

平成30年6月6日現在

機関番号：32641

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26440186

研究課題名(和文) クロマチン構造中での減数分裂期DNA二重鎖切断を制御する因子の探索と機能解析

研究課題名(英文) Mechanism of meiotic DNA double strand break formation in chromatin structure

研究代表者

山田 貴富 (YAMADA, Takatomi)

中央大学・理工学部・助教

研究者番号：30451850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：減数分裂相同期組換えは、染色体上のホットスポット領域でDNA二本鎖が切断(DSB)されることから始まる。申請者らは分裂酵母を用いて、ホットスポット周辺でのアセチル化ヒストンH3リジン9(H3K9ac)やH3K4メチル化酵素Set1とそれらに関連する因子によるDSB形成機構を研究した。まず、ホットスポット周辺領域が減数分裂期に転写されることが、H3K9acを誘起する可能性が考えられた。また、Set1とヒストンH2A.Zとが互いに異なる機構でDSB形成を促進すること、およびH2A.Zが染色体の凝縮度を調節することでDSBを導入する因子の染色体結合を促進することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Meiotic recombination is initiated by programmed DNA double strand breaks (DSBs) formed at hotspots. Using fission yeast as a model system, we have been studying how DSBs are formed in chromatin structure, and previously reported that acetylated histone H3 lysine 9 (H3K9ac) and the histone H3 lysine 4 methyltransferase Set1 are involved in the event. Here, I have extended our analysis by examining roles of H3K9ac and Set1 and factors cooperating with these factors. We found that transcription around the model hotspot *ade6-3049* promotes H3K9ac at this hotspot. This tendency may be universal, as previously reported data sets suggested that transcripts are found in hotspots-surrounding regions. Our analyses also found that Set1 and the histone H2A.Z activates DSB formation in distinct pathways, and that H2A.Z facilitates DSB formation by modulating chromosome compaction to help DSB-related factors bind to chromatin.

研究分野：遺伝・ゲノム動態

キーワード：減数分裂 相同組換え クロマチン DNA二重鎖切断

## 1. 研究開始当初の背景

減数分裂相同期組換えは、配偶子を産生する減数分裂の際に活性化される相同組換えをいう。生物学的意義として、父方由来と母方由来の DNA を混ぜ合わせることで子孫の遺伝情報を多様化することなどがある。従って、染色体生物学や進化学等多くの基礎生物学の観点から興味深い現象といえる。加えて、減数分裂期組換えの不全はダウン症等の原因にもなりうるため、医学的にも重要な研究対象である。

減数分裂期相同組換えの端緒は、細胞が自身の二重鎖 DNA を切断すること(DNA double strand break; DSB)で、この DSB を導入するのは種間で保存されたタンパク質 Spo11 (本研究で用いる分裂酵母ホモログは Rec12 と呼ばれる)である。減数分裂期 DSB 形成は染色体上において均一におこるのではなく、ホットスポットと呼ばれる特定の頻発部位においてよくおこる。

減数分裂期組換えの舞台となる真核生物の染色体 DNA は、高度に凝縮したクロマチン構造をとっている。最も主要なクロマチン構成タンパク質であるヒストンは、DNA のほぼ全長に巻き付いており、全ての DNA 代謝現象に密接かつ多様に関与する。例えば、ホットスポットに存在するヒストンは、Spo11 とホットスポットの相互作用を物理的に阻害する。実際に酵母のホットスポットではヒストンの存在量が低くなっている(Pan ら 2011 Cell; S.Yamada ら 2013 N. A. R)。しかし、減数分裂期組換えの研究における最重要課題である「凝縮したクロマチン構造中でどのようにして DSB が形成されるのか」という点については、いまだに不明の点が多い。

