

# RBC 放生研ニュース NEWSLETTER

No. **173**  
DEC  
12, 2022



アウトリーチ活動の一環として、長崎県五島列島の三井楽小学校と五島南高校で課外授業をしました。

## Contents

|   |   |
|---|---|
| ミニレビュー 1  | 2 |
| レトロトランスポゾンLINE-1によるゲノムの改変機構   |   |
| ミニレビュー 2  | 6 |
| Phosphoregulation of HORMA domain protein HIM-3 promotes asymmetric synaptonemal complex disassembly in meiotic prophase in <i>Caenorhabditis elegans</i> |   |
| (線虫において HORMA ドメインタンパク質 HIM-3 のリン酸化制御が、減数分裂前期におけるシナプトネマ複合体の非対称な解体を促す)   |   |

|                       |    |
|-----------------------|----|
| 第46回放射線生物研究連絡会議総会議事録  | 10 |
| ATW2023のご案内           | 10 |
| 高田穰教授退職記念ミニシンポジウムのご案内 | 11 |
| 放生研からのお知らせ            | 12 |
| 編集後記                  | 12 |

ミニレビュー1

# レトロトランスポゾンLINE-1によるゲノムの改変機構

## はじめに

ヒトゲノム配列の最初のドラフトが公開されてから約20年が経過した[1]。タンパク質をコードする領域は、ヒトゲノムのごく一部(約1.5%)しかカバーしていないと推定されている。残るゲノム領域は、一般にノンコーディング領域で構成されていると考えられており、当初は“ジャンクDNA”と見なされていた。しかし、その後の研究により、非コードDNA領域はmRNAへの転写を制御する配列の他に、リボソーム、トランスファー、ヘアピン、マイクロRNAなどの機能性の非コードRNAに加えて、長鎖非コード(lnc) RNAなどとして転写されることがわかってきた。これらの非コードDNA領域の残りは、主にトランスポゾンなどの可動

性の反復DNA配列からなる。驚くべきことに、トランスポゾンはヒトゲノムのほぼ半分を構成しており、これらの転移性配列は生物の表現型の変化や疾患発症に寄与しているが、その転移機構についてはまだほとんど解明されていない。本レビューでは、ヒトレトロトランスポゾンであるLong INterspersed Element-1 (LINE-1またはL1) の転移機構について概説し、いかに疾患原因となり得るのか、またL1によって引き起こされる負の影響を軽減するための生体防御システムについても言及する。

## レトロトランスポゾンL1について

トランスポゾンはDNA型とレトロ型に区別され、前者は自身

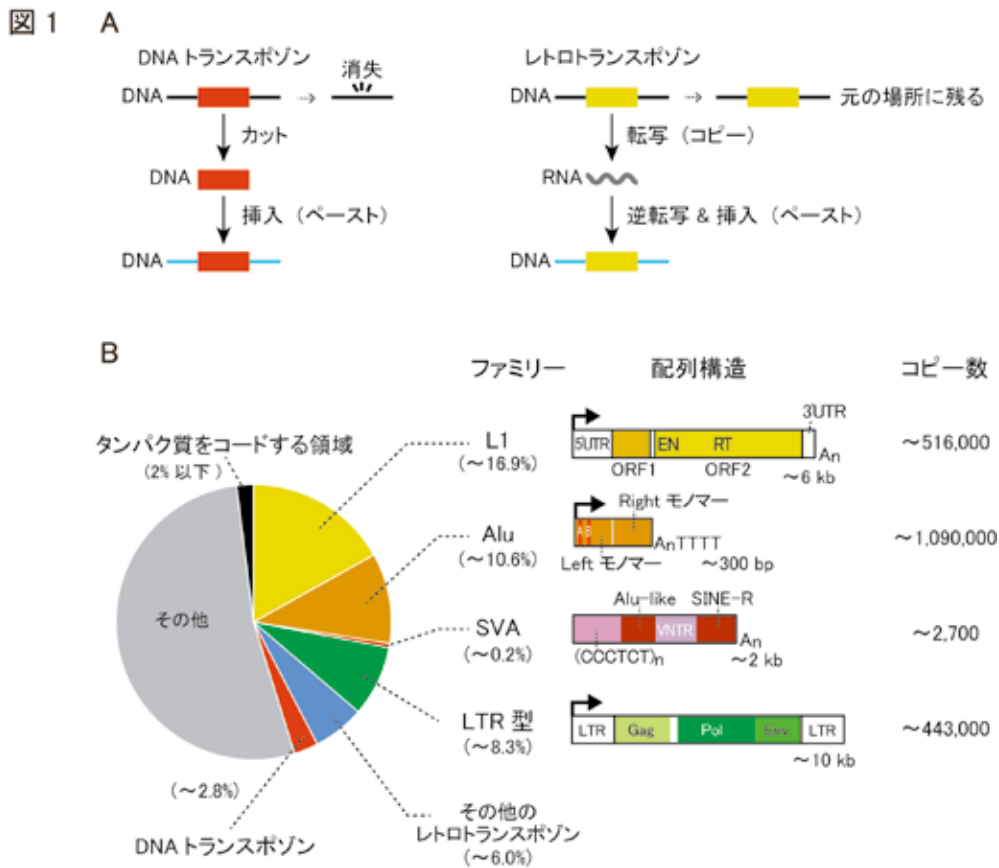


図1 レトロトランスポゾンの転移機構とヒトゲノム内での割合

(A) DNAトランスポゾンとレトロトランスポゾン

DNAトランスポゾンは、元の部位から取り除かれ別の場所へ挿入される「カット&ペースト」方式によって転移する。転写されたレトロトランスポゾンのRNAは逆転写酵素によってcDNAに変換される「コピー&ペースト」方式によって転移する。

