

減数分裂期において DNA の交換反応が高頻度で起きる仕組み

—減数分裂期の染色体機能部位におけるプロテインプロファイリング—



篠原 彰

大阪大学 蛋白質研究所 教授

1. 私が知りたかったこと

減数分裂期では DNA 上で起こる生化学反応が染色体構造変化と密接に連携している。中でも染色体分配に必要な物理的結合を作り出す相同組換えは体細胞分裂期と大きくことなり、空間的に“遠く”離れた相同染色体間の入れ換えを行う。この減数分裂期の組換えの特異性の分子メカニズムを理解するためには減数分裂期の組換えに関わる蛋白質やその複合体を同定する事が重要である。特に DNA の相同性を探す反応には RecA ホモログ Rad51, Dmc1 の 2 つが、減数分裂期の組換えに機能するのが大きな特徴であり、これら蛋白質が作り上げる構造体の構築、機能、さらには形成反応の詳細な分子メカニズムを知りたいと考えている。

2. 研究の狙い

精子、卵子と言った配偶子形成は個体を再生すると言う点において生命の根幹を成す反応である。配偶子形成ににおいて、減数分裂はゲノムを半減する役目を担っている。配偶子は父母由来のゲノムを混ぜ合わせる事で、ゲノムの多様組み合わせのプールを産み出し、進化を進める大きな力になる。相同組換えと呼ばれる DNA 鎖の交換反応が減数分裂期のゲノムの再編を司る。減数分裂期の相同組換えは体細胞分裂期の反応とは異なっている。特に、体細胞分裂期では空間的に“近い”姉妹染色体間で組換えが起こるのに対して、減数分裂期は空間的に“遠い”相同染色体間で起こる事が知られている。このような組換えの特異性は減数分裂期特異的な蛋白質群により産み出されると考えられるが、その詳細は不明な点が多い。特に、DNA 間の相同鎖検索反応には体細胞分裂期型の RecA ホモログ Rad51 に加え、減数分裂期型の Dmc1 が必要であり、その 2 つの蛋白質の協調的な働きが特異性を産み出すと考えられている。これまでに体細胞分裂期における、Rad51 の DNA への集合反応は詳細に解析されているが、Dmc1 (Rad51 を含む) 複合体の形成経路はほとんど把握されていなかった。本研究は減数分裂期の組換えの特異性を作り出している 2 つの RecA ホモログ Rad51 と Dmc1、

特に Dmc1 の機能とそれを含む複合体の構成要素の同定、染色体上のこれら蛋白質複合体の形成経路の分子レベルでの解明を目指している。

3. 結果

減数分裂期特異的な RecA ホモログ Dmc1 と一緒に働く因子を探すために、酵母の減数分裂期特異的な発現のデータベースあるいは、機能ゲノミックスのデータベースを使い、減数分裂期特異的な RecA ホモログ Dmc1 と発現パターンが同じで、かつ変異株の表現型が似ているものを選び出した。検索の結果、減数分裂期特異的に発現する 2 つの遺伝子、MEI5、SAE3 が候補として残り、その変異株の詳細な解析を行った。その結果、これらの変異株は減数分裂期に特異的に染色体の特定部位に導入される DNA 2 重鎖切断(double-strand breaks; DSB)の修復に欠損を持つ事から、組換えに関与することが明らかになった。さらに、これらの変異株では Rad51 の染色体への結合は正常であるが、Dmc1 の染色体への結合に欠損を持つ事が分かった (図 1)。