ヒストンは多様な翻訳後修飾を受け、それらの修飾が DNA 代謝と関連することが知られているが、減数分裂期組換えとヒストンの関係については最近まで不明のままであった。申請者らは、分裂酵母の著名な減数分裂期組換えホットスポット *ade6-M26* 周辺で、ヒストン H3 と H4 が高アセチル化されていることを世界に先駆けて発表した(T. Yamada ら. 2004 EMBO J.)。最近では、分裂酵母のホットスポットでは、一般的に H3 のリジン 9 のアセチル化(H3K9ac)が高く、この修飾がホットスポットと Rec12 の結合を安定化して DSB 形成を促進することを明らかにした(S. Yamada ら

2013 NAR)。また、出芽酵母とマウスの大部分のホットスポットでは H3 のリジン 4 がトリメチル化(H3K4me3)されていることが他グループから報告され、ヒトでも H3K4me を触媒する酵素 Prdm9 がホットスポットの位置を規定すると考えられている(Baudat ら 2010 Science, Borde ら 2009 EMBO J.)。特に、出芽酵母ホットスポットでの H3K4me3 は Spo11 を介して DSB 形成を正に制御することが示された(Acquaviva ら 2012 Science など)。

しかし、これらの修飾がなくても部分的に減数分裂期 DSB が形成されるため、他の因子も関与しており、DSB 形成が確実に起こるように複数の因子(経路)が並行して機能している可能性が考えられる。この点で、分裂酵母では、H3K9ac の他に、唯一の H3K4 メチル化酵素 Set1 も部分的に DSB 形成に関与することを、申請者らが報告している(ただし、H3K9 と Set1 の二重変異体は生育が著しく遅く、これらが異なる経路で機能するか否かについては不明)。

なお、分裂酵母のホットスポットでは H3K4me3 は一般的にみられないことから、Set1 はホットスポットの修飾を介さずにホットスポットでの DSB 形成に関わると考えているが、詳細な作用機構は不明である。同様に、ヒストン修飾酵素が、ホットスポットでの修飾とは無関係に DSB 形成を制御するケースが複数知られているが、これらの機構も不明(Mieczkowski ら 2007 P. N. A. S. など)である。

## 2. 研究の目的

ヒストン修飾およびヒストン修飾酵素に注目して、クロマチン構造中での減数分裂期 DSB 形成機構を解明する。高等生物に類似した染色体構造を持ち、様々な実験系の整った分裂酵母を用いる。特に、これまでの研究で、DSB 形成への関与を指摘してきた H3K9ac と Set1 に関連して次の点を明らかにしたい。

(1) H3K9ac と関連して減数分裂期組換えを活性化する因子を同定し、それらの具体的な役割を明らかにする。

(2) ヒストン修飾酵素がホットスポットでの修飾を介さずに DSB 形成を制御する機構を理解するため、分裂酵母 Set1 を例として取り上げ、その作用機序を解明する。

### 3. 研究の方法

(1) H3K9ac と関連して DSB 形成を促進する因子を遺伝学的スクリーニング及び candidate approach により単離することを試みた。遺伝学的スクリーニングに関しては、系の変更を繰り返しながら、現在も条件検討中である。後者に関しては、DSB 形成や組換えへの影響を評価するための解析部位として、*ade6-M26* ホットスポットと *ade6-3049* ホットスポットを用いた。これらは DNA 結合性転写因子である Atf1 に依存して組換えが活性化されること、および高レベルの H3K9ac が見られることが知られていた (Yamada ら N.A.R. 2013 など)。

(2) Set1 の減数分裂期 DSB 形成における役割を明らかにするため、Set1 の各種変異体の DSB 形成に関する表現型をしらべた。また、Set1 と協調して DSB 形成を促進する因子を同定するため、*set1* 欠損株において様々な因子の変異を導入し、DSB 量が大きく低下する二重変異体を探索した。

