

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06486

研究課題名（和文）減数分裂前期に適量のDNA二重鎖切断がつけられるメカニズムの解明

研究課題名（英文）Understanding the molecular mechanism regulating programmed DNA double strand breaks during meiotic prophase

研究代表者

佐藤 綾 (Sato, Aya)

京都大学・生命科学研究科・特別研究員 (RPD)

研究者番号：40595112

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：減数分裂において染色体が正常に分離されるためには、減数分裂前期にDNA二重鎖の切断によって促進される相同染色体間の交叉が正常に形成されることが必要である。そのためには、適切なレベルのプログラムされたDNA二重鎖切断がDNA切断酵素SPO-11によってつけられることが必須である。本研究は、線虫をモデル生物として、脱リン酸化酵素PP4と、それに拮抗するATRキナーゼが、DSB-1タンパク質の活性を調節することで、SPO-11活性を制御し、減数分裂前期における「ちょうどよい量のDNA切断」をつくり出すということを示した。この結果は、2022年にeLife誌に発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

精子と卵子を正常につくるためには、減数分裂において正確に染色体が分配される必要がある。減数第一分裂において染色体を双極に分離するためには、相同染色体間に交叉と呼ばれDNAの組み換え構造が作られている必要がある。この組み換え構造は、DNA二重鎖を酵素により切断し、それを母方と父方染色体間で繋ぎかえることにより作られるが、この時、DNA二重鎖切断の量を制御するメカニズムは謎のままであった。我々は、DNA切断酵素を補助するDSB-1と呼ばれるタンパク質の活性が、ATRとPP4と呼ばれる拮抗する二つの酵素の働きによりバランスよく保たれており、それが適切な量のDNA二重鎖を作ることを示した。

研究成果の概要（英文）：In order to separate chromosomes in two consecutive steps in meiosis, crossovers need to be established between homologous chromosomes during meiotic prophase. To this end, DNA cutting enzyme SPO-11 is expressed and generates double strand breaks in meiocytes. In this study, using *C. elegans* as a model organism, we showed that PP4 protein phosphatase and ATR kinase adjust the activity of DSB-1, a regulator of SPO-11 and thus maintain sufficient but not excess levels of DNA double strand breaks. This work was published in the journal eLife in 2022.

研究分野：細胞生物学

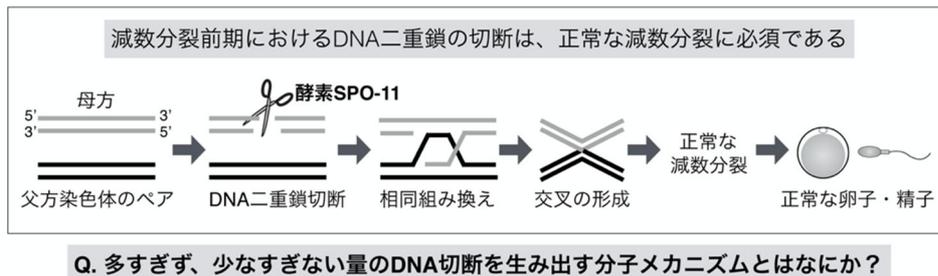
キーワード：減数分裂 染色体 交叉 線虫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

減数分裂における染色体分離の失敗は、流産・不妊やダウン症などの生殖問題につながる。減数第一分裂において染色体を双極にひっぱって分離するために、母方・父方相同染色体はまず交叉を形成し、お互いを連結しておかなければならない。減数分裂前期、母方・父方染色体は、相同組み換えにより DNA を繋ぎ変え、交叉を形成する。このため、減数分裂前期の生殖細胞は、減数分裂特異的な DNA 切断酵素 SPO-11 を発現させ、わざわざゲノム DNA を切断することで、相同組み換えを促進する(下図 1)。この時、多すぎる DNA 切断は、DNA 修復不足によるゲノムの不安定化を生む危険があるため、多すぎず、少なすぎない量の DNA 切断が得られるよう、SPO-11 の DNA 切断活性は何らかのフィードバック機構により厳密に調節されていると考えられている。特に、DNA 切断量が多すぎる場合は、修復しきれないゲノムの傷が残ってしまうため、これを阻止するフィードバック機構があるのではないかと予測されるが、その分子メカニズムは全く謎であり、SPO-11 活性の制御機構は未解明のままであった。生殖細胞は、変異導入やゲノム不安定化、という大きなリスクを持つ DNA 二重鎖切断をわざわざつくることで、染色体を繋ぎかえ(交叉形成)、減数分裂を達成する。このとき働いているはずの、最適量の DNA 二重鎖切断がつけられる調節機構とはどのようなものであるか? というのが本研究の掲げる学術的問いである。

