

論文の内容の要旨

論文題目

Regulation of meiotic recombination initiation by a conserved HORMAD protein Hop1.

(保存された HORMAD 型染色体因子 Hop1 による組換え開始制御機構)

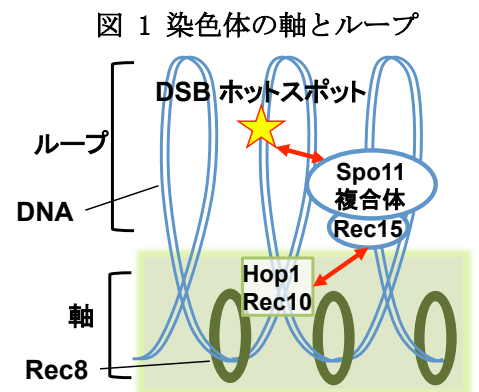
氏名 仮屋園 遼

【背景と研究概要】

減数分裂は細胞の持つゲノムを半減させて配偶子を作る特殊な細胞分裂で、有性生殖を行う真核生物において必須である。減数分裂期前期には、減数分裂期組換えと呼ばれる相同染色体間での DNA 鎖の交換反応が行われる。これによって次世代のゲノムの多様性を生み出すとともに、減数分裂期の正確な染色体分配を保障している。

減数分裂期組換えはトポイソメラーゼ様タンパク質 Spo11 による DNA 二重鎖の切断(Double Strand Breaks 以下 DSB)によって開始され、切断された DNA 鎖が相同鎖を用いて修復される事で完了する。Spo11 は複数の補助因子と共に複合体として働く。近年の研究で Spo11 を含めた多くの因子について種間を超えた保存性を有することが分かってきたが、各因子の種間で共通した機能については分かっていない事が多い。

Spo11 複合体による DSB 形成は、染色体上の位置、時間、量に関して厳密に制御されている。特に DSB が導入される場所については、特定の領域に非常に高頻度で起きる、“DSB ホットスポット (以下ホットスポット)” の存在が知られている。このホットスポットはプロモータ領域など、開いたクロマチン構造の領域に多く存在する。DSB 導入の制御には局所的なクロマチン構造だけではなく、より高次のクロマチン構造も関与しており、減数分裂期の染色体が凝集して形成される軸構造は、DSB の促進、抑制両方の制御に必要である。軸構造は減数分裂期特異的コヒーシン Rec8 複合体を中心に形成され、Spo11 複合体を含む多くの減数分裂期タンパク質局在の足場となる。ゲノムワイドの局在解析により、Rec8 はセントロメア周辺に加えて染色体腕部に離散して局在することが分かっており、Rec8 の結合領域が凝集して軸となり、非結合領域の DNA は軸からループアウトする“ループ領域”になっていると考えられている。一方ホットスポットは Rec8 の非局在領域、すなわちループ領域に存在する。(図 1)



Spo11 複合体は軸に局在するが、軸とホットスポットが相互作用することでホットスポットに DSB 導入

を行っていると考えられている。この軸-ホットスポットの連結モデルは直接観察されていないが、Spo11 複合体は軸とホットスポット両方に局在することから、Spo11 複合体が軸とホットスポット両方に結合することで軸とホットスポットの相互作用が生じると考えられている。しかし Spo11 複合体が軸あるいはホットスポットに局在する分子メカニズムの解明は不十分である。

本研究では分裂酵母を用いて Spo11 複合体の因子 Rec15 と軸の因子 Hop1 が相互作用することを見いだした。この相互作用が Rec15 の軸への局在を促進して軸-ホットスポットの相互作用の基盤になっていることを明らかにした。さらに、軸構造を形成する主要な軸因子 Rec10 は Rec15 と Hop1 双方に結合することから、三者の相互作用によって Rec10 が強固に Rec15 を軸にリクルートしていることを、Rec15, Hop1 それぞれの結合を特異的に損なう Rec10 の点変異アレルを用いて明らかにした。

【実験結果】

1. Hop1 のゲノムワイド局在解析

まず Hop1 のゲノム上の局在を調べるため、Hop1 に対し ChIP シーケンスアッセイを行った。比較のため Rec8 の ChIP シーケンスアッセイも行ったところ(図 2A)、Hop1 の結合部位は Rec8 の結合部位と多くがオーバーラップするほか、一部は Rec8 の結合のない DSB ホットスポットともオーバーラップすることが分かった。(図 2B)この Hop1 の局在パターンは先行研究の Rec10、Rec15 の局在パターンと類似していることが分かった。(図 2C)さらに ChIP-qPCR により、Hop1 の局在は Rec15 破壊株ではホットスポットから失われ、Rec10 破壊株では軸、ホットスポット両方から失われることが分かった。

