

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770006

研究課題名 (和文) 減数分裂期における DNA 損傷チェックポイント修飾機構の解明

研究課題名 (英文) Defining the modification mechanisms of DNA damage checkpoint in meiosis

研究代表者

臼井 雄彦 (USUI TAKEHIKO)

大阪大学・蛋白質研究所・助教

研究者番号：70533115

研究成果の概要 (和文)：減数分裂期は、減数分裂期特異的な機構と体細胞分裂期システムの修飾を土台として成立すると考えられるが、その詳細は不明である。本研究では、体細胞分裂期の DNA 損傷に応答する DNA 損傷チェックポイントキナーゼ Rad53 が、減数分裂期に計画的に形成される DNA 二重鎖切断に反応しない生物学的意義について検討した。その結果、減数分裂細胞は、Rad53 が促進する体細胞期型の組換え修復を抑えることによって、配偶子形成に必須である減数分裂期組換えを促進する可能性を示した。

研究成果の概要 (英文)：In this study, I asked why a DNA damage checkpoint kinase Rad53 fails to respond to meiotic programmed DNA double-strand breaks (DSBs). This was a mystery given that a single mitotic DSB can activate Rad53 and that about 200 programmed DSBs are formed in meiosis. I found that meiotic cells may suppress the mitotic types of recombination repair modulated by Rad53 to promote meiotic recombination. The data shed light on how cells alter mitotic systems to execute meiosis to produce normal gametes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：DNA 二重鎖切断・DNA 損傷応答・シグナル伝達・ゲノム安定性・出芽酵母・相同染色体間組換え・姉妹染色体間組換え

1. 研究開始当初の背景

減数分裂細胞が計画的に形成した DNA 二重鎖切断 (DSB) は、減数分裂期組換えを開始する。減数分裂期組換えは相同染色体を対合させ、減数分裂における染色体の正確な分配を確実にする。結果、遺伝的多様性を持った正常な配偶子が作られる。従って減数分裂期組換えは、相同染色体間で起き、機能的なゲノム変化を生む。しかしゲノム安定性の維持が重要な体細胞において、DNA の傷として生じ

た DSB の相同組換え (HR) による修復は、相同染色体間より姉妹染色体間で優位に起きる。ゲノム変化を起こさない姉妹染色体間 HR と違い、親由来ゲノム間で起こる相同染色体間 HR は、体細胞では Loss of Heterozygosity などのガン化と関係する染色体異常を生む。一方、減数分裂期組換え (相同染色体間 HR) の欠損はダウン症候群や自然流産につながる染色体分配異常を起こす。この HR 修復の違いを制御する機構は未知であるが、その解

明は減数分裂期と体細胞分裂期の根本的な違いを規定するだけでなく、ヒト疾患に関連する染色体の異常な動態の理解につながる。

申請者は、DSBのHR修復制御機構とその破綻のゲノムへの影響の理解を最終的な目的として出芽酵母の体細胞分裂期と減数分裂期におけるDSB応答に着目した。体細胞分裂期のDSBには酵母から高等動物まで保存された「DNA損傷チェックポイント」が活性化され、ゲノム安定性の維持に関与する。減数分裂期の計画的DSBには「組換えチェックポイント」が活性化され、減数分裂期組換え(相同染色体間HR)の進行を促進する。興味深いことにDSBを認識するセンサーと最初に活性化するキナーゼMec1(ATRホモログ)は両方の経路で共通であるが、その下流が異なる。DNA損傷チェックポイントではRad53キナーゼ(Chk2ホモログ)が活性化され、組換えチェックポイントではRad53パラログのMre4キナーゼが活性化される。Mre4と異なり、Rad53とHR制御の関係はわかっていなかったが、私は、「Mec1がDSBシグナルをRad53あるいはMre4に伝える分岐点の解析はHR制御の理解を助けるのではないか」と考えた。

2. 研究の目的

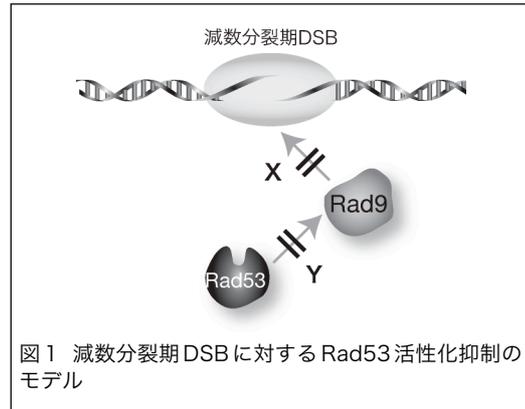
申請者は体細胞分裂期におけるRad53とその活性化蛋白Rad9の分子機構を明らかにしてきた。次に体細胞分裂期においてRad53は1個のDSBでも活性化されるが、細胞あたり200個近く形成される減数分裂期DSBに対しては活性化されないことに注目した。そこで減数分裂期においてRad53が計画的DSBに応答しない生物学的意義とRad53が活性化されないメカニズムの理解を目的に本研究を行った。

3. 研究の方法

(1)減数分裂期特異的なRad53過剰発現による影響の理解。

減数分裂期特異的にRad53活性を増加させるために、減数分裂期特異的蛋白であるDmc1のプロモーターの下にRad53を配置した(RAD53-op)。またキナーゼ活性を失った変異rad53-KDも同様に作成した(rad53-KD-op)。Rad53-op株では減数分裂期導入後、内在性Rad53のおよそ5~10倍の発現量が観察された(図2)。次にRad53の過剰発現が減数分裂期に及ぼす影響を3つの方法によって検討した: A) DAPI染色によって核分裂をモニターして減数分裂期進行の観察を行った; B) サザンプロットによる計画的DSBと組換え体の検出を行った; C) 蛍光免疫染色法によって組換え蛋白Rad51の局在の観察を行った。

(2)減数分裂期においてRad53が活性化しないメカニズムの理解。



体細胞分裂期におけるRad9によるRad53活性化機構を述べる。DSBが起きると、Rad9がDSB近傍のクロマチンに結合し、Mec1にリン酸化を受ける。リン酸化Rad9はRad53と結合する。結果、Rad53はDSB近傍に呼び込まれMec1にリン酸化を受けて活性化される。

減数分裂期ではRad53が計画的DSBに局在できないことが報告された。よってRad53抑制機構を調べるために、減数分裂期DSBを差別化してRad9による認識を抑える因子X、またRad9に結合してRad9をDSB近傍あるいはRad53に結合させない因子Yを考えた(図1)。

①因子Xの存在を検討するためにRad9が計画的DSB近傍に局在できるかを調べた。これまでクロマチン免疫沈降法や蛍光蛋白GFPとRad9の融合蛋白法によって、体細胞分裂期ではRad9のDSB局在が示されているので、同様の方法を用いた。

②因子Xと因子YがRad9に結合する蛋白である可能性があるので、ラージスケールの免疫沈降によってRad9と結合する蛋白を同定した。

③減数分裂期特異的変異株においてRad53が活性化されているものがないか調べた。活性化型のリン酸化Rad53はウェスタンブロットによってバンドがシフトするので、変異株の細胞抽出液を調製し検討した。

4. 研究成果

(1)減数分裂期特異的なRad53の過剰発現は減数分裂期組換えに悪影響を与える。

①RAD53-op株では減数分裂期の進行が遅延することがわかった(図2)。この遅延は、計画的DSBが形成されないspo11-YF株や組換えの異常を検知できないmre4Δ株では一部

解除されることことから Rad53 活性の増加が減数分裂期組換えを阻害する可能性が考えられた。さらにこの可能性を支持する結果得た。RAD53-op 株では計画的 DSB の消失と組換え体形成の遅れを観察し、また組換え蛋白 Rad51 局在時間が野生株より長くなっていることを見出した。これらの効果は rad53-KD-op 株では全く観察されないことから、Rad53 のターゲットを介した作用であることがわかる。以上の結果から Rad53 がそのターゲットを通して計画的 DSB が形成された後、減数分裂期組換えが進行する過程に何らかの影響を与えることが明らかとなった。

