

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22402

研究課題名（和文）人工ミニ染色体を用いた遺伝情報継承のための必要最小ユニットの同定

研究課題名（英文）Identification of the minimalized essential unit for genetic inheritance of artificial mini-chromosomes

研究代表者

篠原 美紀（Shinohara, Miki）

近畿大学・農学部・教授

研究者番号：80335687

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：出芽酵母は、複製起点、セントロメア、テロメアの染色体機能の最小領域をもちいて完全に人工合成の染色体（人工ミニ染色体）を構築できる。人工ミニ染色体は減数第一分裂期で高頻度の不分離を示す一方で第二分裂期では正常に分配することを示した。また、不分離の原因は減数分裂期交叉型組換え欠損によると考えられたため人工ミニ染色体上にGAL1プロモーターのUASを挿入しGal4BD-Spo11発現株において解析を行ったが改善はみられなかった。一方で、染色体軸因子のMek1キナーゼの自己リン酸化による活性化は減数分裂期組換えの鋳型選択に重要な機能を果たしその変異株では異所性の組換えが高頻度で起きることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1真核生物の中でセントロメア、テロメア、複製開始点など染色体の必須要素が明らかになっている出芽酵母で、人工染色体にさまざまな人工DNA配列を付加することによって引き起こされる減数分裂期組換えの挙動の変化について解析を行うことで、細胞内における染色体サイズの認識とそれに応じた交叉型組換え制御機構について明らかにし、次世代に継承可能にするための最小のゲノム要素を明らかにすることができる。

研究成果の概要（英文）：In eukaryotes, *Saccharomyces cerevisiae* allows the construction of fully artificially synthesized chromosomes using the minimum regions of the basic units of chromosomal function such as replication origin, centromeres, and telomeres. Here we show that the artificial mini-chromosomes show frequent non-disjunction of homologs during the first division of meiosis while normal segregation during the second division. In addition, since the cause of non-disjunction was considered to be meiotic crossover recombination deficiency, UAS sequence of the GAL1 promoter was inserted on the artificial mini-chromosome and analyzed chromosome segregation in Gal4-BD-Spo11 expressing strains, but no improvement was observed. On the other hand, autophosphorylation-mediated activation of the chromosomal axis factor Mek1 kinase plays an important role in template selection for meiotic recombination, revealing that ectopic recombination occurs frequently in the phosphorylation-deficient *mek1* mutant.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：減数分裂期 相同組換え 人工染色体 染色体分配

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで減数分裂期染色体上での交叉型組換えの数と配置の制御に関して、染色体高次構造体の構成因子と減数分裂期特異的な因子が複雑に共役することで「ゲノム量を正確に半分にする」ことを成し遂げていることを明らかにしてきた。染色体という分配すべき構造体としての存在と、遺伝情報発現ソフトウェアとしての機能を両方持つという制約から、変異細胞の中で染色体が失われても、それがどのようにして失われたのかを明らかにすることは困難であった。そこで、ゲノム外の人工染色体を用いることで、ソフト面での制約をなくし構造体としての染色体の特性に限定して解析を行うことを考えた。出芽酵母のミニ染色体は、ベクターとして利用されてきた歴史がある。真核生物の中で出芽酵母は、細胞増殖時の複製起点、セントロメア、テロメアの染色体機能の基本ユニットの最小領域をもちいて完全に人工合成の染色体を構築できる、おそらく唯一の生物である。それでも、それらは減数分裂期での不分離率が高く、完全な染色体としては機能しない。そこで、何が足りないのか？という視点から、減数分裂期での分配を保証するためにはどのような DNA 配列、あるいは染色体機能（クロマチン、転写等）を必要とするのか「足し算」の視点から解析したいと考えた。このような目的で、合成生物学的アプローチは未だ行われたことが無く、萌芽的な段階の研究であると考えた

