

研究課題別評価

1 研究課題名: 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

2 研究者氏名: 篠原 彰

3 研究の狙い:

精子、卵子といった配偶子形成は個体を再生するとい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。減数分裂期の組換えの欠損は不妊症やダウン症に代表される異数体病を引き起こす。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。減数分裂期組換えに関わる新規因子を同定するために、組換えの部位を精製する系を確立する事、また、酵母のゲノミックスの情報を使い、未知の遺伝子を網羅的に解析する事で、RecA ホモログの機能に関わる新規遺伝子を同定する事を試みる。このような解析を通じて、減数分裂期の組換えの分子機構の解明を目指す。

4 研究成果:

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。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な 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存する。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。

5 自己評価:

当初の目的とする減数分裂期の組換えに関わる新規遺伝子の同定と機能解析といった点においては、前述の通り、新規複合体 Mei5-Sae3 を同定し、その解析結果を論文として発表した(Cell,

2004)ことから、目的を達成出来たと言える。一方、この研究の柱の1つである、染色体機能部位の精製法の確立にはもう少しの努力と時間を必要とすると考えている。本研究の大きな特色は博士研究員のような人的支援が受け入れる事が可能な点であるが、研究員の人選の困難さ(短期契約の難しさ)と研究員の出入りが激しかったため、そのシステムを十分に活かされなかった事にも起因しているかもしれない。そういった問題点があったにも関わらず十分な業績を上げ、この分野の研究の進展に多大な貢献をしたと断言出来る。

6 研究総括の見解:

減数分裂の機構解明に一つのブレークスルーをもたらしたことは高く評価したい。この分野の重要性は高まっており、研究はこれからである。今後の展開を期待する。発表論文の質は高い。

7 主な論文等:

論文

1. Shinohara, M., Sakai, K., Shinohara, A. and D. K. Bishop.
Crossover interference in *Saccharomyces cerevisiae* requires a *TID1/RDH54*- and *DMC1*-dependent pathway.
Genetics, 163, 1273-1286. 2003.
2. 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.
3. 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.
4. 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.
5. Zierhut, C., Berlinger, M., Rupp, C. Shinohara, A. and F. Klein.
Mnd1 is required for meiotic inter-homolog repair.
Current Biology, 14. 752-762, 2004.
6. 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.
7. Hayase, A., Takagi, M., Miyazaki, T., Oshiumi, H., Shinohara, M. and A. Shinohara.
A protein complex containing Mei5 and Sae3 promotes the assembly of the meiosis-specific homolog RecA Dmc1.
Cell, 119. 927-940. 2004.

総説

1. Shinohara, A. and M. Shinohara.
Roles of RecA homologues Rad51 and Dmc1 during meiotic recombination.
Cytogenetics and Genome Research, 107, 201-207. ,2004.
2. 篠原 彰, 篠原美紀

染色体上での DNA 鎖交換反応-相同組換えの分子メカニズムと細胞機能
細胞工学 Vol. 22, 278-282, 2003.

□頭発表

国際学会(招待 3件)

国内学会(招待 3件)