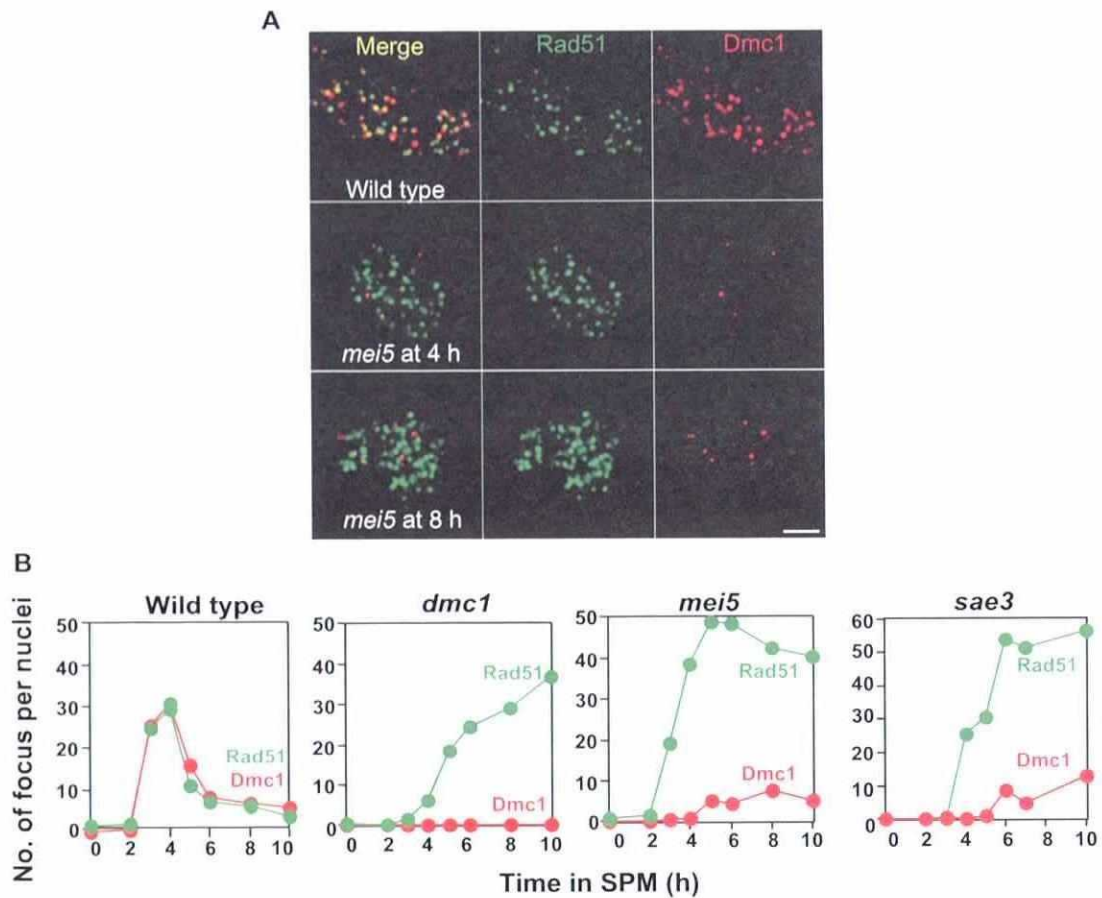


図 1 *mei5*, *sae3* 変異株での Rad51 と Dmc1 の染色体への局在

(A) 間接蛍光抗体法により野生型、*mei5* 変異株における Rad51, Dmc1 の染色体上の局在を調べた。

(B) 野生型、各変異株における Rad51, Dmc1 foci 形成のキネテックス

クロマチン免疫沈降法により、組換えのホットスポットへの Dmc1 の結合が低下していることも確認出来た。つまり、Mei5, Sae3 蛋白質は減数分裂期特異的 RecA ホモログ Dmc1 を DSB 部位に呼び込む働きを持つと考えられる。Mei5, Sae3 蛋白質共、染色体上で Rad51 や Dmc1 と組換えが起こる時期に共局在する (図 2)。

興味深い事に Dmc1 が欠損した変異株では Mei5, Sae3 の染色体の結合が見られない。つまり、Dmc1, Mei5, Sae3 は相互依存的に染色体に結合することが分かり、この 3 者が複合体として機能する事を強く示唆している。実際に、Dmc1-Mei5, Mei5-Sae3 の間での相互作用が免疫沈降あるいは 2-ハイブリッド法で確認出来た。Mei5-Sae3 複合体を精製した所、安定な複合体として精製出来、DNA に強く結合する活性を有している事が分かった。また、ヒトやマウスにおいて、Mei5, Sae3 の相同遺伝子も同定出来た。

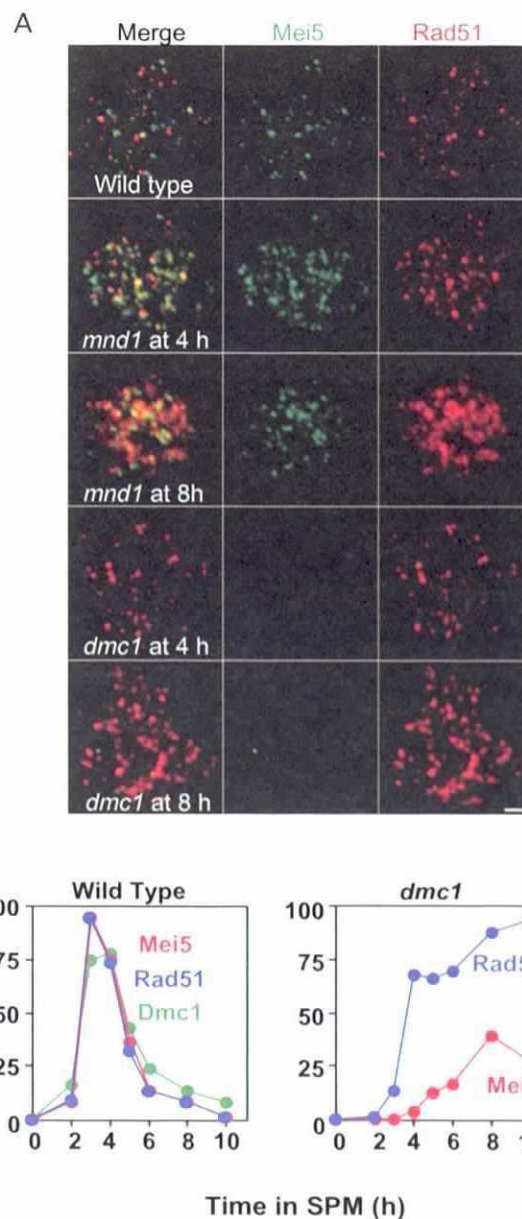


図 2 Mei5 蛋白質の染色体への局在

- (A) 野生株において、Mei5 と Rad51 の局在を間接蛍光抗体法で調べた。
- (B) 野生型、*dmc1* 株における Rad51, Mei5 foci 形成のキネテックス