2. 研究の目的

減数分裂期組換えは遺伝多様性の創出と、減数第一分裂での染色体の正確な分配を保証する。また、細胞レベルでの老化のリセット、進化や種の隔離、交配による育種においても重要な過程である。減数分裂期組換えは自らのゲノムを切断するプログラム DSB によって開始し、その後、染色体のサイズによって異なる減数分裂期組換えの数と配置の制御機構を行う。出芽酵母は染色体機能に必要な要素をすべて含んだ人工染色体にさらにさまざまな人工 DNA 配列を付加することで得られる、人工染色体上の減数分裂期組換えの挙動の変化について①次世代に継承しうる人工ミニ染色体の構築、②相同染色体として振る舞うのに必要な相同性についての解析を行う。この解析により、次世代に継承可能な染色体サイズの認識とそれに応じた普遍的な交叉型組換え制御機構、さらに次世代に継承可能にするための、減数分裂期に特化した最小のゲノム要素を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 次世代に継承しうる人工ミニ染色体の構築

酵母ゲノム由来の DNA 複製開始起点と、セントロメア配列、出芽酵母に由来しない選択マーカーを含む環状プラスミド、ARS-CEN プラスミドに TG リピート（テロメア配列）を付加した線状 DNA 分子（人工ミニ染色体）を合成し、このミニ染色体を安定に保持する 2 倍体細胞を作成する。このミニ染色体の *K. lactis* 由来の *URA3* 遺伝子に hetero-allelic 変異を導入することで減数分裂期交叉型組換えに由来する組換え体を容易に検出できる。また、減数分裂期組換えに必須の *DMC1* 遺伝子をミニ染色体にクローニングし、ゲノム状の *DMC1* 遺伝子を破壊しておくことで、単純に孢子形成の可否を指標に、このミニ染色体にランダムな人工 DNA 配列を挿入し、その遺伝情報を、減数分裂期組換えを経て安定に配偶子に継承しうるかどうかスクリーニングを行う。また、保持しやすい配列とそうでない配列の傾向について NGS 解析から共通点について遺伝子情報学的解析を行う。

(2) 相同染色体として振る舞うにはどれほどの相同性が必要か？

種の隔離は 2 種間で配偶子形成が起こらないことを一つのきっかけとしておこると考えられる。ミニ染色体において、相同領域と非同相領域が混在したときにどれくらいの相同領域があれば相同染色体として減数分裂期交叉型組換えを行い、配偶子に正確に分配することができるのか。挿入配列の大きさと配列が異なるミニ染色体を持った 2 媒体細胞の交叉型組換えの配置などから明らかにする。

4. 研究成果

(1) 次世代に継承しうる人工ミニ染色体の構築

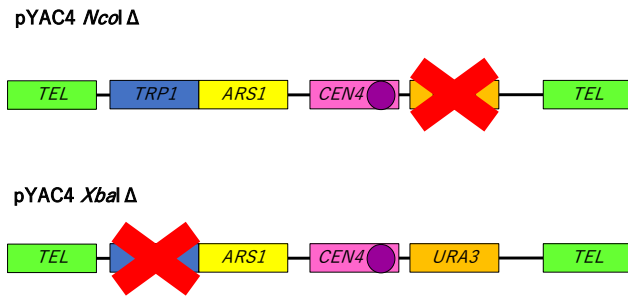
本研究においてまず、pYAC4 ベクターを元に図 1 のような人工ミニ染色体を構築し、出芽酵母の異なる接合型 a 株と α 株に導入した。接合後に非選択条件下での人工ミニ染色体の減数分裂

期導入後の胞子での保持率は胞子生存率 98%に対して 67%と低く多くが不分離を起こしていることが分かった。一方で人工ミニ染色体の不分離については4つの胞子のうち4つの胞子すべてに人工ミニ染色体が分配されたものが40%、3つが8%、2つが35%、1つが8%、0が9%という内訳でランダムに胞子致死による数学的分布シミュレーションによる期待値と比較して偶数の胞子に分配されたものが75%でありこれは減数第一分裂期で不分離が起きていることを示唆している (Shinohara et al., 2008)。また, 図1に示す, hetero-allelic 変異を持つ二種の人工ミニ染色体を相同染色体と見立てて、解析を行った。これらの人工ミニ「相同」染色体の分離がメンデル則に従ったもので4つの胞子に正しく分配されたのは68%、第一分裂期での不分離が23%、第二分裂期での不分離が9%であった。

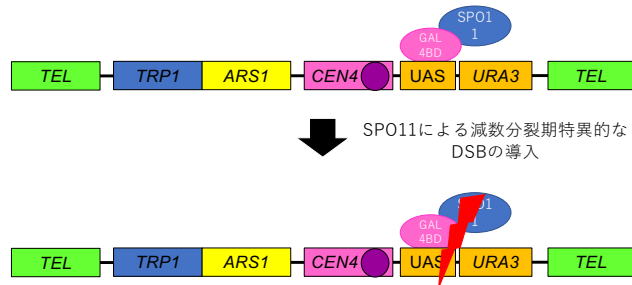
この結果もまた、人工ミニ染色体の分配の欠損は減数第一分裂期での相同染色体の不分離にある事を表している。減数第一分裂期の染色体不分離はキアズマ形成の欠損、セントロメアの単極化、染色体腕部のコヒーションのいずれかの欠損に由来することが予想される。また、染色体の形状として線状でも環状でも同様の欠損が観察されたことから減数分裂期交叉型組換えが人工ミニ染色体上で起きていないことが不分離の原因と考えられた。そこで、減数第一分裂期での相同染色体の分配に必須のキアズマ形成を人工ミニ染色体上で誘導するために、人工ミニ染色体上の片方に GAL1 プロモーターの UAS を導入し Gal4-BD-Spo11 による DSB 導入を人工的に誘導した (Sasanuma et al., 2007)。しかし、Gal4-BD-Spo11 による効果は観察されず、人工ミニ染色体上への DSB 導入だけでは不十分である事が明らかとなった。人工ミニ染色体上への Gal4-Spo11 による DSB 導入の効率と、キアズマへと変換される交叉型組換えの有無や修復経路の解析など、さらに今後に向けて検証が必要である。

一方で、人工ミニ染色体上への酵母ゲノムからのランダム配列挿入による減数分裂期分配に必要な領域のスクリーニングについては大きなフラグメントが入ると安定化する傾向があるが現時点では共通配列などは見つかっていない。引き続き、挿入配列を削除して必要領域の同定を進めていく。

