

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：32705

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K06353

研究課題名（和文）染色体構造中での減数分裂期相同組換えの開始機構

研究課題名（英文）Initiation of meiotic recombination in chromatin structure

研究代表者

山田 貴富（YAMADA, Takatomi）

鎌倉女子大学・家政学部・准教授

研究者番号：30451850

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：配偶子（精子や卵子など）の形成に重要な減数分裂期相同組換えの仕組みを理解するため、分裂酵母を用いて、種を超えて保存されている染色体関連因子群（ヒストンやその就職酵素）と組換え制御因子群（組換え開始因子）に注目して研究を行なった。染色体制御因子の作用機構や組換え産物制御における機能や組換え制御因子の染色体上の局在位置などが明らかになり、他のモデル生物（特に出芽酵母やマウスなど）との相違点や共通点の一端が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

減数分裂期組換えに関与する因子群は種を超えて保存されているが、各因子の個々の働きや因子間の相互作用の意義等は種ごとに異なる点が多い。分裂酵母を用いて本研究で得られた知見は、この現象の総合的理解の一助になると期待される。特に保存された染色体関連因子の機能について出芽酵母とマウスとの共通点や相違点の複数が見られたことは興味深い。減数分裂や騒動組換えが育種や遺伝子治療の基盤的な現象であることを考えると、今後の様々な生物における技術開発の助けになると思われる。

研究成果の概要（英文）：To understand how meiotic recombination, a pivotal event for gametes production, occurs in chromatin structure, I have studied chromatin regulators such as a histone variant and a histone modifying enzyme as well as recombination initiation factors in fission yeast. This study revealed how a histone variant influences recombination products, how histone methyltransferase-related factors regulate initiation of recombination, and chromatin-binding kinetics of several recombination-related factors. These results along with recent knowledges obtained on other model organisms including mice, budding yeast, and plants, suggest both conserved and diverse aspects of meiotic recombination.

研究分野：遺伝・ゲノム動態

キーワード：減数分裂期組換え 染色体構造 クロマチン ヒストン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

配偶子の形成に重要な減数分裂期相同組換えは、細胞が自身の染色体 DNA をホットスポットと呼ばれる特定の部位において切断することが始まる (DNA 二重鎖切断、DNA double-strand break: DSB)。真核生物における他の多くの DNA 関連現象同様、減数分裂期 DSB 形成は、染色体 DNA がヒストンタンパク質とともに形成する複雑な 3 次元 (高次) 構造の中で起こる。特に、DSB 形成期の減数分裂期染色体は「軸・ループ構造」と呼ばれる特殊な高次構造を形成する。軸・ループ構造において、軸はコヒーシスが染色体 DNA 上に結合した部位に複数の軸因子が集積することで形成され、そこから無数のループが突出する。興味深いことにホットスポットはループ上に位置すると考えられており、この構造が DSB 形成の制御に重要な機能を果たすことが想定されている。しかし、その形成機構や DSB 形成における機能の詳細には研究開始当初の時点のみならず現在においても不明の点が多い。

申請者は分裂酵母を用いて染色体構造下での減数分裂期 DSB 形成機構について、主に染色体構成因子に注目して研究を行ってきた。これまでにホットスポット周辺ではヒストン H3 のリジン 9 のアセチル化 (H3K9ac) が濃縮され、これが DSB 形成を促進することを示し、減数分裂期組換え開始とヒストン修飾への関与を世界で初めて示した (T. Yamada ら 2004 EMBO J.; S. Yamada ら 2013 Nucleic Acids Res.)。また、保存された染色体構成因子 H2A.Z がホットスポットには局在しないものの染色体の全体的な構造の制御を介して DSB 形成を促進することを見出した (S. Yamada ら 2018 Nucleic Acids Res.; S. Yamada ら 2018 Current Genet.)。さらに、出芽酵母での DSB 形成の促進因子として知られるヒストン H3 リジン 4 のメチル化酵素複合体の触媒サブユニット Set1 も出芽酵母とは異なる様式で分裂酵母での DSB 形成を促進することを明らかにしている (S. Yamada ら 2013 Nucleic Acids Res.)。しかし、H2A.Z や Set1 の機能の詳細については不明であった。