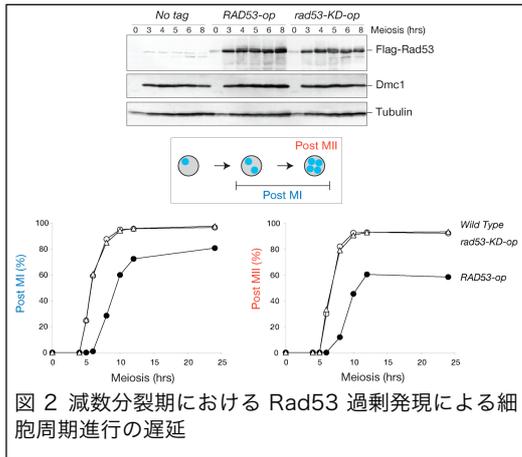


図 2 減数分裂期における Rad53 過剰発現による細胞周期進行の遅延

②計画的 DSB は形成された後、末端が消化されて一本鎖 DNA が生じ、組換え反応が進む。そこで Rad53 がどのような DSB 末端に対して作用するか知るために、DSB 末端が異なる状態に止まる変異株において Rad53 を過剰発現した時の作用を観察した。sae2Δ 変異株では、DSB 末端消化が起らないため、未消化 DSB 末端が蓄積する。Rad53 過剰発現は sae2Δ 変異株の DSB に対して影響を示さなかった。次に、減数分裂期組換えの DNA 鎖交換反応に欠損を示す *dmc1Δ* 株での Rad53 の過剰発現の作用を検討した。*dmc1Δ* 株では DSB が修復されないため DSB の過剰消化が起こるが、Rad53 を過剰発現すると、過剰消化が抑制された。さらに時間が経つと DSB の消失が観察された。DSB の消失は DSB の組換え修復によるものであった。なぜなら *dmc1Δ* 株では蓄積する Rad51 の局在が *dmc1Δ RAD53-op* 株では消失し、その消失は、体細胞分裂期で Rad51 とともに組換え修復に働く Rad54 に依存していたからである (図 3)。また *dmc1Δ rad53-KD-op* 株では DSB の消失は全く起こらなかったことから Rad53 がターゲットのリン酸化によって組換え修復を促進することが明らかとなった。

③これまでに *dmc1Δ* 株における Rad51 の過剰発現も DSB を修復することが示されているが、その組換え修復は、相同染色体間で起き、減

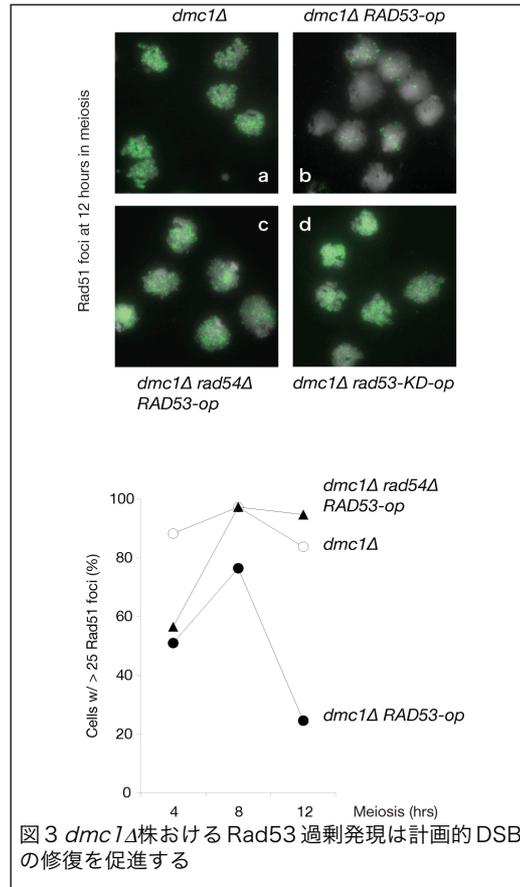


図 3 *dmc1Δ* 株における Rad53 過剰発現は計画的 DSB の修復を促進する

数分裂細胞にとって機能的であることが知られている。よって Rad51 の *dmc1Δ* 株における過剰発現は、正常な配偶子形成につながる。そこで *dmc1Δ RAD53-op* 株を調べたところ、相同染色体間で組換えは起こっておらず、形成された配偶子は致死であった。このことは Rad53 の過剰発現は減数分裂細胞にとって機能的でない姉妹染色体間の組換えを促進する可能性が示唆された。よって①で述べた *RAD53-op (DMC1)* 株で観察された減数分裂期組換え (相同染色体間組換え) の阻害は、姉妹染色体間組換え過程との衝突によるものかも知れない。

このような Rad53 による組換え制御機能は世界で始めて示されたものである。姉妹染色体間組換えは体細胞分裂期の DSB 修復にとって重要であるので、今後 Rad53 ターゲットの同定と解析は、姉妹染色体間組換えのメカニズムの理解に貢献できると期待される。