(B) ヒトのレトロトランスポゾンの分類とゲノム内での割合

円グラフは、ヒトゲノムに存在するトランスポゾンの割合を表す。各レトロトランスポゾンの配列構造、塩基長、コピー数を右図に示す。L1の全長は約6kbであり、5'UTR(非翻訳領域)にRNAポリメラーゼIIのプロモーター、RNA結合タンパク質ORF1pと、エンドヌクレアーゼ(EN)と逆転写酵素(RT)活性を持つORF2pをコードしている。

のDNA配列を切り取って別の場所へと挿入する「カット&ペースト」方式によって転移する。一方でL1などのレトロトランスポゾンには転写された後、そのRNAがcDNAに逆転写され、いわゆる「コピー&ペースト」方式によって転移する(図1)。L1はヒトゲノムの約16.9%を占め、Alu(~10.6%)、SVA(~0.2%)といったShort Interspersed Element(SINE)に属するレトロトランスポゾンがこれに続く[1]。この他にもレトロウイルスと類似のLTR型レトロトランスポゾン(~8.3%)が存在する。L1はヒトゲノム上で最も豊富なトランスポゾン配列であると同時に、自律的に転移することが可能な唯一の配列である。ほとんどのL1配列上には既に様々な変異が蓄積しており、転移する能力を失っているが[2,3]、ヒトゲノムには依然として高い転移能をもつL1配列が約80-100コピーほど存在すると予想されている[4,5]。L1は逆転写酵素ORF2pをコードしており、これは自身のRNAだけでなくノンコーディング配列であるSINEファミリーのRNAにも作用し、これらを逆転写して転移させることができる[6]。すなわちヒトゲノムのおおよそ1/3は、L1の逆転写酵素によって合成されたものと言い換えることができる。L1やSINEファミリーの転移は、挿入変異による遺伝子破壊にもつながるため、これまでに様々な疾患を誘発することが報告されている[7]。さらに転移は、挿入変異だけでなく、染色体欠失や重複、転座などの大規模なゲノム変化に

もつながるため、レトロトランスポゾンは我々が考えるよりもはるかに大きなインパクトをゲノム上にもたらしてきたのかもしれない[8,9]。このような転移による負の効果を抑制するためにL1配列を標的とした転写抑制因子が存在する。興味深いことに、現生人類のゲノム上において活発に転移するL1ファミリーにはこの転写抑制因子による認識配列が欠失しており、宿主(細胞)による抑制戦略を巧みに逃れ、新たに出現したファミリーだと考えられている[10]。

## L1の自己複製=転移サイクル

L1が転写された後、細胞質においてL1 RNAから2つのタンパク質(ORF1pとORF2p)が翻訳される。真核生物ではこのようなbicistronicな翻訳は効率的ではないと思われ、ORF1pに比べてORF2pのタンパク質量は極めて低く、その検出には技術的な困難をとまなう。これら2つのタンパク質は、自身をコードするRNAと優先的に結合してribonucleoprotein(RNP)を形成する(図2)。RNA結合タンパク質であるORF1pは、このL1 RNP形成に重要であると考えられているが、その詳細な機能はよくわかっていない。ORF2pはエンドヌクレアーゼ(EN)および逆転写酵素(RT)活性を有し、これらの活性はL1の転移に不可欠である[11,12]。エピトープタグを付加することにより、近

図2

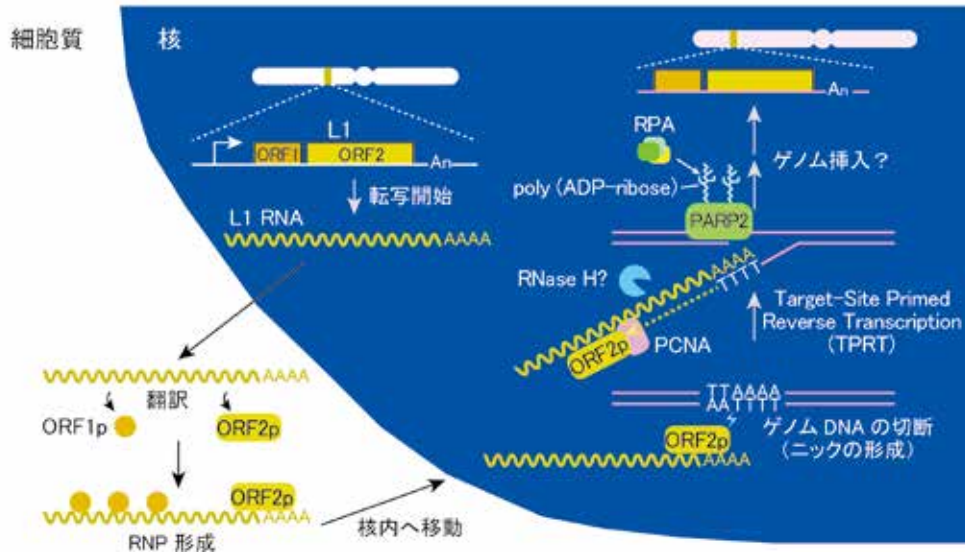


図2 L1の転移機構とこれを制御する宿主因子群

L1 RNAは転写後、細胞質へ輸送され、ORF1pとORF2pが翻訳される。この2つのタンパク質は自身をコードするL1 RNAと結合してribonucleoprotein(RNP)複合体を形成する。このL1 RNPが核に移行すると、ORF2pのエンドヌクレアーゼ活性により5'-TTTT/AA-3'などのコンセンサス配列(スラッシュはORF2p切断部位を示す)が切断されニックが形成される。次にこの切断端をプライマーとして、ORF2pによる逆転写反応が開始される。PARP2はORF2pによって切断された部位を認識してリクルートされる。このとき、PARP2によってpoly(ADP-ribose)の合成がおこり、これを目印として一本鎖DNA結合タンパク質であるRPAがL1の転移部位に集積する。RNase H2などの細胞内RNase Hは、逆転写後のL1 RNA/cDNAハイブリッドのRNA除去に寄与していると予想される。その後、RPAはL1の一本鎖cDNAを保護し、転移を促進すると考えられる。また、DNAポリメラーゼのスライディングクランプとして機能するPCNAはORF2pと直接相互作用し、L1の転移を促進する。二本鎖L1 cDNAの形成やL1 cDNAのゲノムDNAへの連結といった詳細な転移機構は未解明である。