分野全体に関しては、分裂酵母以外では出芽酵母、マウス、線虫、シロイヌナズナ等での研究が多い。しかしながら、有力な研究手法はそれぞれに異なっており、また研究開始時点で (また現在においても) 得られた知見はそれぞれの種で DSB 形成制御機構が異なることを示している。従って、多様なモデル生物での詳細な解析が、減数分裂期 DSB 形成の本質を理解するためには必要である。

### 2. 研究の目的

本研究では分裂酵母を用いて、まず軸・ループ構造の構成要素とその染色体結合様式を明らかにする。また、申請者は染色体高次構造の制御への関与が指摘されているヒストン H2A.Z とヒストン H3 リジン 4 メチル化酵素 Set1 が減数分裂期組換えを促進する証拠を得ているので、これらの組換えにおける役割を明らかにする。

### 3. 研究の方法

分裂酵母では変異体を用いた遺伝学的解析とエピトープタグを付加した因子の生化学的解析の両者が有効である。申請者はこれまでの研究を通して多数の減数分裂進行因子、軸因子や DSB 因子の変異体やエピトープタグ付加体を構築している。また、各種因子の染色体 (軸部位やホットスポットなど) 結合を評価するクロマチン免疫沈降 (Chromatin immunoprecipitation: ChIP) 法、DSB 形成を調べるパルスフィールドゲル電気泳動法や Rec12-linkage のクロマチン免疫沈降法、組換え率を測定するランダムスポア法などの実験系は研究開始段階で確立していたが、これをさらに改良しながら、研究を進めた。

### 4. 研究成果

#### (1) 軸構成因子と DSB 因子の染色体結合

研究開始時点において、分裂酵母の軸因子 Rec10 (出芽酵母 Red1 やマウス SYCP2 のオーソログ) や DSB 因子 Rec15 (出芽酵母 Mer2 やマウス IH01 のオーソログ) Rec24 (出芽酵母 Mei4 やマウス MEI4 のオーソログ) は減数分裂期染色体のホットスポットにより強く濃縮することが知ら

れていた。しかし、出芽酵母においてはいずれの因子もホットスポットよりも軸部位に強く局在することが知られており、この相違をより深く調べることにした。特に分裂酵母では結合様式の時間的変化が調べられたことがないため、この点に注目した。

減数分裂に誘導後、経時的に ChIP を行い Rec10、Rec15、コヒーシン Rec8 などのホットスポット、軸部位の結合を解析した。その結果、調べた限りにおいて、Rec8 は常に軸部位にホットスポットより強く結合していたが、Rec10 と Rec15 は常にホットスポットにより強い結合を示すことがわかった。これは出芽酵母と分裂酵母とではコヒーシンを除く軸因子と DSB 因子の染色体結合様式が大きく異なることを示す。最近、マウスの軸因子 SYCP3、DSB 因子 MEI4 や IH01 などは全て、ホットスポットに強く結合することが示された (Biot et al. 2024 Mol. Cell)。以上は、各種 DSB 制御関連因子群の染色体結合の種間での多様性を示すものであると同時に分裂酵母とマウスの間での類似性を示唆するものといえる。

## (2) ヒストン H2A.Z の組換え産物制御への関与

申請者らはヒストン H2A.Z が DSB 形成を促進することを報告しているが、本研究では H2A.Z が組換え産物の制御にも影響を及ぼすことを発見した。減数分裂期 DSB は姉妹染色分体または相同染色体にある (DSB 部位周辺と) 相同な配列により修復されるが、この時の様式によって複数の組換え産物が生じる。中でも DSB 部位の両側で両親由来の染色体がつなぎ変わる「交叉型組換え」は、遺伝的多様性の創出や減数第 1 分裂時の染色体分配に重要である。実際、DSB 量が低下しても交叉型組換えの量を (低下させず) 一定に保つための機構がいくつか提案されている。