(2) 減数分裂期の計画的 DSB 部位には Rad53 の活性化に必要な Rad9 の結合が抑制されている。

①Rad9-HA あるいは Rad9-YFP 融合蛋白を発現する株で、それぞれ染色体免疫沈降と蛍光蛋白局在観察により検討したが、Rad9 の DSB 部位への結合は観察されなかった。従って、可

能性 X、すなわち減数分裂期には Rad9 が DSB 部位に局在する事を阻害する因子のあることが示唆された。

②Rad9 は減数分裂期の細胞抽出液中で不安定なので精製できないが、体細胞分裂期から精製でき、Rad9 結合蛋白として HDAC 構成蛋白 Sum1 を同定した。Sum1 は、減数分裂期中期に誘導される遺伝子群の転写抑制因子であり、減数分裂期特異的な転写活性因子である Ndt80 が活性化される時期に不活化される。

Ndt80 が活性化されると Rad53 活性化の抑制が解除される結果を得つつあり、Sum1 の不活化時期と一致することから、Sum1 が Rad9 の DSB 局在阻害因子である可能性が考えられる。また複数のプロテオミクス解析が Sum1 の S712 を Mec1 がリン酸化することを示している。よってリン酸化の機能は未知であるが、Sum1 は Rad9 と共に Mec1 ターゲットである。Mec1 が組換えチェックポイントを介して Ndt80 の活性化を抑えていることを考え合わせると、Sum1 のリン酸化の機能解析は今後重要課題である。

③減数分裂期における Rad53 抑制機構の手がかりとして Rad53 を活性化している減数分裂期特異的な変異を検索し、*rec8Δ*変異株を得た。よって減数分裂期特異的なコヒーシオンで染色体構造の要である Rec8 が Rad53 抑制に関与することが示唆された。今後は、Rec8 や Sum1 がどのように Rad9 の計画的 DSB への局在を抑えているか調べる必要がある。

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 2 件)

① Usui T., Foster S., Petrini J.H.J. Maintenance of the DNA damage checkpoint requires DNA damage -induced mediator protein oligomerization. *Molecular Cell* 33. 147-159 (2009)

② Stracker T.H., Usui T., Petrini J.H.J. Taking the time to make important decisions: the checkpoint effector kinases Chk1 and Chk2 and the DNA damage response. *DNA Repair* 8. 1047-1054 (2009).

[学会発表] (計 6 件)

① 臼井雄彦、篠原美紀、篠原彰 出芽酵母 DNA 損傷チェックポイントキナーゼ Rad53 の減数分裂期における機能抑制の生理的意義 第 28 回染色体ワークショップ 2011 年 1 月 12 日 石川県山代温泉、ホテル瑠璃光

② 臼井雄彦、篠原彰 Negative impacts on meiotic processes by activation of DNA damage checkpoint kinase Rad53, the budding yeast Chk2 ortholog 第 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月 7 日 兵庫県神戸市、神戸ポートアイランド

③ 臼井雄彦、篠原彰 出芽酵母 DNA 損傷チェックポイントキナーゼ Rad53 の減数分裂期における機能抑制の生理的意義 日本遺伝学会第 82 回大会ワークショップ「ゲノム安定性の維持に関わる細胞機構」2010 年 10 月 20 日 北海道札幌、北海道大学高等教育機能開発総合センター

④ 臼井雄彦、篠原彰 Negative impacts of DNA damage checkpoint kinase activation on meiotic recombination 第 7 回 3R 国際シンポジウム 2010 年 10 月 27 日 富山県、富山国際会議場

⑤ 臼井雄彦、篠原彰 DNA 損傷チェックポイントキナーゼ Chk2 の出芽酵母ホモログ Rad53 の減数分裂期における機能抑制 生殖サイクル若手勉強会 2010 2010 年 7 月 22 日 茨城県筑波、つくばグランドホテル

⑥ 臼井雄彦、篠原彰 出芽酵母 DNA 損傷チェックポイント蛋白 Rad9 と Rad53 の減数分裂期における抑制機構と生理的意義 第 20 回 DNA 複製、組換え、修復ワークショップ 2009 年 11 月 1 日 琵琶湖コンファレンスセンター (滋賀県)

[6. 研究組織]

(1) 研究代表者

臼井 雄彦 (USUI TAKEHIKO)
大阪大学・蛋白質研究所・助教
研究者番号：70533115