

細胞周期 checkpoint 制御の研究

Studies of the control of cell-cycle checkpoint

研究代表者 東北大学 遺伝生態研究センター 助教授 東谷 篤志
Institute of Genetic Ecology, Tohoku University
Atsushi HIGASHITANI

To study the checkpoint control of meiosis and DNA repair process, an ATM-like gene *Ce-atl-1* and a *recA*-like gene *Ce-rdh-1* were isolated and were characterized in the *Caenorhabditis elegans*. The results of repression of each gene by RNA interference indicated that *Ce-atl-1* was essential for cell cycle controls of meiosis and mitosis, and *Ce-rdh-1* involved in meiotic recombination was essential for meiotic progression.

1. 研究目的

遺伝子 DNA が紫外線や放射線、変異原物質などで傷つけられたとき、細菌からヒトに至るまで全ての生物は、細胞周期を一時的に停止させ、それら DNA 損傷を修復する機構を保持していることが明らかにされてきた。また DNA 複製が完全に終了するまで次の分裂期に移行しない厳密な制御機構を、細胞は有している。DNA の損傷を修復することなしに、また DNA 複製を完全に終えることなしに、細胞増殖を続けると、娘細胞に突然変異が蓄積し癌化や細胞死へとつながる。

また、有性生殖を行う生物の配偶子形成に必須の減数分裂過程は、減数分裂前 DNA 複製から 2 回の連続した分裂により半数性細胞をつくり出す過程である。この複製から分裂終了までに要する時間は、一般の体細胞分裂より長く、酵母でも約 10 時間、高等植物や動物では約 3 日から 2 週間、さらにヒトなど哺乳類の雌では何十年も減数分裂の前期に留まっていることが知られている。特に第 1 分裂の前期

は、体細胞分裂時に比べ、特徴的かつ複雑な核、染色体の動きが観察され、倍加した染色体の凝縮、相同染色体間での対合、シナプトネマ構造の形成、相同染色体間の遺伝子組換え、キアズマ形成などが知られている。

そこで本研究においては、これらの体細胞分裂周期ならびに減数分裂過程を制御する仕組み (checkpoint control) を分子レベルで調べる試みについて、線虫 (*Caenorhabditis elegans*) を用いて研究を展開した。

2. 研究経過

近年の酵母を用いた遺伝学的研究を中心に、checkpoint control に関わる遺伝子 *MEC1* が同定された。この遺伝子は以前分離されていた減数分裂過程が進行しなくなる 1 つの変異 *ESR1* と同じ遺伝子座であることがわかった。さらにその酵母 *MEC1/ESR1* 遺伝子は、ヒトの 1 遺伝病の変異原因の遺伝子 (ataxia telangiectasia

mutated gene: *ATM*) と相同性があることが示された。すなわち、チェックポイント制御の機構は、酵母からヒトに至るまでの真核生物において、分子レベルでの保存性が認められたわけである。ヒトにおける AT (ataxia telangiectasia) 疾患の患者は、運動神経障害のほか、免疫不全、高頻度に白血病などのガンを誘発、さらに生殖細胞不全など多面的な影響が認められ、すなわち遺伝子の組換えや修復が結果的にうまく出来ず、またその現象は体細胞のみならず配偶子形成過程にも関わることが示された。

そこで全ゲノム配列の解析が完了した線虫で、*ATM* や *MEC1/ESR1* にみられる共通なアミノ酸配列を用いて、線虫における相同的遺伝子の検索を行った。

また、DNA 損傷の組換え修復ならびに減数分裂過程の遺伝子組換えに関わる真核生物の大腸菌 *recA* 様遺伝子についても、線虫を用いて解析を行った。

3. 研究成果

3-1 線虫の *ATM* 様遺伝子 *Ce-atl-1*

線虫の全ゲノム配列から、1つの構造的に良く似た遺伝子 (*Ce-atl-1*: *C. elegans ATM* like 1 と命名) が見いだされ、全 cDNA 塩基配列 (7711bp) の決定を行った。その cDNA から予想される遺伝子産物は 2514 アミノ酸残基からなり、C 末端には *ATM* や *MEC1/ESR1* と同様に PI-3 キナーゼモチーフを持っていた。遺伝子機能を調べる目的で、試験管内で *Ce-atl-1* の 2 本鎖 RNA を合成し、雌雄同体の若い成虫にマイクロインジェクション

した (RNAi) 結果、その後代における表現型は、卵の初期発生で異常となり孵化しない卵致死、幼虫 L1、L2 期での致死、成虫にはなるが生殖腺が異常になる、排卵器官における奇形、など様々な組織での奇形や致死の変異、生殖細胞の不全が観察された (図 1)。また高頻度に雄個体 (XO) の産出が認められた。

