

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06784

研究課題名(和文) 多重ヌクレース複合体による新規なゲノム統合性維持機構

研究課題名(英文) Novel machinery of maintenance of genomic integrity by multinuclease complexes

研究代表者

齋藤 貴宗 (Saito, Takamune)

近畿大学・生物理工学部・講師

研究者番号：60741494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ファンコニ貧血原因遺伝子SLX4の線虫ホモログであるhim-18のサプレッサー変異の同定を試み、6-7の候補まで絞り込みに成功した。HIM-17はDNA二重鎖切断を染色体腕部に導入し、腕部での交差を促進する機能または染色体中央部での交差形成を抑制する機能があることを明らかにした。また、HIM-17がリン酸化酵素と脱リン酸化酵素の染色体局在を制御する事で第一減数分裂の正確な相同染色体分配に機能する事が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

him-18/SLX4のサプレッサー変異は国内外でも同定されておらず、候補が6-7遺伝子に絞り込まれたことは意義のある成果といえる。今後の展望としては、候補遺伝子の一つに絞り込み、患者の細胞を用いてファンコニ貧血治療への応用を探る事になる。

交差分布の制御機構に関して、制限酵素処理を省く事ができる実験系を確立でき、大幅な手間と時間の短縮に貢献した。him-17変異体では、ヒストンH3K9のジメチル化が減少し、DNA二重鎖切断の染色体腕部への偏りが解除された。結果として交差分布が染色体中央にシフトした事は、染色体のエピジェネティックな変化が交差分布に影響を与えている事を示したと言える。

研究成果の概要(英文)：We tried to identify the suppressor mutations for him-18, which is a *C. elegans* homolog of the Fanconi anemia gene SLX4. We succeeded to narrow down the candidates to seven genes in the strain #249 and six genes in the strain #296. The amount of DNA double-strand breaks was reduced in him-17 mutants and they localized even in the central region of chromosomes. Crossover distribution is limited to the one of the arm regions of chromosomes in wild-type. Crossover distribution shifted to the central region of the chromosome in him-17 mutants. From those results, it was clarified that HIM-17 has a function of inducing DNA double-strand breaks among the chromosome arms and promoting crossover in the arm regions and suppressing crossover in the central region of the chromosomes. We also clarified that HIM-17 functions for accurate chromosome segregation during meiosis I by regulation of the chromosomal localization of the kinase and the phosphatases.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：減数分裂 線虫 ファンコニ貧血 交差型組換え

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内の DNA は内定および外的要因により、1 日あたり 100 万箇所も損傷している。DNA 修復が異常になると癌やファンコニ貧血などの疾患の原因になる。申請者は 2009 年に線虫の減数分裂組換えの研究を通してファンコニ貧血の原因遺伝子 *him-8/SLX4* を同定した。*HIM-18* は 3 種のヌクレエース *SLX-1*、*XPF-1*、*MUS-81* と結合し、減数分裂組換えや種々の DNA 修復への関与が解析され始めていた。中でも交差型組換えや DNA 修復の中間体として知られる Holliday Junction の分岐点をカットする新規な Holliday Junction resolvase として注目されていた。線虫においては交差型組換えの分布は染色体腕部のどちらかに一回限定的に生じる事が知られているが、予想に反して、多重ヌクレエース複合体の構成因子の一つである *SLX-1* の変異体では予想に反して染色体中央でも腕部と同等の割合で交差が検出された。染色体腕部ではヒストン H3K9 のジメチル化や豊富に存在し、染色体中央ではヒストン H3K4 のトリメチル化が豊富に存在する事が知られており、交差の起こりやすい染色体領域は、H3K9me2 の分布域に一致する。これらのことは *SLX-1* やクロマチン修飾因子が交差の分布制御に機能することを予見させる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*HIM-18/SLX4* 多重ヌクレエース複合体を中心とした DNA 修復機構を解明することにより、癌やファンコニ貧血などの染色体異常疾患や不妊症の治療に役立てる事である。体細胞での DNA 修復機構を *him-8/SLX4* のサプレッサー変異体の取得、原因遺伝子の同定、分子機構の解明を行う。また生殖細胞での DNA 修復機構として、減数分裂組換えにフォーカスし、交差型組換えの分布の制御機構を調べる。