2. Hop1 は Rec10, Rec15 と相互作用する

局在解析から Hop1 は Rec10, Rec15 と相互作用する可能性が示唆されたので、共免疫沈降実験を行ったところ Hop1 は Rec10, Rec15 と相互作用することが分かった。さらに酵母 2 ハイブリッド法でタンパク質同士の直接の相互作用を見ると、Hop1 の N 末端が Rec10 と、C 末端が Rec15 と直接結合することが示唆された。また、種間で保存されている Rec15 の C 末端は Hop1, Rec10 両方への結合に重要であることが示唆された。(図 3)

3. Hop1 と Rec15 の結合は軸とホットスポットの

図 2 Hop1 は軸とホットスポット双方に局在し、Rec10 Rec15 と類似した局在パターンを示す

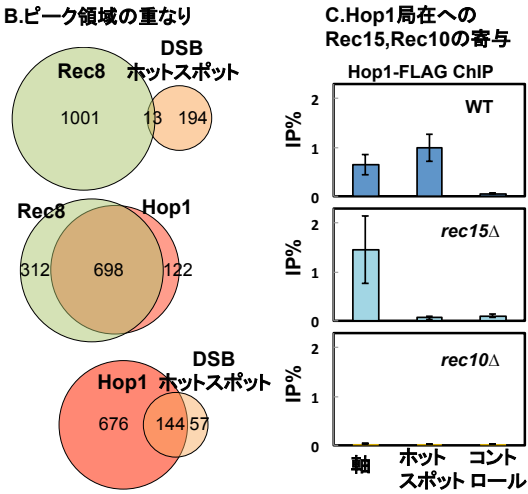
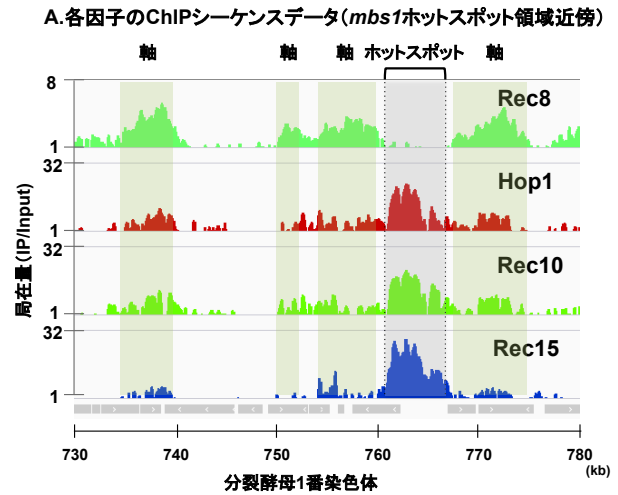


