

平成 21 年 5 月 12 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18370003  
 研究課題名（和文） 染色体高次構造体による組換え制御メカニズムの解明  
 研究課題名（英文） Studies for regulation mechanism of meiotic crossover formation through the protein-chromosome structure  
 研究代表者  
 篠原 美紀（SHINOHARA MIKI）  
 大阪大学・蛋白質研究所・准教授  
 研究者番号：80335687

## 研究成果の概要：

減数分裂期に発現する Spo16 タンパク質が、シナプトネマ複合体と呼ばれる減数分裂期に形成される染色体高次構造体の新規構成因子であることを明らかにした。配偶子を作るとき、染色体数を半数にするために、キアズマを染色体上で正しく配置する仕組み（干渉）と全ての染色体にキアズマを必ず作る仕組み（保証）がある。シナプトネマ複合体が干渉と保証の両方を制御するがそれぞれに異なるユニットを用いることを明らかにした。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2007 年度	5,200,000	1,560,000	6,760,000
2008 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	14,000,000	4,200,000	18,200,000

## 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：減数分裂期、相同組換え、シナプトネマ複合体

## 1. 研究開始当初の背景

減数分裂期はヒトを含む有性生殖を採用している生物にとって次世代に遺伝情報をつなぐために必要な配偶子形成を行う過程である。また、減数分裂期は特異的な染色体ダイナミクスを伴うゲノム再編を行う場でもある。そこには進化の原動力ともなり得る遺伝的組換えによるゲノム情報の改変、相同染色体の分配、ホーステール運動やブーケ構造など染色体の空間的配置変化とい

った減数分裂期特有の興味深い現象が多く見られる。しかし、それらの現象の生物学的意味あるいはその分子メカニズムについては不明な点が多く残されている研究分野でもある。その中で、我々は相同染色体組換えによるゲノムの改変と相同染色体の分配機構に興味を持っている。その中でも特に減数分裂期中期に見られる染色体蛋白質高次構造体であるシナプトネマ複合体と相同組換えの機能的連係機構について焦点をあて研究を行う。

## 2. 研究の目的

減数分裂期における相同組換えは、通常物理的接着の存在しない相同染色体同士を減数第一分裂期につなぎ止めておくための構造であるキアズマを形成するために必須である。一方、シナプトネマ複合体は減数分裂期第一中期に一過的に形成される染色体高次構造体で、その形成が阻害されるとキアズマ形成に必要な交叉型組換え形成が特異的に阻害される。このことは、①シナプトネマ複合体が組換えを制御するのに必要か②組換えの制御因子がシナプトネマ複合体の構成因子に含まれるかの可能性が考えられる。我々は個々のシナプトネマ複合体構成因子と組換えの間でのクロストーク機構とその制御メカニズムを明らかにすることを目的として解析を行った。

## 3. 研究の方法

出芽酵母 SK1 株を用いて主な解析を行った。SK1 株は同調的に減数分裂を行うことの出来る酵母株である。また、サザンブロット法を用いた染色体上での組換え過程の経時的変化と間接蛍光抗体法を用いたタンパク質の局在、また、4 胞子解析を用いた遺伝的組換えの解析を同じタイムコース実験サンプルから調整することで、組換えというイベントと染色体構造の関係を多角的に解析することが出来た。特に、組換え中間体をさらに詳細に解析を行うために、DNA 架橋後に二次元ゲル電気泳動法を用いて解析を行った。また、さらに ZMM タンパク質を大腸菌内で大量発現させる系を構築し、そこから精製することを試みた。その精製タンパク質標品を用いて、Zip3 についてユビキチン E3 酵素という新しい活性を見いだすことが出来た。

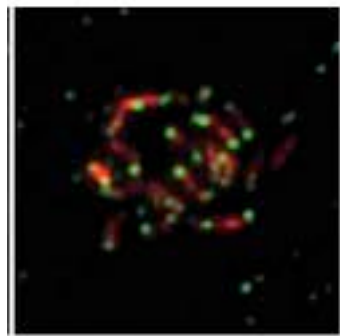
## 4. 研究成果

### ①シナプトネマ複合体因子同士の相互関係を明らかにする

#### Spo16 の機能解析

シナプトネマ複合体の因子 (Zip1/2/3, Mer3, Msh4/5) は ZMM 因子と呼ばれ、その変異株解析からは全ての因子の変異株が同じ欠損を示す。つまり、減数分裂期組換え頻度の低下、特にキアズマ構造形成に不可欠な交叉型組換え特異的な欠損とそれに伴う相同染色体の不分離と交叉型組換え制御機構の一つ Crossover interference (交叉型組換え干渉) の欠損を大きな特徴としている。我々は独自のスクリーニングにより単離した Spo16 の変異株がこれら ZMM 変異とほぼ同じ欠損を示すことを明らかにした。また、シナプトネマ複合体上に Dot 状の Foci として観察されたことから新規のシナプトネマ複合体因子だと結論づけた。また、spo16 変異株の詳細な解析から Spo16 蛋白質は Transverse element (Zip1) の伸長に必要であることがわかった。

