

論文の内容の要旨

論文題目 分裂酵母の減数分裂期組換え活性化に関わるヒストン修飾の解析
(Histone modifications associated with meiotic recombination in fission yeast)

氏名 山田真太郎

<序章>

ヒストンは種間でよく保存されたタンパク質であり、クロマチン構造を形成して真核生物の DNA を核内に収納している。またヒストンは多様な翻訳後修飾を受けることにより、DNA との相互作用様式を変化させたりタンパク質を呼び寄せたりしてクロマチン構造を制御している。これまでにアセチル化やメチル化を始めとした様々なヒストン修飾が見つかっており、それぞれの修飾が 1 つ以上の DNA 関連反応に関連していることが分かっている。例えばヒストンのアセチル化やヒストン H3 の 4 番目のリシンのトリメチル化(H3K4me3)は、多くの遺伝子プロモーター領域に存在し、転写活性化に関与していることが知られている。

相同組換えは配列が類似した(相同な)DNA の間で一方の遺伝情報が他方に置き換わる反応であり、原核生物から真核生物に至るまでよく保存されている。減数分裂期に活性化される相同組換えは、適切な染色体の分離を保証し、配偶子に遺伝的多様性を与えている。減数分裂期相同組換えの特徴として、組換えが DNA の二重鎖切断(DSB、Double Strand Break)によって開始すること、また染色体全体に渡って等確率に起こらず、組換えホットスポットと呼ばれる特定領域で高頻度に生じることがあげられる。これらの特徴がみられるのは DSB 形成に関わる因子群の働きが染色体の局所的構造の

影響を受けるためと考えられている。

これまで組換えホットスポットの染色体構造について、いくつかの特徴が明らかになっている。まず出芽酵母や分裂酵母においてホットスポット周辺のヒストンの密度が低いことが挙げられる。このことからホットスポットでは組換え開始タンパク質が DNA に作用しやすいクロマチン構造になっていることが示唆される。もう一つの特徴はホットスポットに特定のヒストン修飾が濃縮していることである。分裂酵母のホットスポットの一つである *ade6-M26* ではヒストンの高アセチル化が観察され、ヒストンアセチル化酵素の遺伝子を破壊するとその周辺の組換え頻度が減少することが示されている。また出芽酵母やマウスではほとんどのホットスポットに H3K4me3 がみられ、H3K4 メチル化酵素が DSB 形成やその分布の決定に重要な役割を果たしている。しかしながら、これらヒストン修飾がどのように機能して組換えを制御しているのかは未知である。また、ホットスポットに関連する修飾が生物種でどれほど保存されているのかも不明である。そこで本研究では分裂酵母のホットスポットに関連するヒストン修飾を詳細に調べ、その修飾の機能を明らかにすることを試みた。

<結果>

(1) *ade6-M26* ホットスポット周辺に特徴的なヒストン修飾パターンがみられる

まず、分裂酵母の *ade6-M26* ホットスポットにおいてヒストン修飾を詳細に解析した。ヒストンのリシン残基のそれぞれがアセチル化されたものに対する抗体を用いてクロマチン免疫沈降(ChIP、Chromatin Immunoprecipitation)を行ったところ、*ade6-M26* 周辺では減数分裂期初期においてヒストン H3 の 9 番目のリシンのアセチル化(H3K9ac)が他の残基のアセチル化に比べて特に昂進していることが分かった。また、出芽酵母やマウスのホットスポット周辺で濃縮している H3K4me3 は、逆に著しく低下していることが明らかになった。

(2) *ade6-M26* 周辺のヒストン修飾は *ade6-M26* の組換え活性化因子に依存している

次に H3K9ac レベルが高く、H3K4me3 レベルが低いという *ade6-M26* ホットスポット周辺の修飾パターンが、組換え活性化とどのような関連を有するのかを調べた。*ade6-M26* ホットスポットの組換え活性化因子である Atf1 の変異体や Gcn5 の遺伝子の欠損株では、*ade6-M26* の組換え頻度が部分的に減少する。これらの株では H3K9ac レベルが部分的に減少し、H3K4me3 が部分的に増加していることが分かった。このことから、上記の修飾が Atf1 や Gcn5 を介して形成される組換えに有利な修飾である可能性が示唆された。

(3) *ade6-M26* の修飾パターンは *M26* 配列に組換え活性が依存するホットスポットに共通している

さらに、*ade6-M26* でみられたヒストン修飾の一般性を調べた。そのために *ade6-M26* と同様に組換え活性が *M26* と呼ばれる配列に依存する他のホットスポットである *ade6-3049* ホットスポットや、分裂酵母のゲノムにみられる天然の *M26* 配列に依存する *cds1+* ホットスポットについて、ヒストン修飾を解析した。その結果、両者とも *ade6-M26* と同様の修飾パターンがみられた。一方で、*M26* 配列に依存して転写が活性化される *ctt1+* のプロモーター周辺では、*ade6-M26* と修飾パターンが異なっていた。このことから、*ade6-M26* でみられた修飾パターンは、転写活性化に関わる *M26* 配列周辺には観察されず、組換えホットスポットに特異的に確立されるものと推測された。

(4) *ade6-M26* の修飾パターンは分裂酵母のホットスポットに一般的である

そこで *ade6-M26* 型の修飾パターンの一般性をゲノムワイドに検証するため、ゲノムタイリングアレイを用いたクロマチン免疫沈降法(ChIP-chip 法)により、分裂酵母の全ホットスポットにおけるヒストン修飾を解析した。その結果、80%以上のホットスポット周辺で H3K9ac が濃縮している一方で、H3K4me3 が濃縮しているホットスポットの割合は 15%に留まっていることが分かった。また全ホットスポット周辺におけるヒストン修飾レベルを平均すると、H3K9ac がホットスポットを中心に濃縮していたのに対し、H3K4me3 はホットスポット周辺にほとんどみられなかった。このことから、高レベルの H3K9ac と低レベルの H3K4me3 という修飾パターンが分裂酵母のほとんどのホットスポットに共通する性質であることが分かった。

(5) H3K9 の変異や H3K4 メチル化酵素の欠損により、減数分裂期組換え開始頻度が部分的に低下する

ChIP-chip の結果から H3K9ac が減数分裂期組換えの制御に関連している可能性が考えられた。そこで、H3K9ac の組換え活性化における意義を調べるため、H3K9 がアセチル化されないようアラニンに置換した *H3K9A* 変異体を作成した。また H3K4me3 の機能を調べるために、分裂酵母で唯一の H3K4 メチル化酵素である Set1 の欠損株を解析した。両株は減数分裂期初期の進行に異常がみられなかったが、調べた限り組換え頻度は部分的に低下していた。そこで ChIP-chip 法を用いて組換え開始タンパク質である Rec12 (分裂酵母の Spo11 ホモログ) の染色体結合レベルを調べた。その結果、*H3K9A* 株では、ほとんどのホットスポットにおいて Rec12 結合量が野生型に比べて部分的に減少していた。一方で、*set1Δ* 株では概してホットスポットへの Rec12 結合量が増加していた。両変異株は野生株と比べて Rec12 の発現量に差がみられなかったこと

を考慮すると、*H3K9A* 変異によって *Rec12* とホットスポットの相互作用が低下すること、*set1* の欠損によって DNA に結合する *Rec12* が増加することが示唆される。

さらに組換え開始反応である DSB の形成頻度を調べた。その結果、*H3K9A* 変異体における DSB 頻度は調べた全てのホットスポットにおいて部分的に低下することが分かった。一方で *set1Δ* 株では DSB 頻度が部分的に低下する領域と低下しない領域の両方が存在することが明らかになった。以上により、*H3K9* におけるヒストン修飾が *Rec12* の染色体結合を促進することで DSB 形成に関与していること、そして *Set1* もいくつかの領域において DSB 形成を促進している可能性が示唆された。

<結論>

本研究により次の 2 つが明らかになった。まず、分裂酵母のホットスポットでは *H3K9ac* レベルが高く、*H3K4me3* レベルが低いという一般的な特徴がみられることである。2 つ目は *H3K9* におけるヒストン修飾や *Set1* が分裂酵母の組換え活性化に関与することである。ほとんどのホットスポットにおいて *H3K9ac* レベルが高く、*H3K4me3* レベルが低いことを考慮すると、*H3K9ac* がホットスポット周辺で *Rec12* とクロマチンの相互作用を強めるなどにより DSB 形成を促進し、*Set1* がそれとは異なる機構によって DSB 形成に関与している可能性が推測された。なお、*H3K9A* や *set1Δ* の組換えへの影響が部分的であったことから、他の因子も組換え活性化に関わると考えられる。本研究から、分裂酵母において *H3K9ac* や *Set1* などのクロマチン関連因子が複合的に組換え開始反応を調整していることが示唆された(図)。

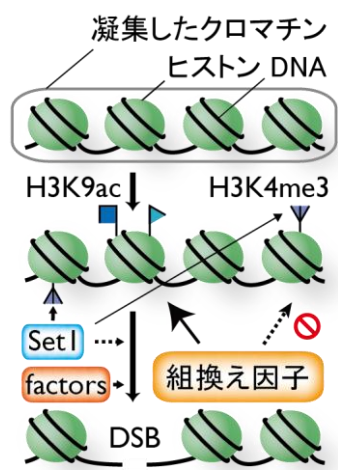


図 分裂酵母における減数分裂期組換え活性化のモデル

減数分裂期組換えが頻発する領域であるホットスポット周辺では、栄養増殖期にヒストンが特徴的な翻訳後修飾を受ける。これにより、*H3K9ac* レベルが高く、*H3K4me3* レベルが低いという、ホットスポット特異的な修飾パターンが形成され、減数分裂期組換え開始まで維持される。減数分裂期のホットスポット周辺はクロマチンの凝集度が低下し、組換え関連因子が結合しやすい状態になる。そして、*H3K9ac* は組換え開始因子の一つである *Rec12* のホットスポットへの結合を促進するなどにより、*H3K4* メチル化酵素 *Set1* はその他の機構により、他の未知の因子群と協調して減数分裂期組換え開始反応である DNA 二重鎖切断(DSB)を誘導する。