年ようやく様々な培養細胞でORF2pを検出することが可能となり、そのRNP複合体の解析を通して、我々を含めた複数のグループからL1の転移制御因子の同定が進められてきた[13,14]。

転移の第一段階では、ORF2pのエンドヌクレアーゼ活性によってゲノムDNAが切断されニックが形成される。その後、切断されたDNA端からORF2pがL1 RNAと相補的なcDNAを逆転写合成することによって転移過程が進行すると考えられている[15-17]。このモデルはtarget-site primed reverse transcription (TPRT) とよばれるが、その詳細な機序やその後の転移プロセスなどはほとんど解明されていないのが現状である。既知のORF2p相互作用因子として、DNAポリメラーゼのスライディングクランプとして機能するPCNAが報告されている[13]。おそらく逆転写酵素であるORF2pのスライディングクランプとして機能し、逆転写合成を促進する役割があるのだろう。我々はDNA修復因子として知られているpoly (ADP-ribose) polymerase 2 (PARP2) が、ORF2pによって切断された箇所を特異的に認識するセンサーとして働くことを見出した[14] (図2)。さらに、核内の主要な一本鎖DNA結合タンパク質であるRPAが、PARP2によって合成されたpoly (ADP-ribose) を介してL1の転移開始部位に集積し、転移過程で現れるL1の一本鎖cDNA領域を保護することを突き止めた。L1の転移中間体であるRNA/cDNAハイブリッド二本鎖からRNAを除去する仕組みはまだよくわかっていないが、RNase H2がL1の転移に関与することが示唆されており、L1 RNAの分解後に一本鎖DNAから二本鎖DNAへの合成を促進するのではないかと予想されている[18]。

L1転移の最終段階であるL1 cDNAとゲノムDNAの連結過程もよくわかっていない。この過程では前述したPCNA、PARP2、RPAに加えて、DNAリガーゼも関与するDNA修復経路が極めて重要な役割を担っていることは間違いない。ニワトリのDT40細胞では、二本鎖切断損傷 (DNA double-strand break: DSB) 修復経路である非相同末端結合 (nonhomologous end-joining: NHEJ) がL1の転移に必要であることが報告されている[19]。一方で、ゲノムDNAと挿入されたL1配列の5'末端との連結部には、高頻度で短い相同配列が観察されており、マイクロホモロジーを利用したalternative NHEJ経路の関与も示唆されている[20]。実際、このalternative NHEJ経路に関与するPARP1はL1 RNPと相互作用し、PARP1ノックダウンまたはPARP阻害剤処理によってL1の転移効率が大きく減少する[13,14]。おそらくL1の転移機構は、単一のDNA修復・連結経路に依存しているのではなく、様々な経路を利用して転移する可能性が高いと我々は予想している。実際、我々が単離したL1 RNP複合体構成因子の中から、上記とは異なるDNA修復経路に関与する因子をノックダウンした場合でも、L1の転移効率が低下することを見出している (未発表)。前述のようにL1やL1が誘導するSINEファミリーの転移は疾患にもつながるゲノム不安定化を引き起こすため、宿主である細胞はこれを抑制するための

システム、例えば転写抑制機構を進化の過程で獲得してきたが、これを補完するように転移プロセスそのものを標的としたDNA編集酵素の存在も知られている[21]。宿主が構築してきたこれらの抑制機構に屈することなく自己複製を続けるために、L1はできるだけ多くの宿主経路を利用するという生存戦略を展開しているのかもしれない。そうすれば、仮にいずれかの経路が宿主によって遮断されても、L1は容易に他の経路へと乗り換えて転移することができるのではないだろうか。このような視点から捉えると、L1と宿主の関係はウイルスと宿主の関係とよく類似している。

## 転移を抑制する防御システム： 自然免疫とゲノム恒常性維持

近年、ウイルス感染のない状況でも自然免疫が活性化され、場合によっては持続的な炎症反応へとつながり慢性炎症疾患のような病態を示すことが知られている。このような免疫応答に異常を示す遺伝性疾患の原因遺伝子として単離されたものの多くが、L1などレトロトランスポゾン抑制する役割をもつことがわかってきた[22]。これは、自然免疫がウイルスや病原性細菌に対する防御システムとして作用するだけでなく、レトロトランスポゾンを抑制する作用も併せ持つことを示している。我々はさらにL1 RNP複合体について詳細な解析を進めたところ、既に知られているL1の抑制因子に加え、様々な自然免疫応答因子も含まれていることがわかった[23]。また、L1を細胞内で強制発現するとI型インターフェロンの応答が亢進するなど、L1の高発現と自然免疫応答との密接な関係が示唆された。興味深いことに、この反応はL1の転移を介さず、L1 RNAによって誘導されることもわかってきた。すなわち転移によって生じるゲノム上の変化にとどまらず、L1の転写産物は何らかの細胞内センサーによって感知され、自然免疫応答を促進するトリガーとなることが予想される。L1などレトロトランスポゾンがゲノム上において占める割合を考慮すると、その転写産物が細胞運命に変化を与えるという可能性はより広範な生物学的意義を想起させる。例えば哺乳類の発生過程や腫瘍細胞ではレトロトランスポゾンに対する転写抑制が解除され、L1などが一時的に高発現することが知られている。これらの状況下において自然免疫はどのように応答し、発生や腫瘍形成に影響を与えるのだろうか？ またL1の高発現によって自然免疫応答が活性化された場合、免疫細胞によるがん細胞などに対する抗腫瘍作用にどのような影響を与えるのだろうか？ L1が転写されゲノムに組み込まれるまでの自己複製サイクルは、分子生物学的な手法によって近年ようやく明らかにされようとしている。L1の宿主制御因子は何か、またその機序を明らかにする過程で、基礎的なメカニズムの解明から上記のような疑問に対する答えもおのずと導き出され、将来的にはレトロトランスポゾンが関与する疾患への対処法にもつながることが期待される。