図1 親株を区別可能なミニ染色体の構築

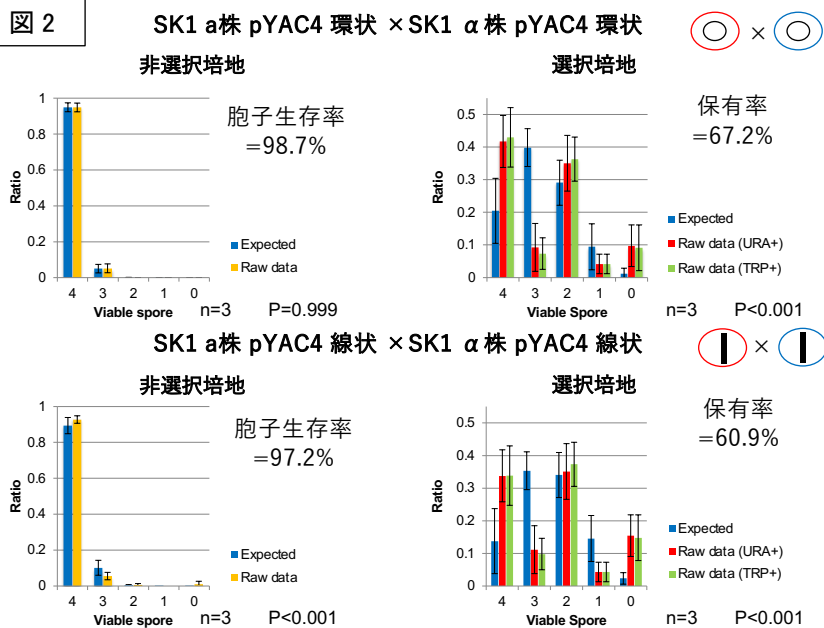


新規ミニ染色体の作成と課題



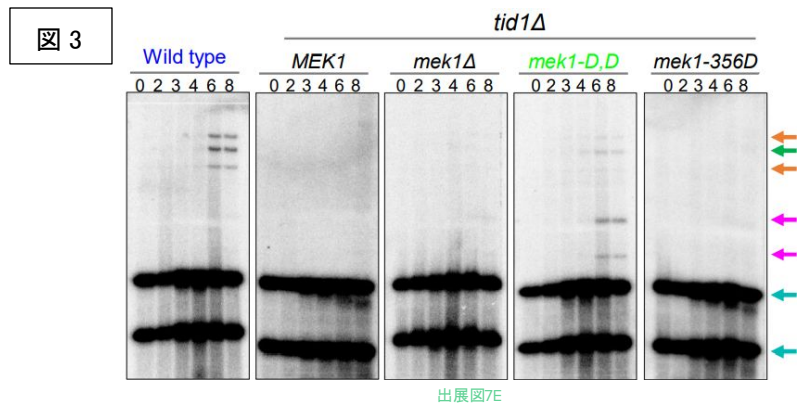
人工ミニ相同染色体は第一分裂における不分離を示す

図2



相同染色体として振る舞うにはどれほどの相同性が必要か？

今回作成した hetero-allelic 変異を持つ二種的人工ミニ染色体はお互いに4塩基の違いしか存在しないが全体の25%の胞子に対してしか正常に分配されていない。この数値は人工ミニ「相同」染色体が減数第一分裂期においてランダムに分配されていることを示している。そこで、先ず、通常



⇒D,Dでは正常な組換え修復は起こらず、異所性の組換えが発生する

の細胞がどのようにして相同染色体と姉妹染色分体を組換えの鋳型として認識し選択しているのかについて解析を行った。キアズマへと変換される減数分裂期交叉型組換えの鋳型選択に関しては姉妹染色分体ではなく、相同染色体のアリル間で行われることが知られており、減数分裂特異的な染色体軸因子である Hop1-Red1-Mek1 が必要である事が分かっている。また Hop1-Red1-Mek1 は Spo11 による減数分裂期組換え開始のための DNA 二本鎖切断導入にも必要であり (Cesari et al., 2020) この因子が染色体上に局在して染色体軸を形成する事が減数第一分裂期における染色体分配には必要である。特に Mek1 はチェックポイントキナーゼとしての機能を持ち、鋳型選択の情報伝達において重要な機能を果たす (Subramanian et al., 2016)。私たちは Mek1 活性化に必要な自己リン酸化部位を同定しそのリン酸化変異株を作成した。この mek1 変異株では、Spo11 による減数分裂期 DSB 形成には欠損はみられないが組換えが姉妹染色分体でも相同染色体上のアリル間でも起きずに異所性の組換えが亢進することを見いだした (図3, 論文準備中)。また、軸形成開始に関して Hop1 の染色体上へのローディングに Mek1 のリン酸化シグナル経路で脱リン酸化反応を担う Pph3 が必要である事を示した (Li and Shinohara, in revision)。今後は人工ミニ染色体上での軸形成過程と減数分裂期 DSB 形成および組換えの鋳型選択制について解析を行胃明らかにしたいと考えている。

Cesari, E., Loiarro, M., Naro, C., Pieraccioli, M., Farini, D., Pellegrini, L., Pagliarini, V., Bielli, P., and Sette, C. (2020). Combinatorial control of Spo11 alternative splicing by modulation of RNA polymerase II dynamics and splicing factor recruitment during meiosis. *Cell Death Dis* 11, 240. 10.1038/s41419-020-2443-y.