分裂酵母 H2A.Z の欠損株では DSB 形成が低下するにも関わらず、調べた限り全ての部位において交叉型組換えは低下しないことがわかった。いくつかの部位においては欠損株において、野生株よりも交叉型組換えが上昇していた。その理由を、DSB 形成を直接的に担う因子 Rec12 (マウス SP011 や出芽酵母 Spo11 のオーソログ) のホットスポット結合に注目して調べたところ、Rec12 結合量が元々低いホットスポットほど H2A.Z による影響を受けないことが明らかになった。以上の結果は、分裂酵母での交叉型組換えを一定に保つ仕組みの存在とそれへの H2A.Z の関与を示すものと考えている。

## (3) ヒストン H3K4 メチル化酵素 Set1 の解析

分裂酵母のヒストン H3K4 メチル化酵素 Set1 は DSB 形成を促進するが、ホットスポット周辺での H3K4 メチル化レベルは高くなく (S. Yamada ら 2013 Nucleic Acids Res.) Set1 がどのような機能を果たすのかは興味深い。本研究では Set1 の DSB 形成における機能を明らかにするため、Set1 に関連する変異体のいくつかを用いて DSB への影響を調べた。中でも、Set1 の活性中心に変異を導入したメチル化酵素喪失変異体や Set1 を触媒サブユニットとする Set1 メチル化酵素複合体のサブユニット Spp1 の欠損株では DSB 形成量が著しく低下していた。このことは Set1 の酵素活性と Spp1 が DSB 形成に影響を及ぼすことを示している。特に Spp1 については、出芽酵母において DSB 因子 Mer2 とホットスポット周辺のメチル化 H3K4 の両者に結合することで軸とホットスポットを連携させて DSB 形成を促進することが提唱されている (Sommermeyer ら 2013 Mol. Cell) 一方で、マウスのオーソログ CXXC1 は DSB 因子の IH01 と結合する (Imai ら 2017 Chromosoma) もの DSB 形成に関与しない (Tian ら 2018 PLoS Genet.) という報告もある。そこで次の項目により、本研究では分裂酵母の Spp1 における機能を探ることにした。

## (4) Set1 複合体のサブユニット Spp1 の解析

Spp1 には PHD ドメインなど種を超えて共通のドメインが存在する。加えて、分裂酵母 Spp1 は N 末端側に天然変性領域が存在する。これらのドメインに欠失あるいは点変異を導入した変異体を複数作製して調べたところ、出芽酵母 Spp1 において DSB 形成に必須の PHD ドメイン中のトリプトファン残基 (種を超えて保存されている: Sommermeyer ら 2013 Mol. Cell) をアラニンに変えても、分裂酵母での DSB 形成に影響がないことがわかった。このため、Spp1 は分裂酵母でも出芽酵母でも DSB 形成に関与するものの、その役割は両方で異なる可能性が考えられた。

また、先進ゲノム支援の協力をいただき、減数分裂期の Spp1 の染色体上での局在位置をクロマチン免疫沈降と次世代シーケンシングで決定しようとしている。

## (5) 期間中に行ったその他のプロジェクト

本研究とは別に、本研究の過程で改良した方法等を用いて、他プロジェクトに貢献した。

軸構成因子 Hop1 の解析

軸構成因子 Hop1 は種間で保存された因子（出芽酵母 Hop1、マウス HORMAD1）であり、DSB 形成を促進する。東京大学の仮屋園遼博士、太田邦史博士との共同研究で、Hop1 が Rec10 や Rec15 とどのように協調して DSB 形成を促進するかという点について考察した（Kariyazono ら 2019 Nucleic Acids Res.）。例えば、分裂酵母 Hop1 は Rec10 や Rec15 と同様にホットスポットに強く濃縮されていることがわかった。この結果も最近の論文で報告されたマウスでの結果に類似していた。ここで得られた結果は(1)と合わせて分裂酵母での軸因子、DSB 因子による DSB 制御機構を理解する手がかりを与えるものといえる。

#### トルラ酵母染色体のパルスフィールドゲル電気泳動による分離

トルラ酵母 (*Candida utilis*) の育種を目指すプロジェクト（三菱商事ライフサイエンス株式会社安川泰史氏、東京大学太田邦史教授）において、実験条件を検討することにより、ゲノム配列の確定していなかったトルラ酵母の染色体をパルスフィールド電気泳動ゲルにおいて分離することに成功した(Yasukawa ら 2022 Commun. Biol.)。

#### 動原体の接着状態を可視化する新規手法の確立

減数分裂時の染色体分配を解析するプロジェクト（静岡大学、山本歩博士）において、姉妹動原体の接着状態を直接的に可視化する方法を染色体接着因子コヒーシンの ChIP を行うことでサポートした(Nambu ら 2022 J. Cell Sci.)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masashi Nambu, Atsuki Kishikawa, Takatomi Yamada, Kento Ichikawa, Yunosuke Kira, Yuta Itabashi, Akira Honda, Kohei Yamada, Hiroshi Murakami, Ayumu Yamamoto	4. 巻 135
2. 論文標題 Direct evaluation of cohesin-mediated sister kinetochore associations at meiosis I in fission yeast	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs259102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.259102	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Taishi Yasukawa, Arisa H. Oda, Takahiro Nakamura, Naohisa Masuo, Miki Tamura, Yuriiko Yamasaki, Makoto Imura, Takatomi Yamada, Kunihiro Ohta	4. 巻 5
2. 論文標題 TAQing2.0 for genome reorganization of asexual industrial yeasts by direct protein transfection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-022-03093-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamada T, Yamada S, Ding DQ, Fujita Y, Takaya E, Hiraoka Y, Murakami H, Ohta K.	4. 巻 743
2. 論文標題 Maintenance of meiotic crossover against reduced double-strand break formation in fission yeast lacking histone H2A.Z	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 144615-
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gene.2020.144615.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamada T, Murakami H, Ohta K.	4. 巻 2119
2. 論文標題 Pulsed-field gel electrophoresis for detecting chromosomal DNA breakage in fission yeast	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 135-143
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-0323-9_12.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kariyazono R, Oda A, Yamada T, Ohta K.	4. 巻 47
2. 論文標題 Conserved HORMA domain-containing protein Hop1 stabilizes interaction between proteins of meiotic DNA break hotspots and chromosome axis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res.	6. 最初と最後の頁 10166-10180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nar/gkz754.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamada S, Kugou K, Ding DQ, Fujita Y, Hiraoka Y, Murakami H, Ohta K, Yamada T	4. 巻 64(5)
2. 論文標題 The conserved histone variant H2A.Z illuminates meiotic recombination initiation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Current Genetics	6. 最初と最後の頁 1015-1019
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00294-018-0825-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Takatomi Yamada, Kunihiro Ohta, Hiroshi Murakami
2. 発表標題 Roles of fission yeast chromatin regulators in meiotic recombination initiation
3. 学会等名 The 11th International Fission Yeast Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大久保辰海 富永達矢 樋口誠一 横堀正敏 村上浩士 太田邦史 山田貴富
2. 発表標題 埼玉県産業技術総合センター北部研究所由来清酒酵母の解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第56回研究報告会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Takatomi Yamada, Kazuto Kugou, Akira Yamashita, Kunihiro Ohta, Hiroshi Murakami
2. 発表標題 Initiation of meiotic recombination in the fission yeast <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
3. 学会等名 第46回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 山田貴富、山田真太郎、村上浩士、太田邦史
2. 発表標題 分裂酵母減数分裂期組換え開始変異体における交叉型組換え維持
3. 学会等名 第26回 DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大久保辰海、中村隆宏、富永達矢、樋口誠一、横堀正敏、太田邦史、山田貴富
2. 発表標題 新規ゲノムシャフリング技術による醸造酵母育種の試み
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第54回研究報告会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田貴富、久郷和人、太田邦史、村上浩士
2. 発表標題 分裂酵母染色体構造中における減数分裂期DNA二重鎖切断機構
3. 学会等名 第25回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田貴富、太田邦史、村上浩士
2. 発表標題 染色体構造中における減数分裂期DSB形成機構
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第52回研究報告会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田貴富
2. 発表標題 Chromatin-mediated control of meiotic recombination in fission yeast
3. 学会等名 遺伝研研究会「有性生殖における染色体・クロマチン・核動態に関する研究会」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山田貴富 太田邦史 村上浩士
2. 発表標題 分裂酵母ヒストンH2A.Zが減数分裂期交差型組換えを制御する可能性の検討
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム 第51回研究報告会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------