図 3 Hop1 と Rec10, Rec15 は直接結合する

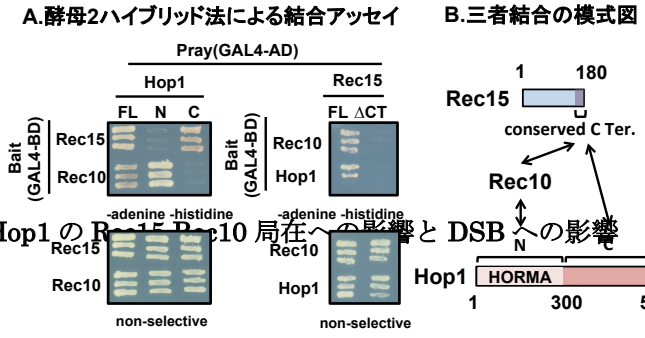
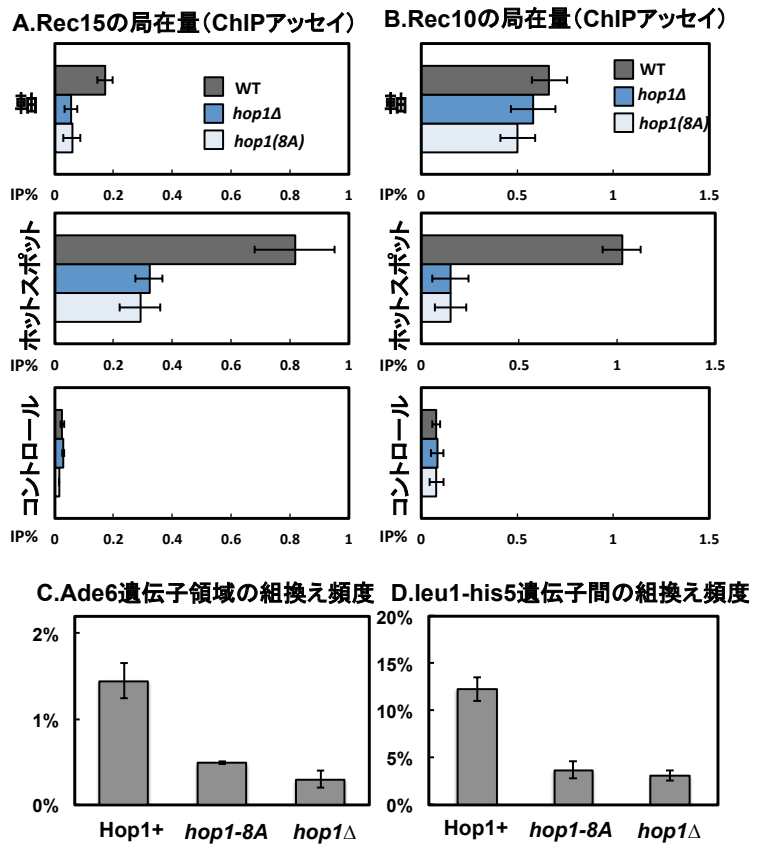


図 4 Hop1 の Rec15 Rec10 局在への影響と DSB の影響

相互作用を促進し DSB 導入を促進する

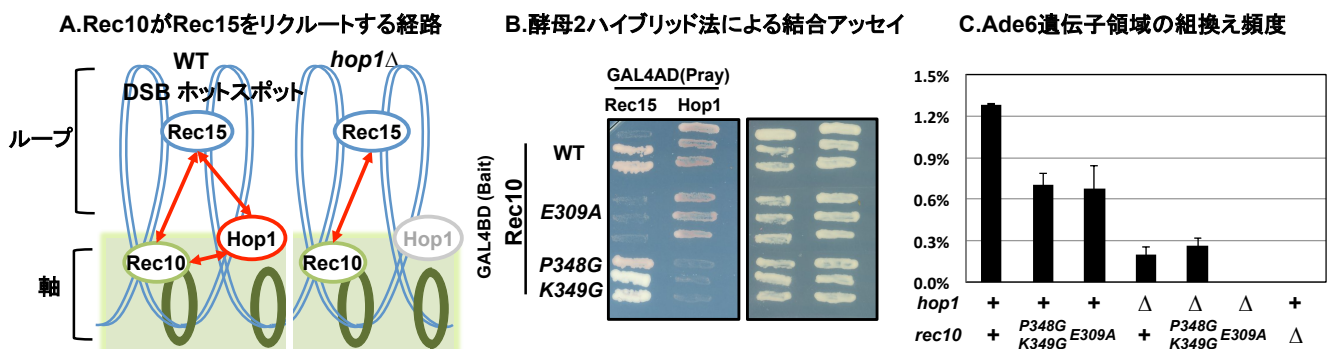
Rec10 および Rec15 の局在パターンに対する Hop1 の寄与を調べるため、Hop1 破壊株 (*hop1Δ*) において Rec15 および Rec10 の局在を ChIP-qPCR で確認した。Hop1 存在下では Rec15 および Rec10 の局在は軸とホットスポット両方にある。Hop1 破壊株では Rec15 の軸の局在が失われ、ホットスポットの局在は減少するが残る (図 4A)。一方 Rec10 は Hop1 破壊株では軸の局在は残り、ホットスポットの局在が失われた (図 4B)。Rec10, Rec15 の局在変化は軸とホットスポットの相互作用が失われた状態を反映していると考えられる。Rec15 との相互作用が失われる Hop1 の点変異株 (*hop1-8A*) においても同様の結果が得られ (図 4A, B)、破壊株、点変異株ともに DSB の減少による組換えの減少が見られた (図 4C)。このことから Hop1 は Rec10, Rec15 との相互作用によって、軸とホットスポットの相互作用に寄与し、DSB を促進していると考えられる。