Li, K., and Shinohara, M. (in revision). Meiotic DSB-independent role of protein phosphatase 4 in Hop1 assembly to promote meiotic chromosome axis formation in budding yeast. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.05.10.443451>.

Sasanuma, H., Murakami, H., Fukuda, T., Shibata, T., Nicolas, A., and Ohta, K. (2007). Meiotic association between Spo11 regulated by Rec102, Rec104 and Rec114. *Nucleic Acids Res* 35, 1119-1133. 10.1093/nar/gkl1162.

Shinohara, M., Oh, S.D., Hunter, N., and Shinohara, A. (2008). Crossover assurance and crossover interference are distinctly regulated by the ZMM proteins during yeast meiosis. *Nat Genet* 40, 299-309. ng.83 [pii] 10.1038/ng.83.

Subramanian, V.V., MacQueen, A.J., Vader, G., Shinohara, M., Sanchez, A., Borde, V., Shinohara, A., and Hochwagen, A. (2016). Chromosome Synapsis Alleviates Mek1-Dependent Suppression of Meiotic DNA Repair. *PLoS Biol* 14, e1002369. 10.1371/journal.pbio.1002369.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 8件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Lee Min-Su, Higashide Mika T, Choi Hyungseok, Li Ke, Hong Soogil, Lee Kangseok, Shinohara Akira, Shinohara Miki, Kim Keun?P	4. 巻 49
2. 論文標題 The synaptonemal complex central region modulates crossover pathways and feedback control of meiotic double-strand break formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 7537 ~ 7553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkab566	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Prasada Rao Hanumanthu BD, Sato Takeshi, Challa Kiran, Fujita Yurika, Shinohara Miki, Shinohara Akira	4. 巻 10
2. 論文標題 Phosphorylation of luminal region of the SUN-domain protein Mps3 promotes nuclear envelope localization during meiosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.63119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Nandan Krishnaprasad G, Salim Sagar, Pankajam Ajith V, Shinohara Miki, Lin Gen, Chakraborty Parijat, Farnaz Amamah, Steinmetz Lars M, Shinohara Akira, Nishant Koodali T	4. 巻 219
2. 論文標題 Regulation of Msh4-Msh5 association with meiotic chromosomes in budding yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/genetics/iyab102	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Zhihui Zhu, Mohammad Bani Ismail, Miki Shinohara, Akira Shinohara	4. 巻 4(2)
2. 論文標題 SCFCdc4 ubiquitin ligase regulates synaptonemal complex formation during meiosis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life science alliance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.202000933	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Ying Zhang, Takuya Suzuki, Ke Li, Santosh K Gothwal, Miki Shinohara, Akira Shinohara	4. 巻 21(8)
2. 論文標題 Genetic Interactions of Histone Modification Machinery Set1 and PAF1C with the Recombination Complex Rec114-Mer2-Mei4 in the Formation of Meiotic DNA Double-Strand Breaks.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International journal of molecular sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21082679	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hirotune Shinji, Kiyonari Hiroshi, Jin Mingyue, Kumamoto Kanako, Yoshida Kayo, Shinohara Miki, Watanabe Hitomi, Wynshaw-Boris Anthony, Matsuzaki Fumio	4. 巻 10
2. 論文標題 Enhanced homologous recombination by the modulation of targeting vector ends	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-58893-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Shinohara Miki, Bishop Douglas K., Shinohara Akira	4. 巻 213