図 1



2. 研究の目的

本研究は、線虫からヒトまで保存されたタンパク質の機能解析を糸口として、生殖細胞における DNA 二重鎖切断の調節機構を明らかにすることを目的とする。申請者はこれまで、線虫の卵母細胞において、脱リン酸化酵素 PP4 (Protein Phosphatase 4) が、DNA 切断酵素 SPO-11 を通して DNA 二重鎖切断を促進することを見つけた (PLOS Genetics 2014)。しかしながら、PP4 が SPO-11 を活性化して DNA 二重鎖切断を促進する分子メカニズムは不明のままであり、PP4 の作用機序を明らかにするためには、PP4 の基質を同定する必要がある。一方、線虫では、DSB-1 タンパク質が DNA 切断酵素 SPO-11 活性に必須であることが知られており (Stamper, 2013, PLOS Gen)、DSB-1 の酵母ホモログ Rec114 はリン酸化を受けることが知られていた。そこで申請者は、DSB-1 がホスファターゼ PP4 の基質である可能性を探索し、またこれに拮抗するキナーゼも同定することで、減数分裂前期において、最適量の二重鎖切断が作られるメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

まずウエスタンブロットを用いた生化学的解析より、まず DSB-1 がリン酸化されているらしいことを示し、このリン酸化量の変化を、様々な変異株のバックグラウンドを用いて示した。加えて、PP4 と ATR 変異線虫株の多重変異株などを作製し、遺伝学的解析や、また免疫染色解析をもちいてその表現型を明らかにすることにより、PP4 と ATR が拮抗する形で、DSB-1 のリン酸化を調節するらしいことを示した。

4. 研究成果

我々はまず、不妊になり、DNA 二重鎖切断が非常に減少する PP4 変異株の解析を起点として、PP4 の基質となる分子を探索した。我々は、まずウエスタンブロットを用いた生化学的解析より、DSB-1 が PP4 変異株においてよりリン酸化されていることと、ATR; ATM kinase 二重変異株においてリン酸化を受けないことを示した。また PP4 と ATR heterozygous 変異株の二重変異株では、PP4 変異株の DNA 二重鎖切断レベルの表現型がレスキューされることから、PP4 と ATR が DNA 二重鎖切断をつくる過程において、拮抗関係にあることが示された(図2)。ATR キナーゼは、主に SQ/TQ のアミノ酸配列をリン酸化することが知られており、DSB-1 のリン酸化部位としては5箇所の SQ 配列がある。そこでこれらの配列に部分変異を導入し、DSB-1 の非リン酸化型変異株を作製すると、これが DNA 二重鎖切断レベルの表現型について PP4 変異株をレスキューした。(図3)

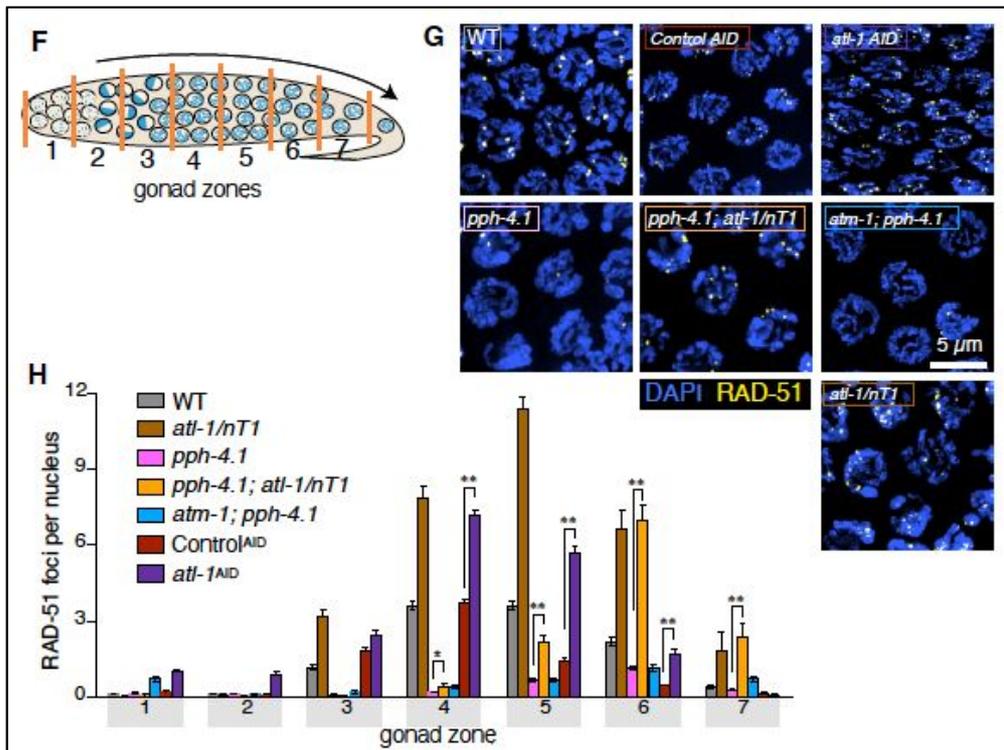


図 2

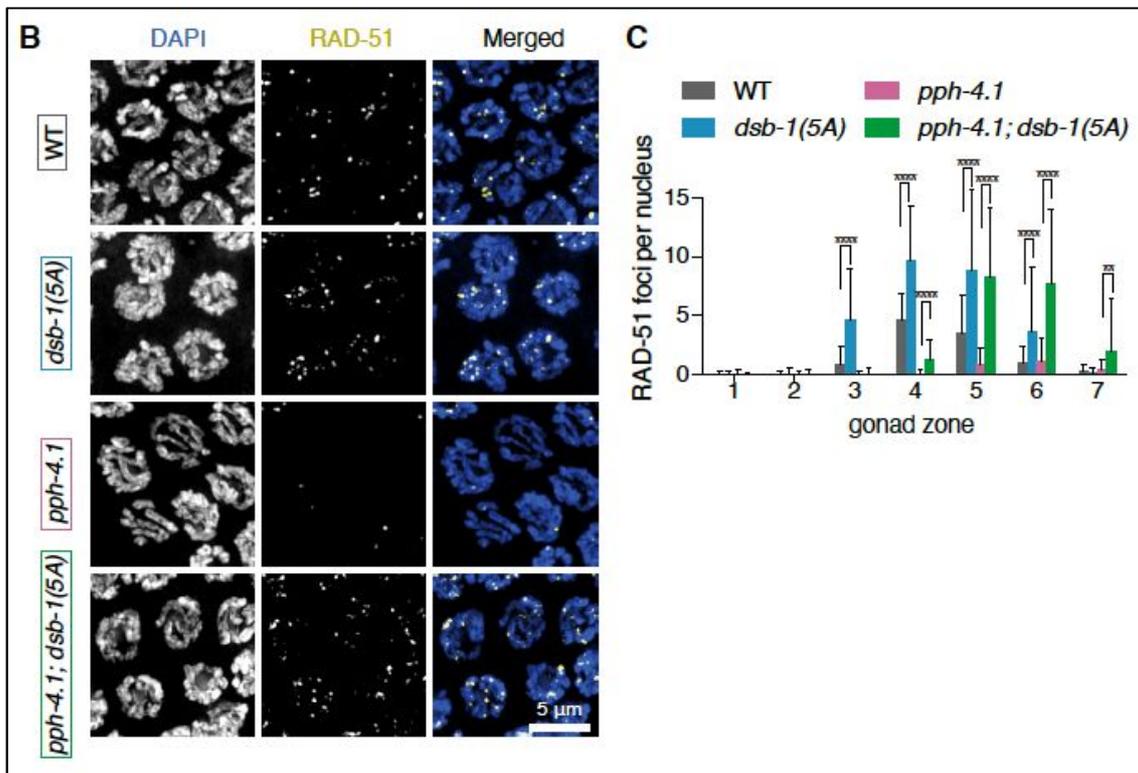


図 3

さらに、この5箇所のうちどのリン酸化部位が最も重要なのかを調べたところ、Ser186のリン酸化が最も重要であることがわかった。具体的にはSer186をアラニンに置換して作製した非リン酸化変異株 *dsb-1(S186A)*は、すべてのリン酸化サイトをアラニン置換して作製した非リン酸化変異株 *dsb-1(5A)*と同程度に *dsb-2* 変異株をレスキューすることがわかった。また、ウエスタンブロット解析より、*dsb-2* 変異株では、DSB-1のタンパク質量が減少しており、また、若い *dsb-2* 変異株においてもDSB-1のリン酸化量が比較的多いことが明らかになった。一方、*dsb-1(5A)*変異株では、リン酸化型DSB-1のバンドは大きく減少するものの、少しはリン酸化型のバンドが残っているため、*dsb-1(5A)*変異株においてもDSB-1は、変異を入れたSQ以外のサイトにおいてある程度リン酸化されていることが示された。実はDSB-1は非常にセリンの多いタンパク質であり、また、Ser186の直度に、連続してセリンが続いている特徴的な配列を持つ。現在は、SQサイトがリン酸化されることが引き金となり、この連続したSer配列が協調的にリン酸化されることで、DSB-1がhyperphosphorylationを受けるのではないかと予測し、それを検証している。

まとめると、我々は、DSB-1のリン酸化のレベルが、DSB-1活性のスイッチのオンオフになっており、DSB-1活性がATR/PP4という拮抗するキナーゼ、ホスファターゼにより調節されることを示した。ATRキナーゼは、DNA damage sensing kinaseでもあり、多くのDNA切断が検知されると活性化されるキナーゼである。すなわち、減数分裂前期の初期は非リン酸化型DSB-1がDNA二重鎖切断を促進しているが、DNA切断が一定量より増えると、ATRキナーゼが活性化されることにより、DSB-1をリン酸化し、DSB-1の活性を抑制することで、さらにDNA二重鎖切断が作られることを防ぐというnegative feedbackが存在することが示唆された。本研究は、減数分裂前期におけるDNA二重鎖切断のレベル制

御の分子メカニズムの一端を明らかにしたという意義がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Guo Heyun, Stamper Ericca L, Sato-Carlton Aya, Shimazoe Masa A, Li Xuan, Zhang Liangyu, Stevens Lewis, Tam KC Jacky, Dernburg Abby F, Carlton Peter M	4. 巻 11
2. 論文標題 Phosphoregulation of DSB-1 mediates control of meiotic double-strand break activity	5. 発行年 2022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.77956	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 Sato-Carlton Aya, Nakamura-Tabuchi Chihiro, Li Xuan, Boog Hendrik, Lehmer Madison K., Rosenberg Scott C., Barroso Consuelo, Martinez-Perez Enrique, Corbett Kevin D., Carlton Peter Mark	4. 巻 16
2. 論文標題 Phosphoregulation of HORMA domain protein HIM-3 promotes asymmetric synaptonemal complex disassembly in meiotic prophase in <i>Caenorhabditis elegans</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1008968
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1008968	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Knockdown of Bora homolog spat-1 results in crossover and synapsis defects in <i>C. elegans</i> meiotic prophase
2. 発表標題 Carlos Rodriguez, Aya Sato-Carlton, Peter Carlton
3. 学会等名 23回国際線虫学会（国際学会）
4. 発表年 2021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
研究協力者	カールトン ピーター マーク (CARLTON PETER MARK)		

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