## 謝辞

ポストドク時代の恩師であるミシガン大学の John V. Moran 博士、研究の機会を与えていただいた京都大学大学院生命科学研究科の石川冬木先生、そして当研究室の皆様に深く感謝致します。また本稿で紹介した研究の一部は、日本学術振興会科研費、京都大学研究開発プログラムいしずえ、武田科学振興財団、日本応用酵素協会、住友財団、アステラス病態代謝研究会からの研究助成の支援を受けて行われました。

## ● 引用文献

1. Lander, E. S. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921, doi:10.1038/35057062 (2001).
2. Grimaldi, G., Skowronski, J. & Singer, M. F. Defining the beginning and end of KpnI family segments. *EMBO J* **3**, 1753-1759 (1984).
3. Richardson, S. R. *et al.* The Influence of LINE-1 and SINE Retrotransposons on Mammalian Genomes. *Microbiol Spectr* **3**, MDNA3-0061-2014, doi:10.1128/microbiolspec.MDNA3-0061-2014 (2015).
4. Brouha, B. *et al.* Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 5280-5285, doi:10.1073/pnas.0831042100 (2003).
5. Sassaman, D. M. *et al.* Many human L1 elements are capable of retrotransposition. *Nat Genet* **16**, 37-43, doi:10.1038/ng0597-37 (1997).
6. Dewannieux, M., Esnault, C. & Heidmann, T. LINE-mediated retrotransposition of marked Alu sequences. *Nat Genet* **35**, 41-48, doi:10.1038/ng1223 (2003).
7. Hancks, D. C. & Kazazian, H. H., Jr. Roles for retrotransposon insertions in human disease. *Mob DNA* **7**, 9, doi:10.1186/s13100-016-0065-9 (2016).
8. Gilbert, N., Lutz-Prigge, S. & Moran, J. V. Genomic deletions created upon LINE-1 retrotransposition. *Cell* **110**, 315-325 (2002).
9. Symer, D. E. *et al.* Human I1 retrotransposition is associated with genetic instability in vivo. *Cell* **110**, 327-338 (2002).
10. Jacobs, F. M. *et al.* An evolutionary arms race between KRAB zinc-finger genes ZNF91/93 and SVA/L1 retrotransposons. *Nature* **516**, 242-245, doi:10.1038/nature13760 (2014).
11. Feng, Q., Moran, J. V., Kazazian, H. H., Jr. & Boeke, J. D. Human L1 retrotransposon encodes a conserved endonuclease required for retrotransposition. *Cell* **87**, 905-916 (1996).
12. Moran, J. V. *et al.* High frequency retrotransposition in cultured mammalian cells. *Cell* **87**, 917-927 (1996).
13. Taylor, M. S. *et al.* Affinity proteomics reveals human host factors implicated in discrete stages of LINE-1 retrotransposition. *Cell* **155**, 1034-1048, doi:10.1016/j.cell.2013.10.021 (2013).
14. Miyoshi, T., Makino, T. & Moran, J. V. Poly(ADP-Ribose) Polymerase 2 Recruits Replication Protein A to Sites of LINE-1 Integration to Facilitate Retrotransposition. *Mol Cell* **75**, 1286-1298 e1212, doi:10.1016/j.molcel.2019.07.018 (2019).
15. Luan, D. D., Korman, M. H., Jakubczak, J. L. & Eickbush, T. H. Reverse transcription of R2Bm RNA is primed by a nick at the chromosomal target site: a mechanism for non-LTR retrotransposition. *Cell* **72**, 595-605 (1993).
16. Cost, G. J., Feng, Q., Jacquier, A. & Boeke, J. D. Human L1 element target-primed reverse transcription in vitro. *EMBO J* **21**, 5899-5910 (2002).
17. Doucet, A. J., Wilusz, J. E., Miyoshi, T., Liu, Y. & Moran, J. V. A 3' Poly(A) Tract Is Required for LINE-1 Retrotransposition. *Mol Cell* **60**, 728-741, doi:10.1016/j.molcel.2015.10.012 (2015).
18. Benitez-Guijarro, M. *et al.* RNase H2, mutated in Aicardi-Goutieres syndrome, promotes LINE-1 retrotransposition. *EMBO J* **37**, doi:10.15252/embj.201798506 (2018).
19. Suzuki, J. *et al.* Genetic evidence that the non-homologous end-joining repair pathway is involved in LINE retrotransposition. *PLoS Genet* **5**, e1000461, doi:10.1371/journal.pgen.1000461 (2009).
20. Zingler, N. *et al.* Analysis of 5' junctions of human LINE-1 and Alu retrotransposons suggests an alternative model for 5'-end attachment requiring microhomology-mediated end-joining. *Genome Res* **15**, 780-789, doi:10.1101/gr.3421505 (2005).
21. Richardson, S. R., Narvaiza, I., Planegger, R. A., Weitzman, M. D. & Moran, J. V. APOBEC3A deaminates transiently exposed single-strand DNA during LINE-1 retrotransposition. *Elife* **3**, e02008, doi:10.7554/eLife.02008 (2014).
22. Goodier, J. L. Restricting retrotransposons: a review. *Mob DNA* **7**, 16, doi:10.1186/s13100-016-0070-z (2016).
23. Luqman-Fatah, A., Watanabe, Y., Ishikawa, F., Moran, J. V. & Miyoshi, T. The interferon stimulated gene-encoded protein HELZ2 inhibits human LINE-1 retrotransposition and LINE-1 RNA-mediated type I interferon induction. *bioRxiv*, 2022.2003.2026.485892, doi:10.1101/2022.03.26.485892 (2022).



