5* の二重変異株で孢子生存率を比較したところ、それぞれ 36%、31% と大きな差が見られなかったことから、配偶子形成における Msh5 の機能は Zip3 の C 末端領域にほぼ依存していることがわかった。一方で、*msh5* 破壊株の孢子生存率は Zip3¹⁻³¹⁴-FLAG 株より有意に高い 50% であったことから、Zip3 の C 末端領域は、Msh4-Msh5 複合体のリクルート以外の点でも、配偶子形成に寄与していることが示唆された。

以上の結果から、Zip3 は N 末端領域を介して減数分裂期染色体に局在し、さらに C 末端領域を介して Msh4-Msh5 複合体を染色体上にリクルートすることで、交叉型組換えの形成に寄与していると考えられる。

(2) Zip3 の相互作用因子の同定

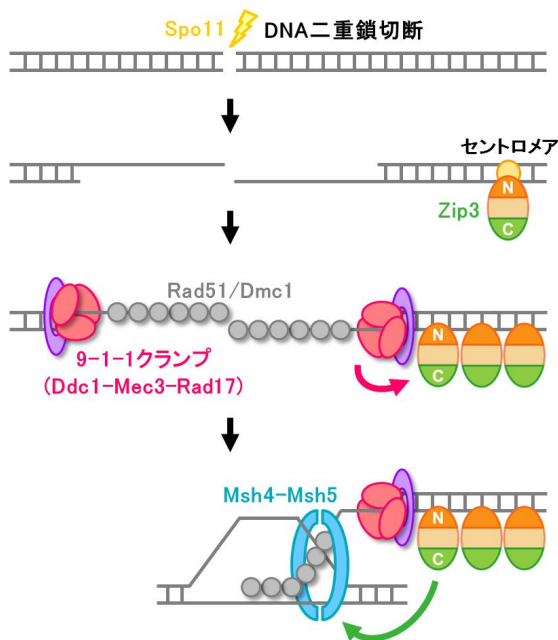
タグ融合型 Zip3 組換えタンパク質を調製するにあたり、複数のタグを検討した結果、FATT タグ (Sangawa T. et al., *Protein Sci.*, 2013) を用いた場合にのみ、全長 Zip3 を可溶性画分に発現させることに成功した。

FATT-Zip3 を酵母ライセートと混合し、相互作用因子をプルダウンしたところ、上述の組換え因子である Msh5 が検出された。これは (1) で得られた、Zip3 が Msh4-Msh5 をリクルートするという知見をサポートする結果である。

さらに、Zip3 と相互作用する因子として、DNA 損傷チェックポイントクランプである 9-1-1 複合体 (Ddc1-Rad17-Mec3) が同定された。実際に、9-1-1 の欠損株では、Zip3 の染色体腕への局在が抑制されることが確認されている。よって、9-1-1 は Zip3 と物理的に相互作用することで、Zip3 の染色体腕への局在を促進することが示唆された。

また、Zip3 の C 末端領域の GST タグ融合組換えタンパク質を発現・精製し、酵母ライセートを用いたプルダウンにより Zip3 の C 末端領域特異的に相互作用する因子を同定する系も構築した。これにより今後、Msh4-Msh5 複合体以外にも Zip3 と協調して配偶子形成に寄与する因子の同定が出来るものと期待される。

以上のように本研究では、減数分裂期において、DNA 二重鎖切断部位にリクルートされる 9-1-1 複合体と、DNA 二重鎖切断部位で交叉型組換えを制御する Msh4-Msh5 複合体の間を Zip3 が仲介していることを明らかにした。さらに、Zip3 の C 末端領域に配偶子形成に寄与する機能領域があることを見出した。



【モデル図】DNA 二重鎖切断部位において 9-1-1 クランプと Msh4-Msh5 を仲介することで、交叉型組換えを促進する Zip3 タンパク質。

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0件)

〔学会発表〕(計5件)

林原加代子、篠原彰、篠原美紀、出芽酵母減数分裂進行における Zip3 の機能解析、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日~2013年12月5日、神戸ポートアイランド

林原加代子、篠原美紀、出芽酵母減数分裂進行における Zip3 の機能解析、第22回DNA複製・組換え・修復ワークショップ、2013年11月20日~2013年11月22日、ホテルニュー水戸屋(仙台)

林原加代子、辻岳志、篠原彰、篠原美紀、出芽酵母 9-1-1 複合体は ZMM/SIC タンパク質のリクルートを介して組換えを制御する、第35回日本分子生物学会年会(招待講演)、2012年12月11日~2012年12月14日、福岡国際会議場・マリメッセ福岡

林原加代子、辻岳志、篠原彰、篠原美紀、9-1-1 clamp promotes the recruitment of ZMM/SIC and regulate the formation of crossovers in budding yeast、The 8th 3R Symposium、2012年11月25日~2012年11月28日、淡路夢舞台

林原加代子、辻岳志、篠原彰、篠原美紀、出芽酵母 9-1-1 複合体は ZMM/SIC のリクルートを介して組換えを制御する、酵母遺伝学フォーラム第44回研究報告会/第20回酵母合同シンポジウム、2012年9月4日~2012年9月6日、京都大学宇治キャンパスおうばくプラザきはだホール

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林原 加代子 (HAYASHIHARA, Kayoko)
大阪大学・たんぱく質研究所・招へい研究
員

研究者番号：00624389

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：