3. 研究の方法

(1) 線虫(*C.elegans*)を用いた *him-18* のサプレッサー変異体の取得のため、*him-18* のヘテロザイゴートに対してエチルメタンスルホン酸(EMS)で点変異をランダムに起こさせた。300 匹の *him-18;X*(*X*は新たに導入されたサプレッサー変異の候補)ダブルヘテロザイゴートを単離し、次世代のダブルホモザイゴートの表現型を解析した。第一減数分裂前期のデアキネシスにおける染色体の形状の観察、胚性致死率を *him-18* single 変異体と比較し、2 系統のサプレッサー変異体を同定した。

(2) 減数分裂期の交差型組換えの分布の制御を解析するため、新規の交差の測定法を確立した。従来の方法は、Bristol 由来の線虫と Hawaii 由来の線虫の SNP の違いを利用した genotyping であり、PCR 産物の制限酵素処理が必須であった。申請者は SNP の代わりに 20-50bp の small deletion site をゲノムから選抜し、PCR だけで染色体の由来の判断を可能にした。染色体の両末端と左腕、中央、右腕の境界領域に位置する small deletion site で PCR する事により、染色体左腕、中央、右腕でのそれぞれの交差頻度を測定することができる。

4. 研究成果

(1) EMS mutagenesis の結果、2 系統の *him-18* サプレッサーおよび、11 系統のエンハンサー変異体が単離できた。それぞれの系統の全ゲノムシーケンスの結果、1 系統につき、30-100 程度のホモ変異が検出された。サプレッサーの 2 系統は #249 が七つの候補、#296 が六つの候補まで絞り込みが進み、新規因子の同定まであと少しである。またエンハンサー変異の候補として新規カイネースを同定しており、胚性致死率や DNA ダメージを誘導する薬剤への耐性試験など表現型解析を進める。

(2) 減数分裂組換えの分布制御の解析にあたり、ヒストン H3K9 のジメチル化に働くジンクフィンガータンパク *HIM-17* の変異体の解析を行った。まず、*him-17* 変異体では DNA 二重鎖切断の量が減少した。野生型では交差の分布は染色体腕部に限定的であるが、Bristol/Hawaii のハイブリッドを用いた交差分布の測定によって、*him-17* 変異体では交差分布が染色体中央にシフトした。これらの結果から、*HIM-17* は DNA 二重鎖切断を染色体腕部に導入し、腕部での交差を促進する機能または染色体中央部での交差形成を抑制する機能があることを明らかにした。また、野生型では二価染色体の分裂面に限局するオーロラカイネースホモログ *AIR-2* が *him-17* 変異体では染色体全域に局在した。野生型では *AIR-2* の限局は、脱リン酸化酵素 *GSP-1/2* に依存するが、*him-17* 変異体では *GSP-1/2* の発現が低く抑えられ、染色体へのロード量も減少した。これ

らの結果から、HIM-17 は GSP-1/2 依存的に AIR-2 を二価染色体分裂面に限局させる事が明らかとなった。

him-18/SLX4 のサプレッサー変異は国内外でも同定されておらず、候補が 6-7 遺伝子に絞り込まれたことは意義のある成果といえる。今後の展望としては、候補遺伝子を一つに絞り込み、患者の細胞を用いてファンconi貧血治療への応用を探る事になる。

交差分布の制御機構に関して、制限酵素処理を省く事ができる実験系を確立できたことは今後の大量のサンプル解析において大幅な手間と時間の短縮に貢献した。him-17 変異体では、ヒストン H3K9 のジメチル化が減少し、DNA 二重鎖切断の染色体腕部への偏りが解除された。結果として交差分布が染色体中央にシフトした事は、染色体のエピジェネティックな変化が交差分布に影響を与えうる事を示したと言える。今後の展望としては、H3K9 のジメチル化を完全に消失させることのできる線虫変異体を用いて、交差分布の検証を行う事になる。

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 Saravanapriah Nadarajan, Elizabeth Altendorfer, Takamune T. Saito, Marina Martinez-Garcia and Monica P. Colaiacovo	4. 巻 118
2. 論文標題 HIM-17 regulates the position of recombination events and GSP-1/2 localization to establish short arm identity on bivalents in meiosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA	6. 最初と最後の頁 e2016363118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.2016363118	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 Wang SY, Mao H, Shibuya H, Uzawa S, O'Brown ZK, Wesenberg S, Shin N, Saito TT, Gao J, Meyer BJ, Colaiacovo MP, Greer EL	4. 巻 15
2. 論文標題 The demethylase NMAD-1 regulates DNA replication and repair in the <i>Caenorhabditis elegans</i> germline.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1008252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1008252	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14件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 山本航暉, 齋藤貴宗
2. 発表標題 SLX-1は染色体中央領域で交差型組換えを抑制する
3. 学会等名 関西地区線虫勉強会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南寛仁, 齋藤貴宗
2. 発表標題 線虫の性染色体対合による常染色体交差の転換機構
3. 学会等名 関西地区線虫勉強会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 南寛仁, 山本航暉, 齋藤貴宗
2. 発表標題 線虫の性染色体対合異常による常染色体交差の転換機構
3. 学会等名 第39回染色体ワークショップ、第19回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤貴宗, Saravanapriah Nadarajan, Elizabeth Altendorfer, Marina Martine-Gracia, Monica P. Colaiacovo
2. 発表標題 線虫HIM-17による第一減数分裂前期の二価染色体形成機構
3. 学会等名 第39回染色体ワークショップ、第19回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 南寛仁, 山本航暉, 齋藤貴宗
2. 発表標題 線虫の性染色体対合異常による常染色体交差の転換機構
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kyosuke Torimaru, Karin Matsushita, Takamune T. Saito
2. 発表標題 Meiotic roles of FANCM-related helicases in <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 23rd International <i>C. elegans</i> Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 納家朋里、齋藤貴宗
2. 発表標題 ヒストンH3K9メチル化酵素の減数分裂組換えでの役割
3. 学会等名 関西地区線虫勉強会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寄本優斗、齋藤貴宗
2. 発表標題 ホリデイジャンクション解離酵素SLX-1による交差型組換え抑制機構の解明に向けて
3. 学会等名 関西地区線虫勉強会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤貴宗
2. 発表標題 HIM-17 regulates the remodeling of bivarents during meiosis
3. 学会等名 関西地区線虫勉強会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 齋藤貴宗、Hussam Alshareef、南寛仁、荒谷祥、Monica Colaiacovo
2. 発表標題 ホリデイジャンクションリゾルベースhim-18/SLX4のエンハンサー/サブレッサースクリーニング
3. 学会等名 第25回DNA複製・修復・組換えワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鳥丸恭佑、齋藤貴宗
2. 発表標題 Meiotic functions of dicer-related helicase
3. 学会等名 関西地区線虫勉強会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 南寛仁、齋藤貴宗
2. 発表標題 An enhancer/suppressor screening of mutants of a Holliday junction resolvase
3. 学会等名 関西地区線虫勉強会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takamune T. Saito, Hussam Alshareef, Hirohito Minami, Sho Aratani, Dan Pagano, Scott Kennedy, Monica P. Colaiacovo
2. 発表標題 An EMS mutagenesis screen identified both enhancer and suppressor mutants of him- 18/slx4 in <i>C. elegans</i>
3. 学会等名 22nd International <i>C. elegans</i> Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤貴宗, Saravanapriah Nadarajan, Elisabeth Altendorfer, Marina Martinez-Garcia, Monica Colaiacovo
2. 発表標題 線虫HIM-17は第一減数分裂の二価染色体の形成を制御する
3. 学会等名 第26回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
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	コライアコヴォ モニカ (Colaiacovo Monica)		

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			
英国	University of Dundee	University of Edinburgh		
米国	Harvard Medical School	Children's Hospital Boston	University of California, Berkeley	他1機関