4. Rec10 は直接ならびに Hop1 を介して Rec15 を軸にリクルートして DSB を導入する

先行研究から Rec10 は Rec15 と Hop1 双方と直接相互作用することが知られている。Rec10 と Rec15 の直接相互作用は本研究で見つかった Hop1 と Rec15 との相互作用と冗長に軸-ホットスポット連結と DSB 導入に働いているのではないかと考えた (図 5A)。そこで、それぞれの結合を損なう Rec10 の点変異を作成し、DSB による組換え率を測定した。すると、それぞれの点変異単体では組換え率は半減にとどまるが、*hop1* 破壊変異と Rec15 と相互作用できない Rec10 点変異 (E309A) を組み合わせると組換え率は *rec10Δ* 同様に検出限界以下になった (図 5)。これは上記の Rec10 が二つの経路で Rec15 を軸にリクルートするというモデルに合致する結果である。

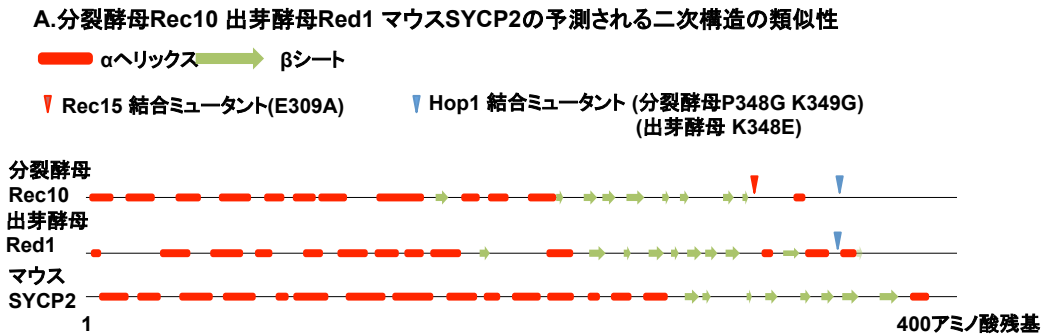
図 5 Rec10 は二種類の経路で Rec15 を軸にリクルートする



5. Rec10 ホモログの Red1 と SYCP2 は予測される二次構造が類似している

Rec10 のホモログである出芽酵母 Red1, マウス SYCP2 について配列から二次構造予測を行ったところ、Rec10 の Hop1 並びに Rec15 との相互作用部位を含む N 末端で予測二次構造の類似が見られた。(図 6)

図 6 Rec10 の二次構造は保存性が予測される



【考察と展望】

今回の研究で分裂酵母の Hop1 には軸とホットスポットの相互作用に寄与して DSB を促進する機能があることが明らかになった。Hop1 は動物、高等植物、菌類で保存されており、出芽酵母やマウスでは軸形成、組換えの促進、組換え修復のチェックポイント、相同染色体の対合など多数の機能を担っている。一方分裂酵母の軸構造は出芽酵母やマウスに比べて発達しておらず、分裂酵母の Hop1 の機能は組換えの促進以外の機能には寄与がほとんどないことから、これは Hop1 の根源的な機能であると推測できる。

また、Rec10 は直接の結合と Hop1 を介する結合の二経路で Rec15 を軸にリクルートすることが今回の研究で明らかになった。Rec10 は軸の主要構成因子でターンオーバーの少ないと考えられる一方、Hop1 の持つ HORMA ドメインは細胞内の状態を感知して他のタンパク質と結合乖離をする機能を持っている。このことから二つの経路は Rec10 が細胞内の状況に応じて結合する Hop1 の量を変えることで DSB の量を調節すると同時に Hop1 を介さない直接の結合で最低限の DSB を担保する仕組みであると考えられる。

出芽酵母において Rec15 ホモログの Mer2 の軸への局在は Hop1 ならびに Rec10 ホモログの Red1 に依存することが知られているが、直接の相互作用については不明である。マウスにおいては Rec15 ホモログ IH01 が Hop1 ホモログの HORMAD1 と結合し、IH01 の軸局在は HORMAD1 に依存するが分かっているが、Rec10 ホモログと推定される SYCP2 の関与は不明である。今回分裂酵母で判明した Rec10 の Hop1, Rec15 との相互作用領域は二次構造上 Red1, SYCP2 と類似性が高く(図 6A)、Rec10, Hop1 との結合に必要な Rec15 の C 末端の配列も種間で保存性があることから、三者の結合による軸とホットスポットの相互作用も種を超えて保存されている機構である可能性が示唆される(図 7)。

図 7 軸とホットスポット相互作用の保存性

