

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21870007

研究課題名（和文）減数分裂期特異的な姉妹染色体接着因子による相同組換え開始制御の分子機構

研究課題名（英文）Molecular mechanism of the initiation of homologous recombination by meiotic cohesin

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、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を分子レベルで明らかにした。

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 showed how a chromosomal structural protein regulates initiation of meiotic recombination at a molecular level.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,090,000	327,000	1,417,000
2010年度	960,000	288,000	1,248,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,050,000	615,000	2,665,000

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：ゲノム動態、遺伝、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

（1）減数分裂：減数分裂は、有性生殖を行う生物が子孫を残すために配偶子を形成する分裂である。減数分裂期にはDNA複製、相同染色体間での組換え、相同染色体の分配、ついで姉妹染色体の分配が順次起こる。この

時、複雑かつ高度に制御された染色体構造の変化、局在の変化が生じる。これら高次の諸現象が分子レベルで連携をとりながら進行する。

（2）減数分裂期相同組換え：減数分裂期の

相同組換えは、遺伝的多様性の獲得と正確な染色体分配の保証という点で重要な役割を持っている。相同染色体の正確な分配には、相同染色体を一時的につなぎ止める必要がある。そのためには、①交叉を伴う相同組換えと、②コヒーシと呼ばれるタンパク質複合体による姉妹染色分体のつなぎ止めが必要である。コヒーシは4つのサブユニットからなり、体細胞分裂期も存在し、姉妹染色分体の分配などに係わっている。減数分裂期型は体細胞分裂期のサブユニットの一つが Rec8 タンパク質に置き換わっているという特徴がある。

(3) 減数分裂期相同組換えの開始反応 (DSB 形成) : 減数分裂期の相同組換えは、DNA の二本鎖切断 (DSB 形成) により開始される。DSB 形成には、DNA 切断の活性中心を持つと考えられている Spo11 に加え、出芽酵母では少なくとも9個のタンパク質 (Spo11 補助因子群) が必要である。これらの因子が順次 DSB 形成部位に結合し、安定な複合体を形成した後、活性化され、DNA の切断が起こると考えられている。近年、DSB 形成が高次の染色体構造、局所的な染色体構造、ヒストン修飾、細胞周期などにより空間的、時間的に厳密に制御されている事が明らかにされつつある。

(4) DSB 形成とコヒーシ : 減数分裂期相同組換えとコヒーシ (特に Rec8) 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、ほとんど明らかになっていなかった。これまでに、Spo11 と Rec8 の関係を解析することで、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。しかし、Spo11 補助因子群や DSB 複合体形成に Rec8 がどの様に関与するのかといった分子レベルでのメカニズムを明らかにする事は出来ていなかった。

2. 研究の目的

DSB タンパク質と Rec8 の関係を分子レベルで解析することで、Rec8 が DSB 形成のどの段階 (結合、複合体形成、活性化) に係わっているのかを明らかにし、染色体高次構造による DSB 形成制御機構の解明を目指す。

(1) Spo11 と Rec8 の相互作用

これまでに Rec8 が Spo11 の染色体への結合に係わっていることを示してきた。さらに、減数分裂初期において Spo11 が有意に Rec8 結合部位に結合していることも示した。しかし、この結合が直接的なのか、間接的なのかは明らかになっていない。そこで、Spo11 が Rec8 と物理的な相互作用をしているのかど

うかを明らかにする。

(2) Spo11 補助因子群と Rec8 の関わり
REC8 遺伝子を欠損させると、調べた染色体領域については、ほとんどの領域で Spo11 の結合が起こらなくなる。また、Spo11 の DSB 形成部位への結合に先立ち、Mei4、Mer2、Rec114 が DSB 形成部位に結合する。そこで、それらの結合が Rec8 によって制御されているのかを明らかにする。

(3) DSB 形成複合体形成への Rec8 の関わり
 Rec8 が DSB 形成タンパク質の染色体への結合にのみ関与しているのかどうかを明らかにする。

3. 研究の方法

タンパク質間の相互作用を検出する手法 (免疫沈降法など)、DNA とタンパク質間の相互作用を検出する手法 (クロマチン免疫沈降法など)、ゲノムワイドな解析手法 (タイリングアレイとクロマチン免疫沈降法による解析、ChIP-chip 法)、Spo11 テザーリング技術 (図1) を用いて、Rec8 の DSB 形成における役割を分子レベルで解析する。

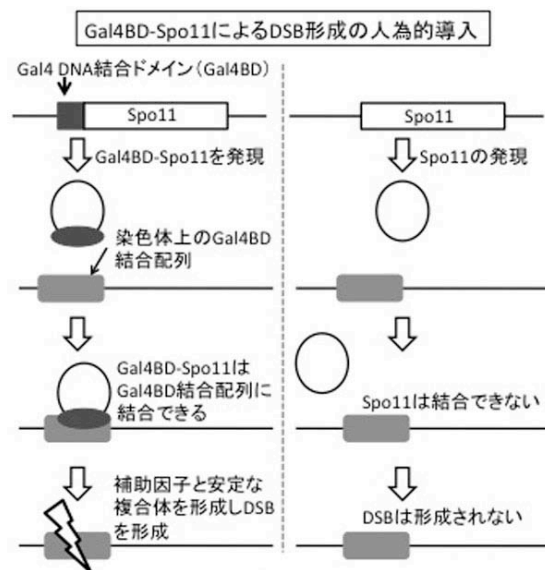


図1. Spo11テザーリング技術

(1) Spo11 と Rec8 の相互作用

Rec8 による Spo11 の染色体上の局在制御が直接的な作用による物なのかを明らかにするために、Spo11 と Rec8 の物理的な相互作用の検出を行った。

①免疫沈降法による検出 : Spo11 に FLAG エピトープタグを Rec8 に HA エピトープタグや myc エピトープタグを融合させ、体細胞分裂期の細胞や減数分裂期の細胞で構成的に発現させた。FLAG エピトープタグに対する抗体を用いて免疫沈降を行った。その後、HA や

myc エピトープタグに対する抗体を用いて、ウエスタンブロッティングを行い、Spo11 と共に Rec8 を濃縮することが出来たかを検出することで、Spo11 と Rec8 の物理的な相互作用を調べた。

②Spo11 テザーリングとクロマチン免疫沈降法による検出：野生型株と Gal4BD-Spo11 発現株に対して、Rec8 に FLAG エピトープタグを融合させた。クロマチン免疫沈降法や ChIP-chip 法を用いて両株における Rec8 結合部位を比較することで、Rec8 が Gal4BD 結合部位に呼び込まれるかを検出することで、Spo11 と Rec8 の相互作用を調べた。

(2) Spo11 補助因子群と Rec8 の関わり
REC8 遺伝子欠損株で Spo11 の結合に先立つ Mei4、Mer2、Rec114 の染色体への結合が正常に起こるかを調べる。REC8 遺伝子欠損株と野生型株について、Mei4、Mer2 または Rec114 に FLAG エピトープタグを融合させた。ChIP-chip 法により Rec114 の染色体上の局在を調べ、野生型株と欠損株で比較した。

(3) DSB 形成複合体形成への Rec8 の関わり
Rec8 が DSB 形成タンパク質の染色体への結合にのみ関与するのであれば、強制的に DSB 形成タンパク質を結合させれば DSB が形成されるはずである。Spo11 に転写因子 Gal4 の DNA 結合ドメイン (Gal4BD) を融合させることで (Spo11 テザーリング)、人為的に DSB を形成させることが可能となる。この系を使用して、Rec8 が DSB 形成のどの段階に係わっているかを明らかにする。

①人為的 DSB 形成系における Rec8 の役割：
REC8 遺伝子欠損株で Spo11 テザーリングにより人為的に DSB 形成を誘導できるかを、サブブロッティングを行い、検証を行った。

②DSB 複合体形成への Rec8 の関与：
Gal4BD-Spo11 発現株に対して、全ての Spo11 補助因子 (Mei4、Mer2、Rec114、Rec102、Rec104、Ski8、Mre11、Rad50、Xrs2) に FLAG エピトープタグを融合した。それらの REC8 遺伝子欠損株も作製した。Gal4BD-Spo11 の結合部位に DSB 形成補助因子が結合してくるかどうかを調べるために、それらの株について、クロマチン免疫沈降法とリアルタイム PCR による定量的な解析を行った。

4. 研究成果

Rec8 は、直接的あるいは間接的に Spo11 の染色体への結合を制御することで、DSB 形成に係わっていることが示されているが、Rec8 と DSB 補助因子との関係、分子レベルでの制御機構については分かっていなかった。本研究では、Rec8 と Spo11、DSB 補助因子に着目して解析を行い、分子レベルでの制御機構の一端を明らかにすることが出来た。

(1) Spo11 と Rec8 の相互作用

Rec8 が Spo11 と直接的に物理的な相互作用をして、Spo11 の局在を制御している可能性が考えられる。そこで、免疫沈降法により Spo11 と Rec8 の物理的な相互作用の検出を試みたが、現在までに検出できていない。

免疫沈降法による相互作用の検出が困難であると判断し、Spo11 テザーリングとクロマチン免疫沈降法による Spo11 と Rec8 の相互作用の検出を試みた。Spo11 と Rec8 の間に何らかの相互作用があれば、Spo11 の局在変化に伴い、Rec8 の局在も変化すると予想される。野生型の Spo11 を発現する株と Gal4BD-Spo11 を構成的に発現する株に対して、Rec8 に FLAG エピトープタグを融合し、ChIP-chip 法を行い、減数分裂期の Rec8 の全染色体上の局在を明らかにした。どちらの株でも、Rec8 は染色体全体に渡り数十 kb の間隔で局在していた。両株について Rec8 の結合部位の分布を比較したが、著しい変化は認められなかった。しかし、Rec8 の結合量について比較を行ったところ、幾つかの人為的 DSB 形成部位で Gal4BD-Spo11 発現株の方が強い結合を示す事を示唆する結果が得られた。

それらの領域についてより定量的の高い方法 (クロマチン免疫沈降とリアルタイム PCR を用いた方法) を用いて、経時的に Rec8 の結合量を比較した。その結果、DSB 形成時期において、確かに、それらの領域では Gal4BD-Spo11 発現株で Rec8 の結合量が増加していることが示された。さらに、ChIP-chip 法で有意な差が見られなかった人為的 DSB 形成部位数カ所についても定量的な解析を行ったところ、その中の一カ所、GAL2 プロモーター領域では、量的には僅かではあるが、統計上有意に Gal4BD-Spo11 発現株で Rec8 の結合が増加していた。

以上のように、直接的か間接的かは分からないが、DSB 形成時期に Spo11 と Rec8 が相互作用することを初めて示唆することが出来た。また、減数分裂期における Rec8 の局在を、これまでになく高解像度で全染色体について明らかにすることが出来た。Rec8 は姉妹染色分体の分配や染色体の高次構造の構築などでも非常に重要な役割を担っているため、減数分裂の研究において Rec8 の局在データは非常に利用価値が高いと考えられる。

(2) Spo11 補助因子群と Rec8 の関わり

Rec8 と Spo11 の関係は示唆されていたが、Spo11 に先立ち染色体に結合する Rec114 との関係は全く調べられていなかった。そこで、Rec114 の DSB 形成時期における局在を、高解像度で全染色体について調べた。これまで、明らかになっている Spo11 の局在と比較したところ、非常に高い相関を示していた。REC8

遺伝子欠損株についても Rec114 の局在を調べ、野生型と比較した。その結果、多くの領域で結合量が減少していることが分かった。Rec114 の結合が減少していた領域は、ほぼ Spo11 の結合が減少していた領域と一致していた (図 2、例として第 5 番染色体を示す)。以上の結果から、Rec8 あるいは Rec8 を介した染色体構造が、DSB 形成タンパク質の染色体への結合が重要であると考えられる。さらに、今後、Rec114 と同様に Spo11 よりも前に染色体に結合する Mei4、Mer2 についても調べる必要がある。

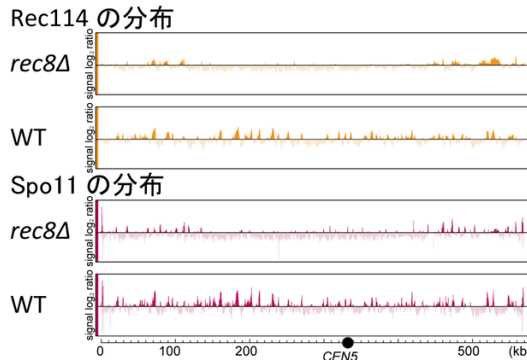


図2. 第 5 番染色体上の Rec114 と Spo11 の分布

(3) DSB 形成複合体形成への Rec8 の関わり Spo11 のテザーリングの系を用いて、Rec8 が DSB 形成複合体の形成に必要であるかを検証した。Gal4BD-Spo11 を発現させると、減数分裂期に *GAL2* 遺伝子プロモーター領域に人為的に DSB 形成を誘導することが出来る。*REC8* 遺伝子を欠損させても、テザーリングの効果により Gal4BD-Spo11 は *GAL2* 遺伝子プロモーター領域に結合し、DSB が形成されると予想できる。しかしながら、実際には人為的な DSB 形成頻度は著しく減少することが明らかになった。