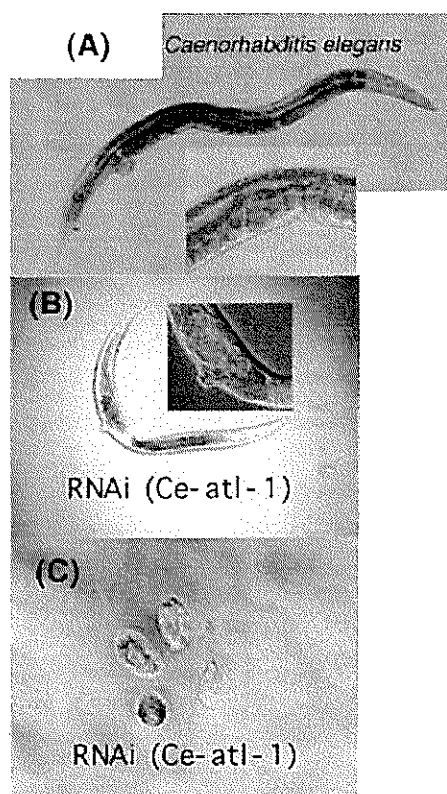


図 1 *Ce-atl-1* 遺伝子の RNAi 効果. (A) 雌雄同体野生型の線虫 (control)、(B) *Ce-atl-1* の RNAi を行った F1 個体の奇形と (C) 卵致死と初期幼虫致死。

これらの結果から、*Ce-atl-1* は必須な遺伝子で染色体の分離分配、遺伝子の変異などにも関わり、機能的にも *ATM* や *MEC1/ESR1* に類似の線虫における分裂周期のチェックポイント制御に関わる相同遺伝子であること

が示唆された。また、その遺伝子は生殖腺で強く発現することが確認された。以上の成果を現在論文として投稿中である (1)。

3-2 線虫の *recA* 様遺伝子 *Ce-rdh-1*

これまで、酵母からヒトに至る真核生物において、遺伝子組換えに関わる *recA* 様遺伝子は、*DMC1/LIM15* タイプと *RAD51* タイプの 2 種類が各々存在し、前者は減数分裂細胞で特異的に、後者は体細胞と減数分裂細胞の両方において発現し、これらは減数分裂過程での遺伝子組換え機構に深く関与していることが報告されている。*RAD51* はその名前からもわかるように、放射線(radiation)感受性の突然変異として酵母からはじめ分離され、DNA 損傷時の組換え修復過程においても重要な働きをすることが示された。

しかしながら、線虫の全ゲノム配列を検索すると、1つの *recA* 様類似遺伝子しか見いだせない。その cDNA クローン(yk401c3: 国立遺伝学研究所の小原博士より供与)の塩基配列を決定したところ、予想される遺伝子産物は 357 アミノ酸残基からなり、マウスの *Rad51*(*MmRAD51*)と 59.2%、*Dmcl1*(*MmDMC1*)と 50.7%の同一アミノ酸配列を示した。真核生物の *recA* 様遺伝子に保存されている 2箇所のコレオチド結合配列も確認できた。これまでに報告されている幾種かの *DMC1/LIM15* タイプと *RAD51* タイプとのアミノ酸配列をもとに系統関係を比較すると、この線虫の遺伝子は両タイプの間中間的な位置に、はなれて分類された。そこで、この遺伝子を *Ce-rdh-1* (*C. elegans* *RAD51*,

DMC1/LIM15 homolog 1)と命名することとした。

Ce-rdh-1 の遺伝子機能を調べる目的で、RNAi を行った結果、F1 後代の卵の約 80%が初期発生過程で異常となり孵化しない、卵致死となった。また残り 20% は、みかけ正常な成虫まで発生したが、その虫の卵(F2 世代)は、100% 初期発生で異常な卵致死となった。この F1 において成虫まで育ったものは、RNAi の効果が転写産物を抑制するので、すでに *Ce-rdh-1* の遺伝子産物を保持していた個体で、その抑制効果が働かず、次世代(F2)で影響が表れた *escaper* と考えられる。*escaper* がみかけ正常な成虫にまで生育し、その卵が致死であることから、この遺伝子は配偶子形成に関与する必須遺伝子であると予想された。

そこで次に、F1 *escaper* の卵母細胞における減数分裂期の染色体像の観察を行った。線虫 *C. elegans* の卵母細胞における核は、減数第一分裂前期のデアキネシス期で停止し、2価染色体がもっとも凝縮した状態にある(図 2: 4n の常染色体が 5、4n の性染色体が 1 の合計 6 本が観察される)。しかしながら、F1 *escaper* においては、この凝縮がみられず形態的に異常で、からみあったり、ちぎれたような染色体像が観察された(図 2) (2)。

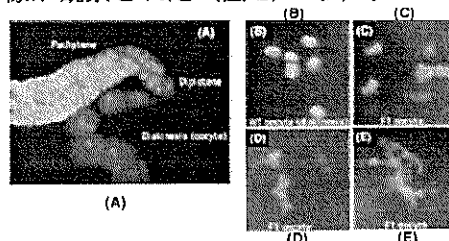


図 2 *Ce-rdh-1* 遺伝子の RNAi 効果。(A)雌雄同体野生型の線虫の生殖腺の DAPI 染色像。(B)野生型の卵母細胞の核染色体像。(C~E) *Ce-rdh-1* の RNAi を行った F1 個

体にみられる異常な卵母細胞の核染色体像。

Ce-rdh-1 遺伝子の発現は、生殖腺特異的遺伝子 *gld-1*(germ line development - 1)と良く似た発現パターンを示し、成虫にかけて転写が上昇すること、ならびに *in situ* hybridization の結果、生殖腺の減数第1分裂前期の細胞においてその遺伝子発現が高く観察された(図3)。

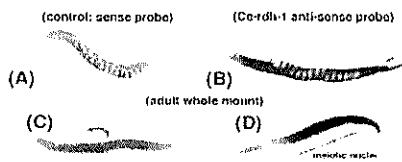


図3 *Ce-rdh-1* 遺伝子の *in situ* hybridization による発現解析。

(A) control probe (sense 鎖)による whole mount hybridization と(C) 切り出した生殖腺、(B) *Ce-rdh-1* 遺伝子の anti-sense 鎖による whole mount と(D)生殖腺。図中の黒い部分が高い遺伝子発現を示す。

以上の結果から、*Ce-rdh-1* は、線虫における減数分裂細胞で特異的に、遺伝子組換えに関わる *DMC1/LIM15* タイプの *recA* 様遺伝子により類似しているものと考察された。

4. 今後の課題と発展

現在、上記の *Ce-atl-1* と相互作用する遺伝子群を酵母の two-hybrid 系を用いて検索を始め、特に減数分裂周期のチェックポイント制御機構に働く新規分子の同定を目指している。また *recA* 様遺伝子に関しては、酵母からヒトに至まで2種類 *RAD51* と *DMC1/LIM15* とのタイプがそれぞれ存在するが、線虫においては上記の *Ce-rdh-1* の1つだけである。また *Rad51* と複合体を形成することが知られている *Rad52* の相同遺伝子も、

線虫の全ゲノム配列上にはみいだせない。すなわち、線虫では *Rad51/52* によるDNA損傷時の組換え修復酵素群 (*Rad52* epistasis group) をその進化の過程で失ったのか、または1つの *recA* 様起源遺伝子が遺伝子重複により *RAD51*、*DMC1/LIM15* に機能分化する進化の過程で、この遺伝子重複が起こらなかったのか、2つの理由が考えられ、進化遺伝学的にも大変興味深い問題を提起すると思われる(3)。今後はこれらの課題について、より深く研究をすすめて行きたい。

これらの研究は、かずさDNA研究所の佐藤修正研究員、国立遺伝学研究所の桂勲教授、石原健助手、東京大学の前田郁麻氏、ならびに私の所属研究室の青木秀年氏、高浪タカ子氏、高橋秀幸教授のご協力を頂き展開した結果である。この場を借りてこれら共同研究者に深くお礼申し上げる。また研究助成を頂き研究が展開できたこと、日産科学振興財団に厚く感謝する。

5. 発表論文リスト

1. Characterization of an ATM-like gene *Ce-atl-1* in *Caenorhabditis elegans*. Aoki H, Sato S, Ishihara T, Katsura I, Takahashi H and Higashitani A. (論文投稿中)
2. Characterization of a *Caenorhabditis elegans* *recA*-like gene *Ce-rdh-1* involved in meiotic recombination. (1998) Takanami T, Sato S, Ishihara T, Katsura I, Takahashi H and Higashitani A. DNA Res. 5 373-377.
3. Absence of several key enzymes of *RAD52* epistasis group in *Caenorhabditis elegans*. Higashitani A, Takanami T, Aoki H, Takahashi H. (論文投稿中)