減数分裂期の酵母染色体上の Zip1(赤)タンパク質と Spo16(緑)タンパク質の局在  
Shinohara M et al., *Nature Genet* (2008)



### Spo16 を含めた ZMM 因子の相互関係について

同時期に他の研究グループによって発表された Spo22 も加えて、シナプトネマ複合体の因子として、Zip1/2/3, Mer3, Msh4/5, Spo16/22 の 8 つが同定されている。それらの機能的あるいは物理的相互作用について、

フォーカス形成の依存性を指標にして調べた。その結果、Zip1/Zip3 のグループ、Msh4/5/Mer3 のグループ、そして Zip2/Spo16/22 の3つの機能グループに分類することが出来ることを明らかにした。

### ZMM 因子の生化学的機能の解析

ZMM 因子はシナプトネマ複合体という染色体構造を形成する因子でありながら、様々な酵素モチーフを持っていることを見いだした。特に Zip3 においては RING-Finger モチーフを、Spo22 には TPR Repeat モチーフ、Zip2 には WD40 モチーフがあることがわかった。これらのモチーフはユビキチン化あるいは SUMO 化に関わる E3 リガーゼに見られるモチーフであることからユビキチン化活性について Zip3 タンパク質を精製し生化学的に解析を行った。その結果、SCF タイプの E2 エンザイムである Cdc34 依存的にユビキチン化活性があることを明らかにした。

### ②シナプトネマ複合体による交叉型組換え制御の分子メカニズムの解明

#### 組換え蛋白質 Rad51 と Dmc1 と相互作用を示す因子の同定

我々は Msh4/5 が交叉型組換えの干渉作用に重要であることを見いだした。Dmc1 もまた、交叉型組換えの干渉作用に重要な機能を果たすことから Dmc1 と Msh4/5 との間に物理的相互作用があるのではないかと考えた。Msh5 あるいは Msh4 に対する抗体を作成し免疫沈降法を用いて Dmc1 との相互作用について検討を行った結果、Dmc1 と Msh4/5 との間での物理的相互作用を検出することが出来た。

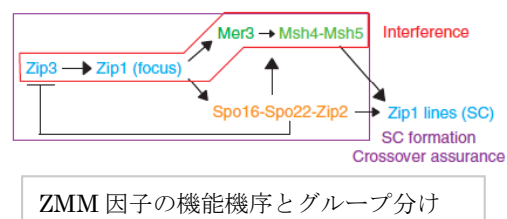
#### ZMM による交叉型組換え保証と干渉作用における使い分けの解明

減数分裂期組換えは組換えの保証 (Assurance) と干渉 (Interference) の制

御を受けていることが知られている。今までは ZMM 因子はその両方に必要なことから、保証と干渉は同じメカニズムによって行われているのだろうと考えられてきた。我々が解析を行った結果、全ての ZMM 因子は保証作用に必要であったが、干渉作用には Spo16 と Spo22 は必要ではなかった。また、特に Msh4/5 の染色体へのローディングが干渉作用には重要であることを示した。この結果は、3つのサブグループの中で Msh4/5, Mer3 の染色体上での機能が干渉作用に重要な機能を果たすことを示している。またこの結果から、今まで広く信じられてきた、保証と干渉が相互依存的に係り合っているというモデルは成り立たないことが明らかとなった。

#### シナプトネマ複合体形成の後期課程に関わる因子の同定

Spo16 と相互作用する因子について検討を行った結果、Spo22 が相互作用することを見いだした。spo16 と spo22 それぞれの欠失変異株も減数分裂期組換えにおいて、全く同様の欠損を示すことから Spo16 と Spo22 複合体として機能すると考えられた。ZMM 因子以外での相互作用因子についても免疫沈降法を用いて解析を行ったが、これらの中で有為な相互作用を示す因子は見つからなかった。前述したように、Msh4/5 が組換え中期に中心的な機能を果たす、Dmc1 蛋白質と相互作用することから、ZMM 因子は組換え中期過程に主に関わっている可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)  
< 英文学術 >