4. 考 察

上記の結果から、減数分裂期の組換えは Dmc1 単独で行うのではなく、Dmc1-Mei5-Sae3 複合体が DNA 上に大きな超分子マシナリーを形成し、相同鎖検索反応を行うと考えられる

(図3)。減数分裂期の組換えの大きな特徴は空間的に“遠く”離れている相同染色体間で起こる事であり、この蛋白質複合体が体細胞分裂型の Rad51 複合体より、効率よく“遠い”DNA 間の相同鎖検索反応を行う能力に優れていると考えられる。このような複合体を強制発現させる事で、ヒト細胞等でのジーンターゲットイングの効率を上昇することが可能かもしれない。また、Mei5, Sae3 のヒトホモログは不妊の原因遺伝子の候補になるとも考えられ、高等真核生物でのさらなる解析が期待できる。

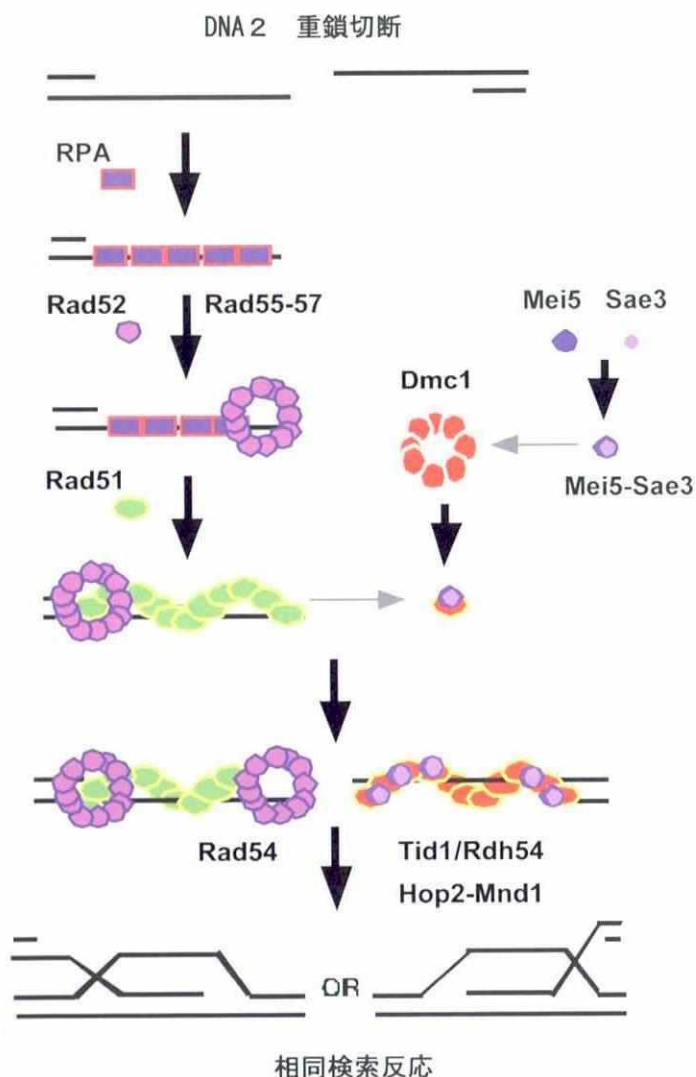


図3 減数分裂期組換えにおける Rad51-Dmc1 複合体形成経路

Dmc1-Mei5-Sae3 複合体が Rad51 複合体と共役する事で、Rad51-Dmc1 の非対称分布が確立し、相同鎖検索反応を行うと考えられる。

参考文献

1. Hayase, A., Takagi, M., Miyazaki, T., Oshiumi, H., Shinohara, M. and A. Shinohara. A conserved complex containing Mei5 and Sae3 promotes the assembly of the meiosis-specific homolog Dmc1. **Cell**, in press.
2. Miyazaki T., Bressan, D.A., Shinohara, M., Haber, J.E. and A. Shinohara. *In vivo* assembly and disassembly of Rad51 and Rad52 complexes during double-strand break repair. **EMBO. J.** 23, 939-949, 2004.
3. Yamashita, K., Shinohara, M. and A. Shinohara. Rad6-Bre1-mediated histone H2B ubiquitylation modulates the formation of double-strand breaks during meiosis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 101, 11380-11385, 2004.
4. Tsukamoto, M., Yamashita, K., Miyazaki, T., Shinohara, M. and A. Shinohara. The N-terminal DNA binding domain of Rad52 promotes *RAD51*-independent recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, 165, 1703-1715, 2003.
5. Shinohara, M., Sakai, K., Ogawa, T. and A. Shinohara. Mitotic DNA damage checkpoint proteins Rad17 and Rad24 promote repair of double-strand breaks during meiosis. **Genetics**, 164, 855-865. 2003.