### 4. 研究成果

(1) モデルホットスポットの一つである *ade6-3049* に注目した解析をおこなった。DNA 結合性転写因子でこのホットスポットの活性化に必要な Atf1 と H3K9ac との関連を示唆する以下のような結果が得られた。まず、Atf1 が実際にこのホットスポットに結合し、周辺での転写を活性化することがわかった。転写活性化とヒストンアセチル化は互いに関連するため、Atf1 による転写活性化が H3K9ac を促進する可能性を検討した。そこで、Atf1 の転写活性化ドメインを同定したところ、以前に報告された組換え活性化に関わるドメイン (Gao et al. 2008 N. A. R.) と同一であることがわかった。このドメインを欠損させると、周辺の転写量が減少するとともに H3K9ac やヌクレアーゼ感受性が低下した。従って、*ade6-3049* ホットスポットでの H3K9ac はその周辺での転写と DSB 形成に関連があることがわかった。なお、既報のデータベースを比較解析した結果、ホットスポット周辺では減数分裂期に転写産物が見られたことから、周辺の転写がホットスポットの H3K9ac を促進する、というシナリオは一般的である可能性が考えられた。以上の結果は、学会及び学術誌にて発表した (Yamada et al. 2017

Genetics など)。

(2) Set1 の機能を探るため、Set1 遺伝子欠損株、Set1 の酵素活性部位に変異を持つ変異体及び H3K4 (Set1 の主要な基質) をメチル化できないアラニンに置換した変異体 (H3K4A) の 3 つの変異体について、染色体レベルでの DSB 形成 (パルスフィールドゲル電気泳動による) と分裂酵母ゲノム中で最も強いホットスポット *mbs1* における DSB 末端に共有結合した Spo11 (DSB 形成の副産物といえる) のクロマチン免疫沈降を行い、DSB 形成に関する表現型を調べた。その結果、DSB 量の低下は、Set1 遺伝子欠損株と Set1 の酵素活性部位に変異を持つ変異体では見られたが、H3K4A 変異体では見られなかった。このことから、Set1 が H3K4 以外の基質をメチル化することで DSB 形成を促進している、という仮説が考えられる。ただし、各種変異体における Set1 タンパク質の存在量や減数分裂進行等は未確認であるため、上記の仮説を検討するには更なる検証が必要である。

また、Set1 欠損と他のクロマチン因子の変異との二重変異株の DSB 形成に関する表現型を調べたところ、Set1 欠損とヒストン H2A.Z の条件変異とを合わせ持つ変異体では DSB がほとんど見られないことを見出した (Yamada ら 未発表)。これは Set1 と H2A.Z が互いに異なる経路において減数分裂期組換え開始に関わることを示している。そこで、H2A.Z の機能を詳細に検討したところ、このヒストンバリエーションは染色体の凝縮度を調節することで DSB に関わる因子の染色体結合を促進し、これにより DSB 形成を活性化することが考えられた。また、調べた限りにおいて、H2A.Z のホットスポット等への局在は見られず、また DSB 関連因子との物理的相互作用も検出できなかった。これらのことから、H2A.Z の機能が (ホットスポットなどの) 局所的なクロマチン構造よりも高次のクロマチン構造を介するものではないかと考えている。以上の H2A.Z に関する知見は学会及び学術誌にて発表した (Yamada et al. 2018 N. A. R.; Yamada et al. 2018 Current Genetics など)。なお、過去の複数の報告から Set1 もクロマチン高次構造の制御に関与している可能性が指摘されている。今後は、Set1 と H2A.Z との関係にも留意して研究を進