1. Kosaka, Hiromichi, Miki Shinohara and Akira Shinohara  
Csm4-dependent telomere movement on nuclear envelope promotes meiotic recombination, *PLoS Genet.*, **4**: e1000196 (2008)
  2. Conrad, Michael, Chih-Ying Lee, Gene Chao, Miki Shinohara, Hiromichi Kosaka, Akira Shinohara, J. A. Conchello, and Michel E. Dresser  
Rapid telomere movement in meiotic prophase is promoted by *NDJI*, *MPS3* and *CSM4* and is modulated by recombination, *Cell*, **133**, 1175-87 (2008)
  3. Matsuzaki, Kenichiro, Akira Shinohara and Miki Shinohara  
FHA domain of yeast Xrs2, a homologue of human Nbs1, promotes non-homologous end joining through the interaction with a ligase IV partner protein, Lif1, *Genetics*, **179**, 213-25 (2008)
  4. Lao, Jecica P, Steve D. Oh, Miki Shinohara, Akira Shinohara, Neil Hunter  
Rad52 promotes postinvasion steps of meiotic double-strand-break repair, *Mol. Cell*, **29**: 517-524 (2008)
  5. Shinohara, Miki, Steve D. Oh, Neil Hunter and Akira Shinohara  
Crossover assurance and crossover interference are distinctly regulated by the ZMM/SIC proteins during meiosis, *Nature Genet.*, **40**: 299-309 (2008)
  6. Terasawa, Masahiro, Hideyuki Ogawa, Yasumasa Tsukamoto, Miki Shinohara, Katsuhiko Shirahige, Nancy Kleckner and Tomoko Ogawa  
Meiotic recombination-related DNA synthesis and its implications for cross-over and non-cross-over recombinant formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **104**: (14) 5965-5970 (2007)
  7. Aoki, Kazuaki, Miki Shinohara and Tateo Itoh  
Distinct functions of the two specificity-determinants in replication initiation of the plasmids ColE2-P9 and ColE3-CA38, *J Bacteriol.*, **19**: 2392-2400 (2007)
- < 邦文学術 >
8. 篠原美紀、篠原彰「減数分裂期組換え制御の分子メカニズム」、*蛋白質核酸酵素*、54: 466-471 (2009)
  9. 篠原美紀「タンパク質リン酸化を介した DNA 二重鎖切断修復制御のメカニズム」、*生化学*、80 : 1029-1033 (2008)
- [学会発表] (計 17 件)
1. 篠原美紀、染色体ワークショップ、2008.1.26-28、ウエルサンピア姫路
  2. 篠原美紀、日本分子生物学会年会、2008.12.9-12、神戸国際会議場
  3. 篠原美紀、日本放射線影響学会、2008.11.19-21、北九州国際会議場
  4. Miki Shinohara, 3R Symposium, 2008.10.27-30, 静岡県つま恋
  5. 篠原美紀、酵母遺伝学フォーラム、2008.9.10-12、北海道大学
  6. Miki Shinohara, XX International Congress of Genetics, 2008.7.12-17, Berlin, Germany
  7. Miki Shinohara, EMBO Workshop, 2008.5.16-23, Il Ciocco, Italy
  8. 篠原美紀、日本分子生物学会第 30 回年会、2007.12.13、横浜国際会議場
  9. Miki Shinohara, International Symposium on "Chromosome and Genome Stability & Instability", 2007.11.8, Osaka
  10. 篠原美紀、日本遺伝学会第 79 回大会、2007.9.13、岡山大学
  11. Miki Shinohara, The 8<sup>th</sup> European Meiosis Meeting, 2007.9.13, Kanagawa
  12. 篠原美紀、酵母遺伝学フォーラム、

2007.9.11、大阪大学

13. 小坂宏道、唐津, 第23回染色体ワークショップ, 2007.1.31-2.2
14. 篠原美紀、淡路島夢舞台国際会議場, 組換えワークショップ, 2006.11.27-29
15. 篠原美紀, つくば, 日本遺伝学会第78回大会, 2006.9.25-27
16. Miki Shinohara, Kyoto, The 20<sup>th</sup> IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 2006.7.22
17. 篠原美紀、三島, 酵母遺伝学フォーラム第39回大会, 2006.7.15-17

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

篠原 美紀 (SHINOHARA MIKI)

大阪大学・蛋白質研究所・准教授

研究者番号: 80335687

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし