

ショウジョウバエ初期胚で起こる同調的核分裂における RecQ5 の役割

桜井 晴奈

Role of RecQ5 in Syncytial Blastoderm of the *Drosophila* Embryo

Haruna SAKURAI

Department of Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Science, Setsunan University,
45-1 Nagaotoge-cho, Hirakata, Osaka 573-0101, Japan

(Received May 31, 2011)

RecQ5 belongs to the family of RecQ DNA helicases. There are 5 RecQ homologs in mammals, and defects in 3 of them (BLM, WRN, and RECQL4) give rise to cancer predisposition syndromes in humans. Although no human disease has yet been genetically linked to a mutation in RecQ5, this enzyme is thought to have unique functions, based on its ubiquitous expression profile and specific C-terminal amino acid sequence, both of which are very different from those of other RecQ DNA helicase family members. The analysis of MEF and ES cells derived from RecQ5-deficient mice investigated by Hu *et al.* suggested an important role for RecQ5 in the DNA metabolism of the early embryo. However, it is unknown how RecQ5 deficiency destabilizes DNA. To address the DNA instabilities in RecQ5-deficient animals, we chose *Drosophila melanogaster* which has simple checkpoint systems in its syncytial embryos. By analyzing *Drosophila* syncytial embryos, we demonstrated that the loss of RecQ5 increased the frequency of spontaneous mitotic defects such as anaphase bridge formation. A pair of daughter nuclei that had been linked by such DNA bridges was simultaneously eliminated *via* a Chk2-dependent pathway. These findings suggest that the lack of RecQ5 causes spontaneous double-strand DNA breaks. RecQ5 may thus function in the resolution of anaphase DNA bridges during mitosis in syncytial embryo.

Key words—RecQ5; *Drosophila* embryo; syncytial blastoderm; chromosome segregation

1. はじめに

RecQ は DNA ヘリカーゼの 1 種であり、ゲノム中に存在する二本鎖切断を修復する機構に関与する分子として 1985 年に中山らによって大腸菌から単離された。¹⁾ RecQ は原核生物から真核生物に至るまで幅広く保存されており、生物が高等になるとともにそのファミリー分子の数も増加する。ヒトには 5 種類のファミリー分子 (RecQL1, BLM, WRN, RecQL4, RecQL5) が同定されており、このうち BLM, WRN, RecQL4 はそれぞれブルーム症候群、ワーナー症候群、ロスモンド・トムソン症候群といったゲノム不安定化を特徴とする遺伝性疾患の原因遺伝子として報告されている。²⁻⁴⁾ 一方、残りの 2 種は遺伝性疾患との関連が報告されておらず、機能

の解明も進んでいない。筆者らはショウジョウバエをモデル生物として用い、ヒト RecQL5 のショウジョウバエホモログである RecQ5 の機能解明を試みている。本稿では、RecQ5 に関するこれまでの報告を概説するとともに、筆者らがこれまでに得た知見^{5,6)}を紹介する。

2. RecQ5 とは

前述した通り、RecQ は進化の過程でよく保存された DNA ヘリカーゼであり、特に 1998 年に嶋本らによって同定された RecQ5 は、大腸菌からヒトに至るまで多くの種に保存されている。⁷⁾ RecQ5 は、少なくともマウス及びショウジョウバエでは生命維持に必須ではない^{5,8)}が、他の RecQ ファミリー分子とは異なる C 末端領域を持つことから独特の機能を有すると考えられている。RecQ5 を欠損させたマウス胎児線維芽細胞及び胎性幹細胞のゲノム DNA には姉妹染色分体交換が増加することから DNA の損傷が増加していると考えられ、⁹⁾ RecQ5 が胚時期のゲノム DNA を損傷から守る働きを持つ

摂南大学薬学部生化学研究室 (〒573-0101 大阪府枚方市長尾峠町 45-1)

e-mail: sakurai@pharm.setsunan.ac.jp

本総説は、平成 22 年度日本薬学会近畿支部奨励賞 (生物系薬学) の受賞を記念して記述したものである。

のではないかと注目されている。

3. ショウジョウバエ初期胚における RecQ5 の役割

3-1. RecQ5 を欠損させた初期胚には細胞周期の同調性から外れた核が多く出現する ショウジョウバエは遺伝学研究のみならず、発生研究、疾患研究と幅広い分野で汎用されるモデル生物であり、特に初期胚は細胞周期の進行に關与する分子の機能解析に非常に適した系と言える。初期胚は受精後、細胞膜形成を伴わない計 13 回の核分裂が胚全体で同調的に起こることから、細胞周期に異常が生じた核を見分けるのが容易である。また、この時期の細胞周期チェックポイント機構は体細胞のそれとは大きく異なっており、DNA 損傷を監視するチェックポイントは存在するが、これにより検出された損傷ゲノムを個別に修復し復帰させるわけではない。¹⁰⁾ つまり、損傷 DNA 修復機構が発達した高等生物では修復されてしまうような DNA 損傷を持つ核でも、ショウジョウバエの初期胚を用いて解析すれば、核の排除という細胞周期同調性の乱れとして検出することができる。この特徴を利用し、筆者らは RecQ5 欠損初期胚における DNA 損傷を解析した。まず、パラホルムアルデヒドで固定したショウジョウバエ初期胚を分裂期のマーカーであるリン酸化ヒストン H3 (PH3) の抗体で免疫染色し、同調分裂期 (PH3 ポジティブ) における PH3 ネガティブ核 (異常核) の割合を調べたところ、RecQ5 を欠損させた初期胚ではその割合が野生型の約 4 倍に増加した (Fig. 1, グラフ)。野生型の初期胚に出現した PH3 ネガティブ核は単独 (Fig. 1, 右図 Single)、又は 2 個が隣同士に並ぶ形で存在 (Fig. 1, 右図 Pair) しており、それぞれ間期又は分裂期で生じた DNA 損傷が直後のチェックポイントにより検出され、その核が排除機構により細胞周期から外れたと考えられた。一方、RecQ5 を欠損させた場合では、約 80% の PH3 ネガティブ核が単独若しくは 2 個が隣同士に並ぶ形で存在したが、残りの PH3 ネガティブ核は 3 個以上がクラスターを形成するように存在していた (Fig. 1, 右図 Cluster)。さらに、Histone2Av-mRFP 融合体 (His2AvD-mRFP) を発現させることで染色体の動態を可視化できる初期胚¹¹⁾を用いてリアルタイムイメージングを行ったところ、RecQ5 の欠損により出現したクラスター状の異常核は 1 つ

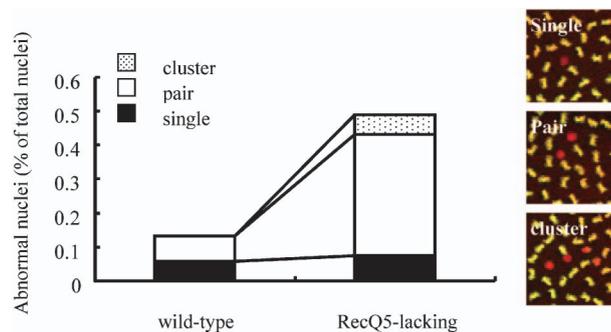


Fig. 1. Asynchronously-behaving Nuclei Emerge in Syncytial Embryos Lacking Maternal RecQ5

Embryos were stained with PI (red) and anti-PH3 antibody (green). Typical images asynchronously-behaving nuclei (red, PH3-negative) emerged in RecQ5-lacking embryo are on the right. The frequency of appearance of asynchronous nuclei is specified according to their type of pattern, such as single (black bar in graph and top image), pair (white bar in graph and middle image), and cluster (dotted bar in graph and bottom image). The frequency of defects in RecQ5-lacking embryos was significantly different from that of those in the wild-type ones ($p < 0.01$, χ^2 -test).

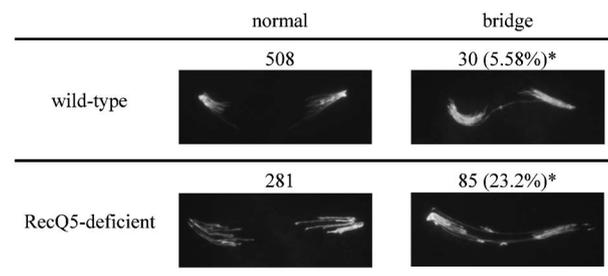


Fig. 2. Anaphase DNA Bridges in RecQ5-lacking Embryos

Syncytial embryos were squashed, and their DNA was stained with DAPI. The data indicate the numbers of normal and DNA-bridged figures scored. Images represent figures of chromosomes with normal or bridged structures in wild-type and RecQ5-deficient embryos. * $p < 0.01$, χ^2 test.

の母親核より派生していた。つまり、母親核に生じたチェックポイントに検出されない DNA 損傷が分裂により娘核へと蓄積し、最終的にチェックポイントに検出されるような損傷になったと考えられる。

3-2. 核分裂の同調性から外れた核は分裂期においてクロマチンブリッジ構造を形成している 初期胚の染色体標本作製¹²⁾し、分裂期における染色体の状態を解析したところ、RecQ5 を欠損した初期胚には DNA ブリッジ構造を形成した娘染色体が増加していた (Fig. 2)。染色体の分配は凝集した染色体が中心体より伸びた微小管 (紡錘糸) によって極へと引っ張られることで行われる。そこで His2AvD-mRFP とチュブリン結合タンパク質である Jupiter¹³⁾ に GFP を付与した Jupiter-GFP 融合体 (Jupiter-GFP) を発現する初期胚を用いて同調

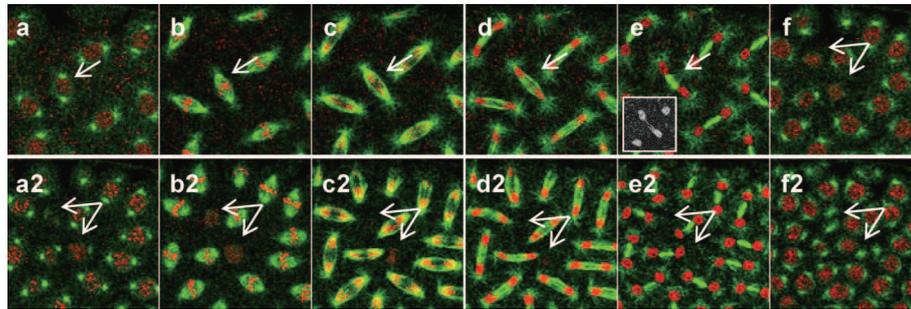


Fig. 3. Live-imaging Analysis of Nuclear Components in a Syncytial Embryo Lacking RecQ5

Live embryos expressing His2AvD-mRFP and Jupiter-GFP, which afforded visualization of histone (red) and microtubules (green)/centrosomes (green), respectively, were analyzed by time-lapse confocal microscopy. Asynchronous nuclei are marked with arrows. The panels represent prophase (a, a2), metaphase (b, b2), anaphase (c, c2 and d, d2), telophase (e, e2), and interphase (f, f2). The black-and-white insert represents the image of His2Av-mRFP in panel “e”.

的な核分裂における染色体、微小管及び中心体の様子をリアルタイムイメージング法で観察した (Fig. 3). すると, RecQ5 欠損初期胚において, 娘染色体間にブリッジ構造が形成されたまま分裂期を進行した核 [Fig. 3 (e)] は次の間期において中心体への Jupiter の局在が観察されなくなり [Fig. 3 (f)], 最終的に排除されることがわかった [Fig. 3 (c2)]. 一方, 同調性を保っている核の中心体及び微小管に異常はみられなかった. 以上の結果から, RecQ5 の欠損により出現する異常核は娘染色体の分離段階で形成された娘染色体間のブリッジ構造が原因であることが明らかになった.

3-3. 細胞周期を停止した核には DNA 二本鎖切断が存在する では, 娘染色体間のブリッジ構造が解消されないまま分裂期が進行してしまっただうなるのだろうか? 体細胞の細胞周期ではスピンドルチェックポイントが娘染色体の解離を監視しており, 染色体分配に異常が生じた場合には細胞周期を停止させる. しかし, ショウジョウバエ初期胚における細胞周期ではスピンドルチェックポイントの存在が明らかとなっていないため, 娘染色体はブリッジ構造の有無にかかわらず中心体から伸びた微小管によって両極へと引っ張られることになる. その結果, ブリッジ構造は強制的に引きちぎられることとなり, DNA 損傷が起こると考えられる. そこで, RecQ5 の欠損により生じた異常核に DNA 損傷が起きているか検討した (Fig. 4). ショウジョウバエ初期胚の場合, DNA 二本鎖切断が生じた核はヒト Chk2 のホモログである Mnk による中心体の不活性化を受ける.¹⁴⁾ RecQ5 を欠損した初期胚の PH3 ネガティブ核では, 中心体活性化マーカーである γ

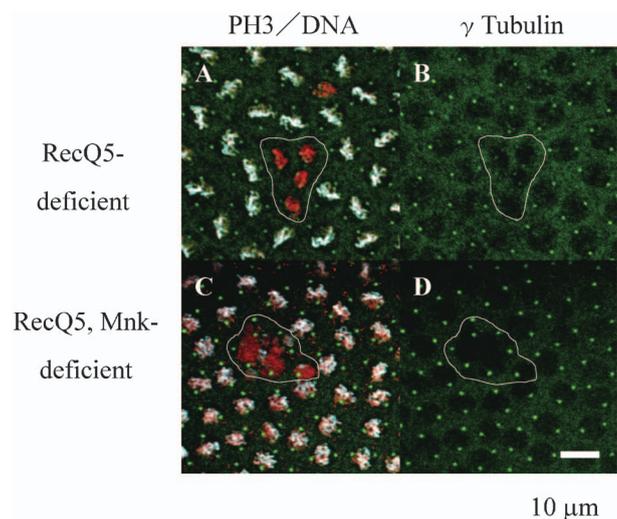


Fig. 4. Centrosome Inactivation in Asynchronously-behaving Nuclei Occurred in the *recq5*-derived Embryo

Embryos lacking RecQ5 (A and B) or RecQ5 and Mnk (C and D) were stained with anti-PH3 antibody (cyan), anti- γ -tubulin antibody (green) and PI (red). Photos represent the merged images of PH3, γ -tubulin, and PI staining (A and C) and images of γ -tubulin staining (B and D). The regions containing abnormal nuclei with diminished γ -tubulin staining of centrosomes are circled.

チュブリンの中心体への局在が減少していた [Fig. 4 (A), (B) の囲い部分]. この減少は, RecQ5 と Mnk の共欠損により周囲の PH3 ポジティブ核の中心体への局在と同程度まで回復した [Fig. 4 (C), (D) の囲い部分]. 以上の結果から, 娘染色体の分離異常により生じた異常核には DNA 二本鎖切断が存在していることが明らかとなった.

4. おわりに

RecQL5 単独欠損体における DNA 異常がほとんど認められず, RecQL5 の生体内機能に関する研究が進んでこなかった背景には, 実験に用いていた体

細胞が持つ厳密なゲノム維持機構があった。つまり、複数のチェックポイント機構により DNA 損傷の有無が監視され、さらにチェックポイントで検出された損傷のほとんどが修復されてしまうような環境下では、RecQ5 欠損により生じた異常の多くが修復されてしまっていたと考えられる。現に、RecQL5 欠損マウスの胎性幹細胞はガンマ線感受性を示さない。⁹⁾ 筆者らは体細胞が持つ損傷 DNA の修復機構がないショウジョウバエ初期胚を実験系に選択したことで、RecQ5 欠損による DNA 異常を検出することに成功した。また、RecQ5 を欠損すると DNA 二本鎖切断を持つ異常な核が出現し、この損傷は分裂期に形成された娘染色体間のブリッジ構造が原因であることが明らかとなった。本研究成果が RecQ5 の生体内における機能研究の一助となり、RecQ5 の機能の全容が明らかになることを期待する。

謝辞 本稿で紹介した研究は摂南大学薬学部生化学研究室で行われたものです。本研究を遂行するにあたり直接のご指導を頂いた伊藤文昭教授、川崎勝己准教授、一緒に切磋琢磨してくれた大門未沙さん、及び生化学研究室の皆様へ深く感謝申し上げます。なお、本稿に記載された図は Sakurai H. *et al*⁶⁾ より引用し、一部改変いたしました。

REFERENCES

- 1) Nakayama K., Irino N., Nakayama H., *Mol. Gen. Genet.*, **200**, 266–271 (1985).
- 2) Ellis N. A., Groden J., Ye T. Z., Straughen J., Lennon D. J., Ciocci S., Proytcheva M., German J., *Cell*, **83**, 655–666 (1995).
- 3) Kitao S., Shimamoto A., Goto M., Miller R. W., Smithson W. A., Lindor N. M., Furuichi Y., *Nat. Genet.*, **22**, 82–84 (1999).
- 4) Yu C. E., Oshima J., Fu Y. H., Wijsman E. M., Hisama F., Alisch R., Matthews S., Nakura J., Miki T., Ouais S., Martin G. M., Mulligan J., Schellenberg G. D., *Science*, **272**, 258–262 (1996).
- 5) Nakayama M., Yamaguchi S., Sagisu Y., Sakurai H., Ito F., Kawasaki K., *DNA Repair (Amst)*, **8**, 232–241 (2009).
- 6) Sakurai H., Okado M., Ito F., Kawasaki K., *FEBS Lett.*, **585**, 1923–1928 (2011).
- 7) Kitao S., Ohsugi I., Ichikawa K., Goto M., Furuichi Y., Shimamoto A., *Genomics*, **54**, 443–452 (1998).
- 8) Hu Y., Raynard S., Sehorn M. G., Lu X., Bussen W., Zheng L., Stark J. M., Barnes E. L., Chi P., Janscak P., Jasin M., Vogel H., Sung P., Luo G., *Genes Dev.*, **21**, 3073–3084 (2007).
- 9) Hu Y., Lu X., Barnes E., Yan M., Lou H., Luo G., *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 3431–3442 (2005).
- 10) Foe V. E., Alberts B. M., *J. Cell Sci.*, **61**, 31–70 (1983).
- 11) Schuh M., Lehner C. F., Heidmann S., *Curr. Biol.*, **17**, 237–243 (2007).
- 12) Rickmyre J. L., Dasgupta S., Ooi D. L., Keel J., Lee E., Kirschner M. W., Waddell S., Lee L. A., *J. Cell Sci.*, **120**, 3565–3577 (2007).
- 13) Karpova N., Bobinnec Y., Fouix S., Huitorel P., Debec A., *Cell Motil. Cytoskeleton*, **63**, 301–312 (2006).
- 14) Takada S., Kelkar A., Theurkauf W. E., *Cell*, **113**, 87–99 (2003).