三好 知一郎

京都大学大学院  
生命科学研究科細胞周期学  
同附属放射線生物研究センター  
放射線ストレス応答研究部門

## Phosphoregulation of HORMA domain protein HIM-3 promotes asymmetric synaptonemal complex disassembly in meiotic prophase in *Caenorhabditis elegans*

(線虫において HORMA ドメインタンパク質 HIM-3 のリン酸化制御が、減数分裂前期におけるシナプトネマ複合体の非対称な解体を促す)

PLOS Genetics, 2020

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008968>

Authors:

Aya Sato-Carlton, Chihiro Nakamura-Tabuchi, Xuan Li, Hendrik Boog, Madison K. Lehmer, Scott C. Rosenberg, Consuelo Barroso, Enrique Martinez-Perez, Kevin D. Corbett, Peter Mark Carlton

(a full list of authors and affiliations is at the end of this manuscript)

Each species has a particular number of chromosomes that contain all the genetic information its cells need to survive. For example, human cells contain 46 chromosomes, of which 23 are paternally-derived (from sperm), and 23 are maternally-derived (from the egg). With few exceptions, all 46 chromosomes are needed for each cell to carry out its normal functions. A chromosome number that is fewer or greater has the potential to lead to catastrophic problems. It is therefore essential that all gametes are created with the correct number of chromosomes. To accomplish this, sexually-reproducing organisms use a special program of cell division called meiosis, which consists of two cell divisions in a row after one round of DNA replication. In the first division, called meiosis I, homologous maternal and paternal chromosome pairs find each other, recombine, and segregate away from each other into complementary sets of chromosomes. The separation of pairs of homologous chromosomes after recombination results in two haploid genomes, containing half the chromosome number of the original diploid genome. In the second division, called meiosis II, replicated DNA strands (sister chromatids) segregate away from each other in a manner similar to a normal mitotic cell division. Before each round of chromosome segregation, chromosomes are held together by a protein complex known as cohesin that holds together replicated DNA strands. Cohesin is

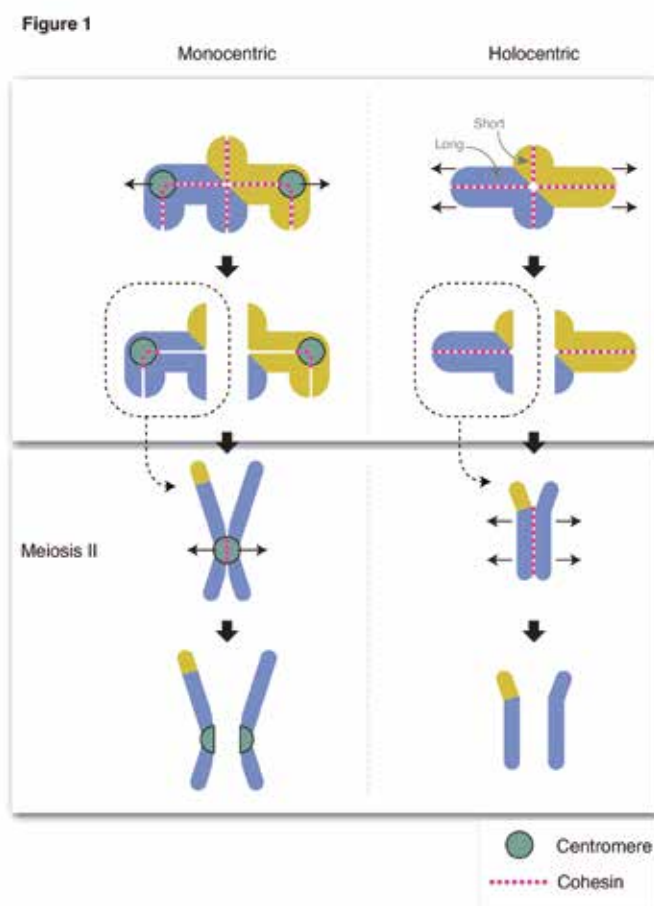
able to hold together pairs of homologous chromosomes because recombination between them often leads to crossovers, exchanges of continuity between DNA molecules. Segregation of chromosomes is enabled during cell division by the removal and proteolytic destruction of cohesin. The orchestration between pairing and segregation of homologous chromosomes enables the stable maintenance of correct chromosome number through generations. Errors in this process, however, can lead to meiotic mistakes and incorrect chromosome number.

Since the chromosomes that must segregate away from each other in meiosis II must stay linked together until the point of chromosome separation, not all the cohesin connecting chromosomes can be destroyed in meiosis I. To correctly segregate chromosomes, cohesin must be degraded in two steps, first enabling one division in meiosis I, and finally enabling the second division. Many organisms orchestrate these two steps by protecting cohesin at the centromere in meiosis I, and destroying centromeric cohesin at meiosis II. However, many organisms do not have localized centromeres, and these organisms must use a different strategy to carry out the same two-step destruction of cohesin (**Figure 1**). Of these organisms, the best understood is the nematode worm *Caenorhabditis elegans*, a well-developed model system. *C. elegans* uses the location of genetic recombination to partition its six chromosome pairs into two unequal-sized segments called the short arm and the long arm. During meiosis I, cohesin is degraded only on the short arm, allowing chromosomes to separate. The long arm then behaves similarly to a centromere, as cohesin is protected from destruction on the long arm, and long arms are pulled by the spindle into opposite daughter cells. In other words, while *C. elegans* does not have centromeres, it can temporarily designate a

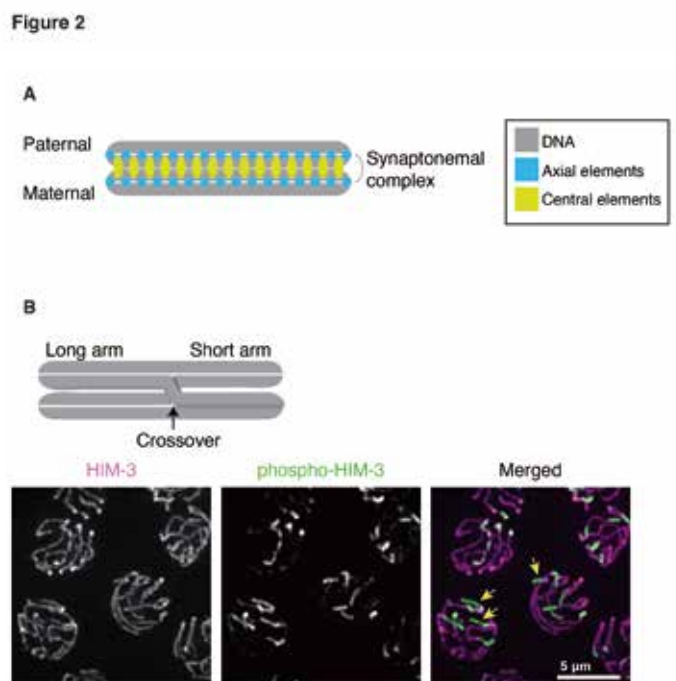
part of its chromosome to behave in a centromere-like fashion during a single cell division, meiosis I. Our group and others have elucidated that chromosomes can compare the size of partitions, and recruit different sets of proteins to the partitions in a size-dependent manner. In particular, specific recruitment of the phosphorylated form of the chromosome-binding protein SYP-1 to the short arm, and its loss from the long arm, and conversely the recruitment of two closely related meiotic chromosome axis proteins, HTP-1/2, to the long arm and

their removal from the short arm, is critically important for the downstream steps of chromosome segregation.

In this work, we have focused on the role played by phosphorylation of the conserved protein HIM-3, whose human homologs are called HORMAD1 and HORMAD2. HIM-3 forms part of the synaptonemal complex, a protein polymer that helps hold chromosomes together before and during recombination. The synaptonemal complex is composed of lateral elements, formed by the



**Figure 1**  
*Chromosome segregation patterns of monocentric and holocentric chromosomes.* Top, a diagram of chromosome segregation in the first meiotic division. In the monocentric chromosome shown at left, cohesin (magenta circles) is degraded everywhere except the centromere (large green circle) to enable the first division. In the holocentric chromosome at right, cohesin is degraded on the shorter of the two interfaces (the "short arm") between the chromosomes. Bottom, the second meiotic division is shown, in which all remaining cohesin is degraded, enabling segregation of chromosomes in a manner similar to mitosis for both monocentric and holocentric chromosomes.



**Figure 2**  
*Phosphorylated HIM-3 partitions to the shorter arm of meiotic chromosomes.* **A**, a diagram of the synaptonemal complex, showing the position of the axial elements (blue circles; including HIM-3) between each of the two homologous pairs of chromosomes, and the central elements (green ovals, including SYP-1) connecting the axial elements together. **B**, top, a diagram showing the position of the crossover and the partitioning of the chromosome into short and long arms. Bottom, the phosphorylated form of HIM-3 is restricted to the short arms (yellow arrows).

proteins HTP-3, HTP-1/2, and HIM-3; and the central element, formed by the SYP proteins (SYP-1 through SYP-6) (**Figure2, top**). Null mutants that do not have HIM-3 protein cannot complete meiosis successfully, making HIM-3 an essential protein for reproduction.

We previously performed a mass spectrometry analysis of *C. elegans* phosphoproteins that act in meiosis and found that HIM-3 protein becomes phosphorylated at multiple conserved sites. Interestingly, these sites are located at a region that was previously found to be bound by HTP-1/2. Using antibodies that specifically detect the phosphorylated form of HIM-3, we performed immunofluorescence microscopy to localize phosphorylated HIM-3 within *C. elegans* meiotic nuclei. While HIM-3 protein localizes along the entire chromosome axis, the phosphorylated form of HIM-3 was found to gradually concentrate only on the short arm (from the crossover to the nearest chromosome end), while only non-phosphorylated HIM-3 remains on the long arm (**Figure2, bottom**). By examining the localization of phosphorylated HIM-3 in *spo-11* mutant animals that do not initiate meiotic recombination and thus lack crossovers, we found no partitioning of phosphorylated HIM-3 to the short arms. This was expected, since partitioning depends on the presence of crossovers. However, spontaneous DNA damage occurring at a low level in the pre-meiotic divisions of these mutants gives rise to recombination intermediates that recruit components of the crossover machinery on roughly 1-2% of chromosomes. Phosphorylated HIM-3 also accumulated on these rare chromosomes, but interestingly, it did not partition to the short arm. This observation led us to wonder whether HIM-3 partitioning failed in these cases because a minimum number of crossovers was not achieved, or because spontaneous DNA breaks could not provide the correct environment for partitioning to occur. To test this, we tested another mutant, *dsb-2*, which has a reduced number of crossovers, ranging from zero to six per nucleus. In *dsb-2* mutants, we found that phosphorylated HIM-3 could partition to the short arm when the number of crossovers was 5 or 6, but either partitioned partially or not at all when the number was 4 or fewer. This result indicates that the partitioning of chromosomes is globally sensitive to the number of crossovers in the entire nucleus.

Analysis of 3D structures derived from x-ray crystallography suggested that phosphorylation of HIM-3 at S282 might sterically interfere with the ability of HTP-1/2 to bind. To test whether phosphorylation of HIM-3 actually prevents the binding of HTP-1/2, we performed an *in vitro* fluorescence polarization anisotropy assay, testing the binding of purified HTP-2 protein to both non-phosphorylated and phosphorylated peptides derived from HIM-3. We found that phosphorylation of HIM-3 prevented the binding of HTP-2. This result implies that the phosphorylation state of HIM-3 *in vivo* may affect the binding of proteins to the chromosome axis.