REC8 遺伝子欠損株では、*GAL2* 遺伝子プロモーター領域に Gal4BD-Spo11 は結合するが、DSB 補助因子が結合しない、つまり Gal4BD-Spo11 と相互作用して複合体を形成できないという可能性が考えられる。各 DSB 補助因子に FLAG エピトープタグを融合し、定量的な方法でその可能性を調べた。その結果、Gal4BD-Spo11 を発現する *REC8* 遺伝子欠損株では、Gal4BD-Spo11 を発現する株と比較して、DSB 形成補助因子の結合量が減少していることが明らかになった (ただし、*Xrs2* については FLAG タグを付加すると減数分裂に異常が生じることが分かったため、実施していない)。因子により減少の頻度が異なっていることも分かった。これらのことから、Rec8 は DSB 形成複合体の形成にも関わっていると考えられる。また、これまでに Spo11 と DSB 補助因子の物理的な相互作用が調べられているので、そのデータを交えて考察するこ

とで、DSB 形成複合体形成における Rec8 の役割について明らかにしたい。

本研究の結果より、Rec8 あるいは Rec8 を介した染色体構造が DSB タンパク質の染色体上への結合に加え、DSB 形成複合体形成にも関与していると考えられる。もしかすると、これまで考えられていなかったが、減数分裂期相同組換えの開始と染色体分配が Rec8 を通じて密接に関わり合っているのかもしれない。今後、Rec8 と DSB 形成補助因子との物理的な相互作用の検出、あるいは Rec8 と DSB タンパク質の相互作用を仲介する新規因子の探索などを通して、染色体高次構造による DSB 形成メカニズムの全貌が解明されることが期待される。

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 Takahito Yoshida, Kenji Shimada, Yukako Oma, Véronique Kalck, Kazumi Akimura, Angela Taddei, Hitoshi Iwahashi, Kazuto Kugou, Kunihiro Ohta, Susan M Gasser and Masahiko Harata. “Actin-related protein Arp6 influences H2A.Z-dependent and -independent gene expression and links ribosomal protein genes to nuclear pores”. *PLoS Genetics*, Vol. 6, e1000910 (2010), 査読有り

② Kazuto Kugou, Tomoyuki Fukuda, Shintaro Yamada, Masaru Ito, Hiroyuki Sasanuma, Saori Mori, Yuki Katou, Takehiko Itoh, Kouji Matsumoto, Takehiko Shibata, Katsuhiko Shirahige and Kunihiro Ohta. “Rec8 guides canonical Spo11 distribution along yeast meiotic chromosomes”. *Molecular Biology of the Cell*, Vol. 20, pp.3064-3076 (2009), 査読有り

③ Kazuto Kugou and Kunihiro Ohta. “Genome-wide high-resolution chromatin immunoprecipitation of meiotic chromosomal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*”. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 557, pp.285-304 (2009), 査読有り

[学会発表] (計 9 件)

① Kazuto Kugou. “Regulation of the localization of DSB proteins on chromosomes by Rec8”. The 6th UK-Japan Cell Cycle Workshop, April 13, 2011, The Low Wood Hotel, UK

② 伊藤将, 「染色体ドメインによる減数分裂

期相同組換え開始制御と染色体接着因子の関係」、第28回染色体ワークショップ、2011年1月12日、山代温泉瑠璃光（金沢）

③ Kunihiro Ohta、”Control of recombination-initiating DNA double strand breaks by cohesion and chromosomal axis proteins”、BMB2010、2010年12月7日、神戸ポートアイランド（神戸）

④ 伊藤将、「染色体接着因子 Rec8 と遺伝的組換え開始因子 Spo11 の相互作用」、BMB2010、2010年12月7日、神戸ポートアイランド（神戸）

⑤ 久郷和人、「減数分裂期姉妹染色体接着因子と減数分裂期相同組換えの関係」、BMB2010、2010年12月7日、神戸ポートアイランド（神戸）

⑥ 久郷和人、「減数分裂期相同組換え開始因子と姉妹染色体接着因子 Rec8 の関係」、日本遺伝学会第82回大会、2010年9月21日、北海道大学（札幌）

⑦ 久郷和人、「減数分裂期の DSB 形成における Rec8 の役割」、第9回核ダイナミクス研究会、2010年5月27日、ラフォーレ修善寺（伊豆）

⑧ 久郷和人、「Spo11 の染色体への結合と DSB 形成における Rec8 の必要性」、日本分子生物学会年会、2009年12月12日、パシフィコ横浜（横浜）

⑨ Kazuto Kugou, “Regulation of localization of Spo11 on chromosomes by meiotic cohesin component Rec8”, International symposium on “Chromosome cycle and genome dynamics”, November 10, 2009, Sunvalley Resort Nasu, Tochigi, Tochigi, Japan

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：