2. 論文標題 Distinct Functions in Regulation of Meiotic Crossovers for DNA Damage Response Clamp Loader Rad24(Rad17) and Mec1(ATR) Kinase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genetics	6. 最初と最後の頁 1255 ~ 1269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1534/genetics.119.302427	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Challa Kiran, Fajish V Ghanim, Shinohara Miki, Klein Franz, Gasser Susan M., Shinohara Akira	4. 巻 15
2. 論文標題 Meiosis-specific prophase-like pathway controls cleavage-independent release of cohesin by Wapl phosphorylation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1007851
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1007851	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 篠原美紀
2. 発表標題 減数分裂期で染色体数を正確に半分にするための染色体構造の役割
3. 学会等名 酵母合同シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笠井公輔, 篠原美紀
2. 発表標題 出芽酵母における DNA二重鎖切断修復経路での Pso2ヌクレアーゼの機能の解析
3. 学会等名 日本遺伝学会 第93回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 玉井智貴, 森田一世, 篠原美紀
2. 発表標題 Analysis of the regulatory mechanism through Rad50 for bi-directional DSB resection.
3. 学会等名 日本遺伝学会 第93回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 熊取谷健志, 篠原美紀, 松寄健一郎
2. 発表標題 アセトアルデヒド誘導DNA-タンパク質架橋の修復における非相同末端結合の役割
3. 学会等名 日本遺伝学会 第93回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松崎健一郎, 森田一世, 篠原美紀
2. 発表標題 Sae2のDNA Ligase VIを介したNHEJ抑制機構の分子メカニズム.
3. 学会等名 日本遺伝学会 第93回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ke Li, Miki Shinohara
2. 発表標題 Budding Yeast Protein Phosphatase 4 Promoted Meiotic Axes Formation through Hop1 Assembly
3. 学会等名 第26回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笠井公輔, 篠原美紀
2. 発表標題 出芽酵母における DSB修復経路での Pso2ヌクレアーゼの機能解析
3. 学会等名 第26回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 玉井智貴, 森田一世, 篠原美紀
2. 発表標題 両方向的DSB末端単鎖化のRad50による制御機構の解析
3. 学会等名 第26回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 玉井智貴, 森田一世, 篠原美紀
2. 発表標題 両方向的DSB末端単鎖化のRad50による制御機構の解析
3. 学会等名 第26回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ke, Li, 篠原美紀
2. 発表標題 PP4は減数分裂期染色体軸構造形成に必要である
3. 学会等名 第39回 染色体ワークショップ・第19回 核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 篠原美紀
2. 発表標題 減数分裂期特異的な染色体軸-ループ構造による減数分裂期組換え制御.
3. 学会等名 蛋白研セミナー：生殖細胞・減数分裂研究の過去・現在・未来 / 生殖細胞・減数分裂研究の最前線（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 篠原美紀
2. 発表標題 DNA二本鎖切断修復を誤りがちにする要因は何か？
3. 学会等名 第90回日本遺伝学会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木拓弥, 篠原美紀
2. 発表標題 減数分裂期特異的チェックポイントキナーゼMek1 Chk2/Rad53の多段階的機能
3. 学会等名 第90回日本遺伝学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Miki Shinohara
2. 発表標題 Synaptonemal complex central regions modulates crossover pathways and feedback control of meiotic DSB formation
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会シンポジウム「Dynamic and structural regulation of chromosome inheritance in meiosis」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木拓弥, 浜野有希, 篠原美紀
2. 発表標題 減数分裂期特異的Mek1Chk2キナーゼ 機能分離変異株の解析
3. 学会等名 第38回染色体ワークショップ・第19回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 篠原美紀
2. 発表標題 DNA損傷チェックポイント因子の減数分裂期組換え制御における機能
3. 学会等名 第42回分子生物学会年会ワークショップ(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miki Shinohara
2. 発表標題 Functional analysis of DNA damage checkpoint factors in meiotic chromosome construction
3. 学会等名 Chromosome Dynamics: An international symposium on chromatin and chromosome stability (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 篠原美紀, Douglas K. Bishop, 篠原彰
2. 発表標題 減数分裂期組換え制御におけるMec1ATRと9-1-1損傷クランプの機能分担
3. 学会等名 第91回日本遺伝学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miki Shinohara
2. 発表標題 Functional analysis of DNA damage checkpoint factors in meiotic chromosome construction
3. 学会等名 Chromosome Dynamics: An international symposium on chromatin and chromosome stability (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------