

## 論文の内容の要旨

論文の題目：分裂酵母の組換えホットスポット周辺のクロマチン構造解析

氏名：山 田 貴 富

### <序>

相同組換えは、損傷を受けた DNA の修復や遺伝的多様性の獲得などにおいて大変重要な機能を果たしている生命現象である。しかしながら、相同組換えの素反応については未だよくわかっていない点が多い。また、DNA がクロマチン構造をとって凝縮した状態となっている生体内では、DNA 相互作用因子が DNA に接近しにくいことが予想される。転写においては、このクロマチン構造による「障壁」を克服する機構としてクロマチン再編成、ヒストンアセチル化の二つのクロマチン修飾機構が知られているものの、組換えがクロマチン構造中でいかに進行するかについてはほとんど研究が進んでいない。以上のことからわかるように、生体内の相同組換えの分子機構及びその制御機構に関しては依然不明の点が多い。本研究は、「生体内における相同組換えの制御機構の解明」を究極的な目標として、主に組換え頻発部位（ホットスポット）のクロマチン構造が組換えに先立ってどのように変化するか注目して解析を行った。

真核生物での相同組換えは減数分裂期に、通常の細胞周期（体細胞分裂期）に比べ約 100 から 1000 倍活性化される。このことから、減数分裂を容易に誘導できる酵母は以前から相同組換えを研究するのに格好の生物として扱われてきた。本研究も分裂酵

母の減数分裂特異的組換えホットスポットである *ade6-M26* 遺伝子座をモデル系とした。*ade6-M26* ホットスポットは、*ade6* 遺伝子 ORF 中のグアニンがチミンに変わる M26 点突然変異により形成された 7 塩基配列(以下、7 塩基配列)と、それに結合する CREB/ATF 型転写因子 Atf1-Pcr1 に依存して減数分裂特異的に活性化される。また、*ade6-M26* 周辺では 7 塩基配列に依存した減数分裂期クロマチン再編成がおこること、およびこのクロマチン再編成が減数分裂を誘起する種々のシグナル伝達経路により制御されていることが明らかになっている。このクロマチン再編成は、野生株、及びコントロールとなる株では見られないことから、減数分裂期組換えに重要な役割を果たしていることが推察されている。

本研究では、まず *ade6-M26* 周辺で見られる減数分裂期クロマチン再編成が一般的な現象である可能性を提案する。続いて、*ade6-M26* に研究対象を絞り、その周辺で減数分裂期に見られるクロマチン構造修飾の分子機構について考察した。ここでは、先に述べた修飾機構の一つ、ヒストンアセチル化に注目した。

#### <結果及び考察>

##### 減数分裂期クロマチン再編成の一般性

減数分裂期クロマチン再編成が他の場所においても見られる一般的な現象であるか、それとも、*ade6-M26* 周辺に限定された特殊な現象であるかを検討した。そのため、以下の3つのケースについて、間接末端標識法によりクロマチン再編成が起こるかどうかが調べた。(1) 染色体上の他の位置 (*ura4* 遺伝子の位置) に移した *ade6* 遺伝子の M26 の 7 塩基配列周辺、(2) 天然に存在する 7 塩基配列周辺、(3) *ade6-M26* 遺伝子座の配列を改変して創出された (7 塩基配列とは異なる) ホットスポット活性を有する配列周辺。その結果、3つのケースの全てについて減数分裂期クロマチン再編成が観察された。従って、*ade6-M26* 周辺でのクロマチン再編成は一般的な現象である可能性が強く示唆された。

##### 減数分裂期クロマチン修飾の分子機構～ヒストンアセチル化の関与～

*ade6-M26* 周辺で減数分裂期に見られるクロマチン修飾について詳細に解析することにした。まず、Atf1 および Pcr1 のクロマチン再編成への関与を調べるため、*atf1* 破壊株、*pcr1* 破壊株について、間接末端標識法により減数分裂期のクロマチン構造を調べた。その結果、いずれの株についてもクロマチン再編成が見られなかった。従って、Atf1 及び Pcr1 はクロマチン再編成に必須の働きをしていることがわかった。

つぎに、クロマチン構造や転写の制御にヒストンのアセチル化・脱アセチル化が関与していることを考え、*ade6-M26* 周辺の減数分裂期クロマチン再編成にヒストンアセチル化が関与しているかどうかを、抗アセチル化ヒストン抗体を用いたクロマチン免

疫沈降法により検討した。その結果、*ade6-M26* 周辺のヒストン H3、ヒストン H4 がともに 7 塩基配列に依存して高アセチル化されていることがわかった。また、*atf1* 破壊株を用いて同様の解析を行ったところ、高アセチル化は見られず、*ade6-M26* 周辺のヒストン高アセチル化は *Atf1* にも依存していることがわかった。

ヒストンのアセチル化はヒストンアセチル化酵素によって担われている。そこで、最も解析に進んでいるヒストンアセチル化酵素の一つである出芽酵母 *Gcn5p* の分裂酵母ホモログ、*SpGcn5* をコードすると考えられる遺伝子 *gcn5* を同定し、その *ade6-M26* への関与を検討することにした。大腸菌で発現させた *SpGcn5* 標品、およびヒストン八量体を用いて生化学的解析を行った結果、*SpGcn5p* はヒストン H3 を強くアセチル化し、また、弱いながらもヒストン H4 をもアセチル化することがわかり、*SpGcn5* が確かにヒストンアセチル化酵素であることが明らかになった。その上で、*gcn5* 遺伝子破壊株を作製、以後の解析を行った。

ランダムスポア法で、*ade6-M26* での減数分裂期組換え活性を調べたが、見かけ上 *gcn5* 遺伝子破壊の影響はなかった。しかしながら、ランダムスポア法は組換えの最終産物のみを解析できる方法であり、*SpGcn5* が組換えの中途段階で機能している場合、その関与を検出できない。そこで、主にクロマチン構造に注目して *SpGcn5* の *ade6-M26* への関与を検討した。

まず、クロマチン免疫沈降解析を行ったところ、ヒストン H3 のアセチル化状態が劇的に低下していることがわかった。また、低下の程度はヒストン H3 ほど激しくないものの、ヒストン H4 のアセチル化状態もやはり低下していた。このことから、*SpGcn5* が *ade6-M26* 周辺でのヒストン高アセチル化に関与している可能性が示唆された。

次に、*gcn5* 遺伝子破壊の *ade6-M26* 周辺での減数分裂期クロマチン再編成への影響を調べた。その結果、野生株においては減数分裂誘導 3 時間後には見られるクロマチン再編成が、*gcn5* 遺伝子破壊株では誘導後 4 時間を経た時点でも見られず、誘導 4.5 時間後になってはじめて認められた。これは *SpGcn5* がクロマチン再編成を誘起する過程に機能している可能性を示唆するものである。

クロマチン構造をとった DNA の転写においては、DNA 結合性転写因子が、クロマチン修飾因子を導入し、その結果周辺のクロマチン構造が変化することが知られている。このことを踏まえて、これまでの結果を総合すると以下のようなモデルが考えられる。減数分裂期にはいると、*M26* の 7 塩基配列に結合した *Atf1-Pcr1* が *SpGcn5* を導入しこれによって *ade6-M26* 周辺のヒストンが高アセチル化される。その後、クロマチン構造が再編成され、周辺のクロマチン構造が組換えに有利な状態になる。

## <今後の展望>

まず、SpGcn5 が確かに *ade6-M26* 周辺での減数分裂期組換えに関与していることを確認しなければならない。SpGcn5 は組換えの中途段階で機能している可能性が強いので、DNA 二重鎖切断の検出系あるいは Return to Growth 実験系など組換え反応のキネティクスを議論できる系を確立する必要がある。その上で、野生株と *gcn5* 遺伝子破壊株との組換えの進行状況の差異を議論することが重要となろう。

また、*ade6-M26* 周辺でのクロマチン再編成に直接的に関与している可能性が考えられるのは Atf1、Pcr1、SpGcn5 の3つである。(このうち、SpGcn5 に関しては、直接的に関与している、と断定するには今後の解析を待たねばならない。) 実際には、他にも多くの因子がクロマチン再編成に関与していることが考えられる。たとえば、ATP の加水分解のエネルギーを利用してクロマチン構造を変化させるクロマチン再編成因子なども *ade6-M26* 周辺において重要な機能を果たしていると推測できる。そうした他の因子を同定することが、クロマチン修飾、ひいては組換え開始の機構の詳細を解析するのに必須と思われる。このためには、免疫沈降法等により Atf1 などに相互作用する因子(特に減数分裂期特異的に相互作用するもの)を同定することが有効であると考えられる。

また、上で同定されるであろうクロマチン修飾に関わる因子 (Atf1、Pcr1、SpGcn5 を含む) が、減数分裂期誘導後にどのような変化をするのかを解析することは、組換え活性化の制御機構を検討する上で興味深い。クロマチン再編成が減数分裂を誘起するシグナル伝達経路により制御を受けていることから、クロマチン修飾因子も、そうしたシグナル伝達経路により制御されていることが予想される。

本研究の前半で減数分裂期クロマチン再編成の一般性が示唆されたことを考えると、*ade6-M26* でのクロマチン再編成機構を解析することは、一般的な減数分裂期組換え、さらには相同組換えの制御機構の理解へとつながるものと考えられる。そこからさらに研究が進み、人為的に相同組換えが制御できるようになれば、様々な応用への道が開けるものと確信する。