Next, to directly test the role of HIM-3 phosphorylation in meiosis, we created transgenic *C. elegans* strains expressing either non-phosphorylatable (serine to alanine) or phosphomimetic (serine to aspartic acid or glutamic acid) versions of HIM-3 at the endogenous gene locus, using CRISPR/Cas9 genome editing. We discovered that both sets of mutations led to defects in the correct establishment of long and short arms, as assessed by the localization of HTP-1 and phosphorylated SYP-1. (**Figure3**) While HTP-1 and phosphorylated SYP-1 normally partition to the short and long arms, respectively, we found that phosphomimetic HIM-3 mutants resulted in the localization of phospho-SYP-1 to both long and short arms in 75-80% of cases, and localization of HTP-1 to both long and short arms in 25-30% of cases. Phosphomimetic mutants had a stronger effect than non-phosphorylatable mutants on partitioning, suggesting that this partitioning defect could be mediated by the binding of HTP-1/2 to HIM-3.

Although chromosome partitioning defects were seen in late meiotic prophase, all HIM-3 phosphomutants had very limited effects on reproductive capacity: only 2-5% of progeny found to be inviable in phosphomimetic HIM-3 mutants. Since the effect of these mutants on the localization of phospho-SYP-1 and HTP-1 is much larger, we conclude that redundant mechanisms can act to rescue correct chromosome segregation even if HIM-3 cannot contribute to correct partitioning.

Finally, we assessed whether HIM-3 phosphorylation might play another role in addition to chromosome partitioning. In budding yeast, phosphorylation of a related chromosome axis protein, Hop1, was found to be required for the preferential use of the homologous

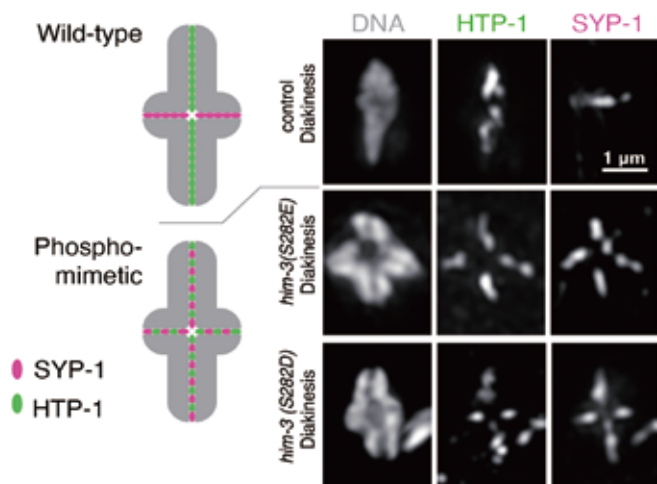


chromosome, rather than the sister chromatid, as a repair template during meiosis. We wondered whether phosphorylation of HIM-3 was similarly required for enforcing the choice of the homolog as a repair template. We tested this possibility in two different ways. Previous results in *C. elegans* showed that the product of the BRCA1 (*brc-1*) gene is required for all sister chromatid recombination in meiosis, making the combined loss of *brc-1* and genes that prevent sister recombination highly lethal. We first constructed double mutants of *brc-1* with non-phosphorylatable and phosphomimetic mutants of *him-3*, and assessed embryonic viability, and found no synergy between the two mutations. Secondly, informed by previous results that excess DNA damage during meiosis must be repaired by sister chromatid-templated repair, we exposed *him-3* phosphomutants to  $\gamma$ -rays at 75Gy, a level shown to cause significant lethality in *brc-1* mutants. However, we found no increase in embryonic lethality in these animals. We conclude that phosphorylation of HIM-3, unlike its homolog Hop1 in budding yeast, does not enforce repair pathway choice in *C. elegans*. Therefore, the function of Hop1 in yeast may

reflect a novel function that is not conserved in animals.

In conclusion, we have found that phosphorylation of HIM-3, an essential component of the meiotic chromosome axis, is required for maximal meiotic efficiency through promoting the correct and timely partitioning of chromosome-binding proteins to the long and short arms. Prevention of HIM-3 phosphorylation results in failure to segregate specific proteins or phosphoproteins to both the short and long arms. However, due to the low level of lethality compared with the high level of observed chromosome partitioning defects, we conclude that redundant compensatory mechanisms must exist that can promote correct chromosome segregation even of chromosomes that had been mispartitioned. The human homologs of HIM-3, are also known to be phosphorylated, and it has been hypothesized that this phosphorylation serves as a marker for the status of chromosome pairing. Thus, phosphorylation of synaptonemal complex components is likely to play diverse roles in different organisms, making it an area of intense ongoing investigation.

**Figure 3**



**Figure 3**

*Phosphomimetic mutants of HIM-3 lead to failure of chromosome partitioning.*

The top row shows the distribution of SYP-1 and HTP-1 on condensed wild-type chromosomes just before the first meiotic division. SYP-1 is present at the short arm (horizontal magenta band in diagram), and HTP-1 is present at the long arm (vertical green band). The bottom two rows show two different phosphomimetic mutants of HIM-3. In these mutants, both SYP-1 and HTP-1 are found in both orientations, indicating that chromosome partitioning is lost. Individual channels are shown in grayscale; scale bar is 1 micron.

**Peter Mark Carlton**<sup>1,4,5</sup>

Aya Sato-Carlton<sup>1</sup>,  
Chihiro Nakamura-Tabuchi<sup>1,6</sup>,  
Xuan Li<sup>1</sup>, Hendrik Boog<sup>1,7</sup>,  
Madison K Lehmer<sup>2b,8</sup>,  
Scott C Rosenberg<sup>2b,9</sup>,  
Consuelo Barroso<sup>3</sup>,  
Enrique Martinez-Perez<sup>3</sup>,  
Kevin D Corbett<sup>2a, 2b, 2c,1</sup>



<sup>1</sup> Kyoto University, Graduate School of Biostudies

<sup>2a</sup>Department of Cellular and Molecular Medicine, University of California, San Diego, La Jolla CA 92093 USA

<sup>2b</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, San Diego, La Jolla CA 92093 USA

<sup>2c</sup>Ludwig Institute for Cancer Research, San Diego Branch, La Jolla CA 92093 USA

<sup>3</sup> MRC London Institute of Medical Sciences, Imperial College, London W12 0NN, UK

<sup>4</sup> Kyoto University, Radiation Biology Center

<sup>5</sup> Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS), Kyoto University

<sup>6</sup> Present address: Department of Nutritional Sciences and Toxicology, University of California, Berkeley, CA 94720 USA

<sup>7</sup> Present address: Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie (IPMB), Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 364, 69120 Heidelberg, DE

<sup>8</sup> Present address: Molecular and Cell Biology Graduate Program, University of California Berkeley, Berkeley CA 94720 USA

<sup>9</sup> Present address: Genentech, Inc., South San Francisco, CA 94080 USA

議事録

## 第46回放射線生物研究連絡会議総会議事録

日時：令和4年9月26日（木） 16時00分～16時50分

本総会は昨年度同様、大会とは別日程にてオンライン会議にて執り行われた。議長に田代聡氏、書記に古谷寛治氏を指名して議事に入った。

1) 連絡会議幹事、田代聡氏による報告

連絡会議幹事代表、田代聡氏により令和4年度の 京都大学大学院生命科学研究科附属放射線生物研究センター各種委員及び連絡会議幹事の選挙の結果報告及び現委員の任期についての確認がなされた。

2) 京都大学大学院生命科学研究科附属放射線生物研究センター（以下放生研）からの現状報告

原田浩センター長より、放生研の近況報告があった。沿革及び、現各種委員の確認があり、運営体制、教員の異動についての報告がなされた。昨年度主催したワークショップ等の報告、JSPS研究拠点形成事業（国際共同研究ネットワーク形成）の紹介、確認がなされた。

次に放生研の共同利用・共同研究拠点事業に関する報告が行われた。令和3年度をもって共同利用、共同利用拠点認定が終了し、今年度より新たに「Collaborative Research and Education in Radiation Biology (CORE) Program」を開始（令和4～9年度）したことを報告した。現時点での研究課題は51課題であり、年末にさらに課題募集が行われる旨が述べられた。今年度の活動状況としては新型コロナウイルスへの対応が徐々に緩和され、活動を受け入れていることが報告された。また、令和4年度の放生研シンポジウムとして国際ATワークショップを京都、歴史館（3/2-3/5）にて高田穰氏の主催で行われることが発表された。

3) その他

放生研各種委員 および連絡会議幹事選挙の準備にはいることが告知された。

（文責：古谷・田代）

## ATW2023のご案内

2023年3月2日～5日、放生研メンバーを中心とした実行委員会のお世話で、第19回 Ataxia-Telegangiectasia Workshop (ATW2023) を京都で開催します。放生研国際シンポとしても位置づけています。以前同じATWを放生研の小松賢志先生、東京医科歯科大の水谷修紀先生が主催されたことをご記憶の方もいらっしゃると思います。海外スタイルの学会ですので、登録費用は国内学会に比べ高額ですが、放射線影響に関連した分子生物学、生化学、臨床医学など広範な先端トピックを多数のトップクラス研究者が討論する価値ある研究集会です。

参加登録と演題登録を開始していますので、詳しくはホームページをご覧ください。

<http://atworkshop2023.com/> ぜひご参加を検討ください。

事前参加登録（早期割引）：2023年1月20日まで

事前参加登録（通常）：2023年2月20日

一般演題登録：2022年12月31日

オーガナイザー：高田 穰、原田 浩



## 高田穰教授退職記念ミニシンポジウムのご案内

2023年3月をもって挽発効果研究部門の高田穰教授がご退職されます。記念事業として、以下のミニシンポジウムを開催いたします。多くの皆さまにご参集頂きます様、お願い申し上げます。

**日時** 2023年3月6日(月) 13:30~17:00(予定)

**場所** 京都大学・基礎医学記念講堂(地図内の7番の建物です)

### プログラム

13:30~ 開会のご挨拶

13:35~15:45 指定講演

佐藤 浩一 先生

Oncode Institute, Hubrecht Institute-KNAW and University Medical Center Utrecht, Netherlands.

北尾 洋之 先生

福岡歯科大学口腔医学研究センター

胡桃坂 仁志 先生

東京大学定量生命科学研究所

中西 真 先生

東京大学医科学研究所

16:00~17:00 特別講演

高田 穰 先生

京都大学大学院生命科学科附属放射線生物研究センター

17:00

閉会



7基礎医学記念講堂

## 放生研からのお知らせ

放生研ホームページに2021年度の年報を掲載しました。

12月5日より、令和5年度CORE Programにおける放生研共同利用と共同研究の募集を開始しました。詳しくは放生研ホームページをご確認ください。

## 編集後記

サッカーワールドカップ(W杯)カタール大会での日本勢の活躍は、皆さまの記憶に新しいところと存じます。格上のチームを相手に、自分たちの良さを存分に発揮して互角に戦い、善戦を繰り広げた姿は世界中の注目を集めました。

そして、決勝トーナメント進出後のクロアチア戦で勝利するには、この先どのような課題を乗り越えていくべきでしょう。そのように思いを馳せると、日本はさらに強くなれる余地があると期待され、今後の日本チームの進化と成長を楽しみにしたいと思います。

末筆ながら、本年も放射線生物研究センターの活動に皆さまのご支援ご協力を賜りありがとうございました。令和5年も変わらぬご愛顧のほど何卒よろしくお願い申し上げます。

(いけだ)



京都大学大学院 生命科学研究科附属 放射線生物研究センター

〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町

編集委員 原田 浩、南 ジンミン、小林 稔、池田 幸恵

お問い合わせ Tel: (075)753-7551 E-mail: 150hosei-jimu@mail2.adm.kyoto-u.ac.jp