める予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

\*は corresponding author を示す。

1. Shintaro Yamada, Kazuto Kugou, Da-Qiao Ding, Yurika Fujita, Yasushi Hiraoka, Hiroshi Murakami, Kunihiro Ohta, Takatomi Yamada\*: The conserved histone variant H2A.Z illuminates meiotic recombination initiation *Current Genetics* in press, 2018 査読有り
2. 山田貴富\* 村上浩士: 生体内における減数分裂期組換えの開始制御 化学と生物 vol. 56 pp.262-271, 2018 査読有り
3. Shintaro Yamada, Kazuto Kugou, Da-Qiao Ding, Yurika Fujita, Yasushi Hiraoka, Hiroshi Murakami, Kunihiro Ohta, Takatomi Yamada\*: The histone variant H2A.Z promotes initiation of meiotic recombination in fission yeast. *Nucleic Acids Research* vol.40 pp.609-620, 2018 査読有り
4. Shintaro Yamada, Mika Okamura, Arisa Oda, Hiroshi Murakami, Kunihiro Ohta, and Takatomi Yamada\*: Correlation of meiotic DSB formation and transcription initiation around fission yeast recombination hotspots *Genetics* vol.206 pp.801-809, 2017 査読有り
5. Naomichi Takemata, Arisa Oda, Takatomi Yamada, Josephine Galipon, Tomoichiro Miyoshi, Yutaka Suzuki, Sumio Sugano, Charles S. Hoffman, Kouji Hirota, and Kunihiro Ohta\*: Local potentiation of stress-responsive genes by upstream noncoding transcription *Nucleic Acids Research* vol. 44 pp.5174-5189, 2016 査読有り
6. Ming Yi Richard Tang, Hui fang Guo, Thi Thuy Trang Nguyen, Liy Sim Low, Rebecca A. Jackson, Takatomi Yamada, and Ee Sin Chen\*: Two fission yeast high mobility group proteins in the maintenance of genome integrity following doxorubicin

insult. *Gene* vol. 562 pp.70-75, 2015 査読有り

[学会発表](計8件)

1. 山田貴富、山田真太郎、久郷和人、丁大橋、藤田侑里香、平岡泰、太田邦史、村上浩士: 「減数分裂期組換え開始におけるクロマチン関連因子の機能」  
第35回染色体ワークショップ・第16回核ダイナミクス研究会合同開催 西尾 2017年12月
2. 山田貴富、太田邦史、村上浩士: 「分裂酵母ヒストン H3K4 メチル化酵素 Set1 複合体の減数分裂期組換えへの関与」  
酵母遺伝学フォーラム第50回研究報告会、東京 2017年9月
3. 山田真太郎、岡村美佳、村上浩士、太田邦史、山田貴富: 「分裂酵母の減数分裂期組換えホットスポットにおける転写と組換えの関係」  
酵母遺伝学フォーラム第49回研究報告会、神戸 2016年9月
4. Shintaro Yamada, Kazuto Kugou, Yurika Fujita, Hiroshi Murakami, Kunihiro Ohta, and Takatomi Yamada “:Histone H2A.Z promotes meiotic DNA double strand break formation in fission yeast.”  
Gordon Research Conference Meiosis, USA, July 2016, Poster presentation
5. 山田真太郎 藤田侑里香 久郷和人 村上浩士 太田邦史 山田貴富: 「分裂酵母ヒストン H2A.Z の減数分裂期組換え開始への関与」  
第33回染色体ワークショップ・第14回核ダイナミクス研究会合同開催 仙台 2016年1月
6. Shintaro Yamada, Yurika Fujita, Kazuto Kugou, Hiroshi Murakami, Kunihiro Ohta, and Takatomi Yamada: “ Histone H2A.Z regulates initiation of meiotic recombination in fission yeast ”  
The EMBO Conference on Meiosis (4<sup>th</sup>), UK, September 2015, Poster presentation
7. Shintaro Yamada, Yurika Fujita, Kazuto Kugou, Hiroshi Murakami, Kunihiro Ohta, and Takatomi Yamada: “ Histone H2A.Z promotes meiotic DNA double-strand breaks in fission yeast ”  
The Eighth International Fission Yeast

Meeting, Japan, June 2015, Oral presentation

8. 山田真太郎 藤田侑里香 久郷和人  
村上浩士 太田邦史 山田貴富:「ヒストン  
H2A.Zの減数分裂期組換えへの関与」

酵母遺伝学フォーラム第47回研究報告会、  
東京 2014年9月

〔図書〕(計1件)

Takatomi Yamada\* and Kunihiro Ohta\*:  
Regulation of recombination by chromatin  
in *DNA Replication, Recombination and  
Repair: Molecular Mechanisms and  
Pathology*, Springer, Edited by F. Hanaoka  
and K. Sugawara pp.111-129, 2016

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山田 貴富 (YAMADA, Takatomi)  
中央大学・理工学部・助教  
研究者番号: 30451850

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし