

博士論文

染色体高次構造による減数分裂組換え開始制御

伊藤 将

目次

要旨	1
略語一覧	3
1.序論	4
1-1.減数分裂期の遺伝的組換えの研究意義	4
1-2.遺伝的組換えを開始する DNA 二本鎖切断 (DSB) 制御機構	8
1-3.本研究の課題	16
2.材料と方法 (分裂酵母)	19
2-1.分裂酵母株	19
2-2.分裂酵母の減数分裂誘導	22
2-3.クロマチン免疫沈降 (ChIP)	22
2-4.ChIP-chip によるタンパク質の DNA 結合領域の決定	25
2-5.sequential ChIP (re-ChIP)	26
2-6.共免疫沈降	28
2-7.共免疫沈降 (クロスリンクあり)	28
2-8.ウェスタンブロット	30
3.材料と方法 (出芽酵母)	31
3-1.出芽酵母株	31
3-2.出芽酵母の減数分裂誘導	33
3-3.クロマチン免疫沈降 (ChIP)	33
3-4.ChIP-seq によるタンパク質の結合ピークの検出	35

3-5.サザンハイブリダイゼーション	36
3-6.permutation test による軸部近傍での DSB ホットスポット頻度の評価	39
4.<第 1 章> 結果	41
4-1.分裂酵母においても DSB はループで形成される	41
4-2.Rec15 は Rec10 依存的に軸部に結合する	41
4-3.Rec15 は Rec24/Mde2 依存的に DSB ホットスポットに結合する	43
4-4.Rec10 の DSB ホットスポットへの結合は Mde2 及び SFT 複合体に依存する	44
4-5.Mde2 は複製チェックポイントと連係し、SFT 複合体を DSB ホットスポットにおいて安定化して DSBC 複合体を呼び込む	53
5.<第 1 章> 考察	57
5-1.染色体高次構造による DSB 制御モデル	57
5-2.Mde2/SFT 複合体の呼び込みにおける局所的なクロマチン構造の役割	60
5-3.Rec15 は軸-ループ相互作用の核である	60
5-4.Mde2 (リエゾン因子) は複製チェックポイントと連係して 軸-ループ相互作用を介した DSB 形成機構を制御する	61
6.<第 2 章> 結果	64
6-1.Rec8 結合部位間の距離	64
6-2.Rec8 結合部位近傍に形成される DSB コールドスポット	70
6-3.軸部近傍における Gal4BD-Spo11 依存的な DSB 形成	73
6-4.DSB 形成時における Spo11 の軸部への結合	77
6-5.Rec8 結合部位近傍における H3K4 の低メチル化	80

7.<第2章> 考察	87
7-1.出芽酵母、分裂酵母、及びマウスにおけるループの長さ	87
7-2.Rec8 結合部位近傍における DSB コールドスポット形成	88
7-3.Rec8 結合部位近傍における DSB 抑制機構	90
7-4.軸部近傍における DSB コールドスポット形成の意義	94
8.総括	95
9.謝辞	96
10.参考文献	97

要旨

生命が存続し続ける上で、子孫にゲノムを安定的に継承することが不可欠である。また、多様性を持った子孫を獲得することは、生命が環境の変化に適応し、進化して行く上で、極めて重要である。

真核生物は、子孫を継承する際に減数分裂を行う。この際に、両親由来の相同な染色体間で組換えを起こす（遺伝的組換え）。この組換えは、配偶子に多様な遺伝情報を継承するだけでなく、配偶子への正常な染色体分配にも必須である。すなわち、減数分裂期の遺伝的組換えは、多様な子孫を安定的に獲得する上で不可欠なプロセスである。

減数分裂期の遺伝的組換えは、DNA 二本鎖切断（double-strand breaks; DSBs）によって開始される。DSB 形成は、遺伝的組換えの初期反応として組換えの“場所”と“頻度”を決定する極めて重要な反応であると考えられる。

DSB は種間でよく保存された Spo11 タンパク質と、複数の Spo11 補助因子の働きによって形成される。DSB は染色体上において一様な頻度で起こるわけではなく、高頻度で起こる“ホットスポット”が存在する。全てのホットスポットに共通の DNA 配列は存在せず、ホットスポットがどのようにして決定されるのかは、未だ明らかになっていない。しかしながら、近年、減数分裂期に特異的に見られる染色体の高次構造が DSB の制御に重要な役割を果たす可能性が示唆されてきた。

減数分裂前 DNA 複製を終えた染色体は、姉妹染色分体を接着するコヒーシン及び複数の軸因子によって構成される“軸部”と、そこから遊離した“ループ部”からなる三次元的な高次構造を形成する。先行研究により、DSB ホットスポットの大部分がループに位置することが示された。これに対し、Spo11 補助因子がループではなく軸部に結合する、という観察結果が報告された。このパラドックスを解決する考え方と

して、ループに位置する DSB ホットスポットと軸部が連結することで DSB が形成されるという、“軸-ループ連結モデル”が提唱された。しかしながら、軸-ループの連結を介した DSB 制御の分子機構の詳細は明らかになっていない。

そこで本研究では、軸-ループ構造による DSB 制御の分子機構の解明を試みた。まず、分裂酵母を用いて、ChIP-chip 法により DSB 因子の局在をゲノムワイドに検証した。その結果、軸因子 Rec10 が、他の DSB 因子の軸部結合の基盤となることが明らかになった。さらに Rec10 が軸部に加えて、Mde2 依存的にループの DSB ホットスポットにも結合することが明らかになった。これはすなわち、Mde2 によって軸-ループ連結が誘導されることを示唆する。Mde2 は複製チェックポイントの支配を受けて、DNA 複製完了後に発現が誘導される。これらの結果から、Mde2 は軸-ループ連結という染色体高次構造の変化と DNA 複製チェックポイントを連係させるリエゾン因子として、DSB 形成を時空間的に制御する、という新規の概念を提唱した。

続いて、出芽酵母においてコヒーシン Rec8 の局在を ChIP-seq 法により高解像度で明らかにし、先行研究により示されている高解像度の DSB の分布と比較することで、軸部と DSB ホットスポットの位置関係を詳細に解析した。その結果、Rec8 結合部位、すなわち軸部近傍において DSB ホットスポットの頻度が顕著に低いことを示した。転写因子 Gal4 の DNA 結合ドメインと Spo11 を融合した Gal4BD-Spo11 を軸部近傍に強制結合させたところ、DSB 形成が抑制されることが明らかになった。さらに、軸部近傍において、H3K4me3 レベルが低下していることを明らかにした。先行研究において、DSB ホットスポット周辺に見られる H3K4me3 が DSB ホットスポットと軸部の連結を促進する可能性が示唆されている。軸部近傍では H3K4me3 レベルが低いために軸-ループ連結が起こりにくく、結果として DSB ホットスポットが形成されにくいのではないかと考えられる。

略語一覧

BSA (Bovine serum albumin)

CDK (Cyclin-dependent kinase)

ChIP (Chromatin immunoprecipitation)

DDK (Dbf4-dependent kinase)

DSB (Double-strand break)

EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)

EGTA (Ethylene glycol tetraacetic acid)

HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid)

HU (Hydroxy urea)

MNase (Micrococcal nuclease)

MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid)

NDR (Nucleosome-depleted region)

ORF (Open reading frame)

PBS (Phosphate-buffered saline)

PHD (Plant homeodomain)

SDS (Sodium dodecyl sulfate)

TBS (Tris-buffered saline)

TE (Tris-EDTA)

TSS (Transcription start site)

TTS (Transcription termination site)

UAS (Upstream activator sequence)

1. 序論

1-1. 減数分裂期の遺伝的組換えの研究意義

生命が生存し続ける上で、ゲノムを安定的に維持し、子孫へと継承して行くことが不可欠である。

生命は増殖を行う際に、DNA 複製によりゲノム DNA を倍加させる。この DNA 複製時に生じる DNA 損傷は、損傷した DNA を無傷の相同な DNA と組換える（相同組換え）ことで修復される。また、ゲノムは放射線など外的要因によっても損傷を受けるが、これらの損傷も同様に相同組換えによって修復される。このように生命は、不可避な DNA 損傷を修復する際に相同組換えを利用することで自発的なゲノム再編成を抑制し、ゲノムを安定的に維持している。

これとは逆に、生命が積極的にゲノム再編成を誘導する現象が存在する。減数分裂期の遺伝的組換えである。

真核生物はゲノムを子孫に継承する際に減数分裂を行う。この過程において、両親から受け継いだ相同な染色体（相同染色体）は、DNA 複製を経て姉妹染色分体を形成した後、相同染色体間の組換え（遺伝的組換え）を行い、その後、2 回の連続的な分裂を経て、配偶子（精子・卵子等）を形成する（図 1A）。遺伝的組換えにおいて、生命は自発的に DNA を切断した後、相同染色体間の組換えにより修復を行うことで両親由来の遺伝情報をシャッフルし、多様な遺伝情報を持った子孫を獲得する。生命は自身の持つゲノムを切断するという危険な行為を経て、子孫に多様なゲノムを伝承するのである。さらに、この遺伝的組換えによって生じる相同染色体間の物理的な接着（キアズマ）は、配偶子形成に必要な染色体分配をも保証する。

この遺伝的組換えは、DNA 複製、転写といった他の DNA 代謝とは異なり、新たなゲノムを創出する唯一の生命現象である。遺伝的組換えにより多様性を獲得すること

で、生命は環境の変化に迅速かつ適切に対応し、持続的に存続することが可能になる。
減数分裂期の遺伝的組換え機構を解明することは、生物の生命継承原理の理解に繋がる、学術的に極めて重要な研究課題である。

加えて、本研究の成果は、減数分裂期の組換え異常に由来すると考えられるダウン症や不妊症などの疾患原因の解明にも役立つと考えられる。

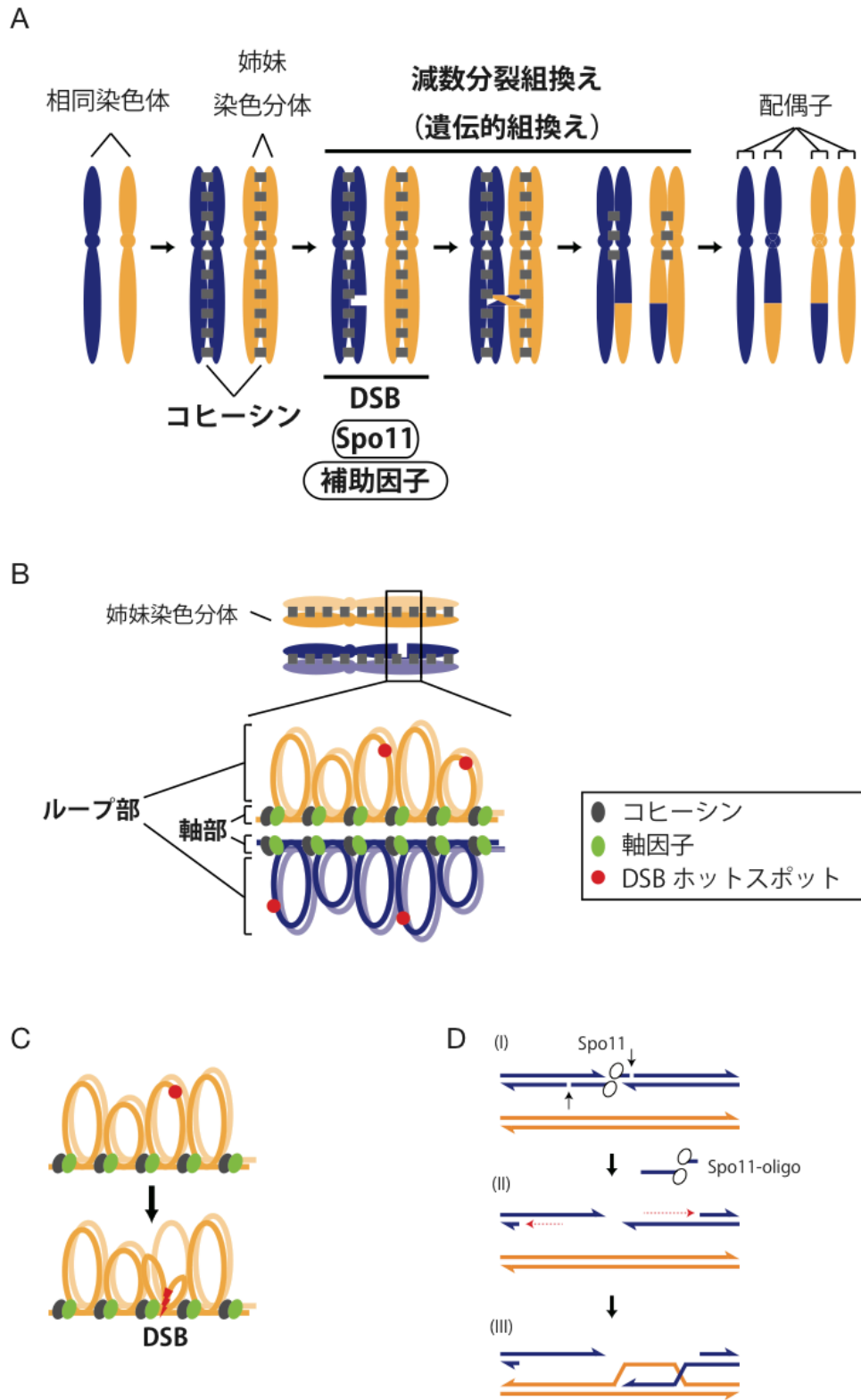


図 1. 減数分裂の進行と軸-ループ連結を介した遺伝的組換え開始 (DSB) 制御

(A) 減数分裂の進行と減数分裂組換え（遺伝的組換え）。減数分裂前 DNA 複製によって形成された姉妹染色分体は、コヒーシンによって繋ぎ止められる。相同組換え（遺伝的組換え）は DNA 二本鎖切断（double-strand breaks; DSBs）によって開始され、DSB は相同組換えによって修復される。相同組換えを終えた染色体は 2 回の連続的な染色体分配を経て、半数体の配偶子（精子・卵子等）を形成する。

(B) 減数分裂期特異的な軸-ループ構造。軸部は、コヒーシン及び複数の軸因子によって形成される。DSB ホットスポットは大部分がループに存在する。

(C) 軸-ループ連結を介した DSB 制御。ループに位置する DSB ホットスポットは、軸部との連結（軸-ループ連結、軸-ループ相互作用）を介して DSB を形成すると考えられている。

(D) DSB 導入後の組換え反応。Spo11 は DSB を導入した後、DNA と共有結合する。その後、エンドヌクレアーゼによる DNA 一本鎖切断を受け（黒矢印）、Spo11 と短い DNA の複合体（Spo11-oligo）は染色体から除去される（段階 I）。Spo11-oligo が除去された染色体 DNA はエキソヌクレアーゼによる加工（赤矢印）を受け、3'突出末端を生じる（段階 II）。突出した DNA 末端は無傷の相同染色体の DNA 二本鎖へと侵入し、相同鎖間の対合と DNA 合成を経て修復される（段階 III）。

1-2. 遺伝的組換えを開始する DNA 二本鎖切断 (DSB) 制御機構

前述の通り、遺伝的組換えは自発的な DNA 二本鎖の切断 (DNA double-strand breaks: DSBs) によって開始される。遺伝的組換えが“どこ”で“どの程度”起こるかが、その後の染色体分配、配偶子 (子孫) の多様性に大きな影響を与える。DSB 形成は、遺伝的組換えの初期段階として組換えの“場所”及び“頻度”を決定する、極めて重要な反応であるといえる。

DSB は染色体上において一様な頻度で起こるのではなく、高頻度で起こる“DSB ホットスポット”が存在する。全ての DSB 部位に共通な DNA 配列は見つかっておらず、転写因子による結合、局所的なクロマチン構造、染色体高次構造などの様々な要因によって DSB 部位は決定されと考えられているが (Pan *et al.* 2011)、詳細な機構は明らかになっていない。

DSB は種間でよく保存された Spo11 によって導入される (Keeney *et al.* 1997)。Spo11 は II 型トポイソメラーゼ様のタンパク質であり、DSB 形成には、Spo11 に加えて複数の Spo11 補助因子が必要である。Spo11 及び Spo11 補助因子 (以下、総称して DSB 因子とする) は酵母からマウスまで保存されているが (表 1)、各因子がどのように機能することで DSB 形成を制御しているかは、不明の点が多い。

以下では、DSB 因子、局所的なクロマチン構造、及び染色体高次構造による DSB 制御機構について、先行研究により得られた知見を記述する。

表 1. DSB 因子の保存性

<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>M. musculus</i>	References
Rec6	-	-	(Lin & Smith 1994; Ponticelli & Smith 1989; Cervantes <i>et al.</i> 2000)
Rec7	Rec114	REC114	(Kumar <i>et al.</i> 2010; Molnar <i>et al.</i> 2001; Ponticelli & Smith 1989)
Rec12	Spo11	SPO11	(De Veaux <i>et al.</i> 1992; Lin & Smith 1994)
Rec14	Ski8	-	(De Veaux <i>et al.</i> 1992; Evans <i>et al.</i> 1997)
Rec15	Mer2	-	(De Veaux <i>et al.</i> 1992; Lin & Smith 1995a)
Rec24	Mei4	MEI4	(Kumar <i>et al.</i> 2010; Martin-Castellanos <i>et al.</i> 2005; Steiner <i>et al.</i> 2010)
Mde2	-	-	(Gegan <i>et al.</i> 2005)
Rec10	Red1	-	(Lin & Smith 1995b; Lorenz <i>et al.</i> 2004; Ponticelli & Smith 1989)
-	Rec102	-	
-	Rec104	-	

1-2-1. DSB 因子による DSB 制御

Spo11 は DSB ホットスポットにおいて DSB を導入後、DNA に共有結合する。DSB に続いて起こるエンドヌクレアーゼによる DNA 一本鎖切断により、Spo11 と短い DNA (short oligos; $\sim 21\text{-}37$ nt と ≤ 12 nt の二種類) による複合体 (Spo11-oligo) は染色体 DNA から除去される (Neal *et al.* 2005)。Spo11-oligo が除去された染色体 DNA は、エキソヌクレアーゼによる加工を受け、数百 bp 程度の 3' 突出末端を生じる。これが無傷の相同染色体の DNA 二本鎖へと侵入し、相同鎖間の対合と DNA 合成を経て修復される (図 1D、Keeney 2001)。

出芽酵母においては、9 個の Spo11 補助因子が DSB 形成に必要である。Spo11 を含むこれら 10 個の DSB 因子は 4 種の複合体 (Spo11-Ski8、Rec102-Rec104、Mer2-Mei4-Rec114、Mre11-Rad50-Xrs2) を形成する (図 2A、Arora *et al.* 2004; Jiao *et al.* 2003; Kee *et al.* 2004; Li *et al.* 2006; Maleki *et al.* 2007)。

Spo11-Ski8 複合体は DNA 切断反応を触媒する上で核となる。Rec102-Rec104 複合体は Spo11-Ski8 複合体及び Mer2-Mei4-Rec114 複合体と相互作用する。Mer2 はコイルドコイルドメインを有し、CDK (サイクリン依存キナーゼ) 及び DDK (Cdc7-Dbf4 キナーゼ、Dbf4 依存キナーゼ) による段階的なリン酸化を受ける。このリン酸化は DSB 形成に必須であり (Henderson *et al.* 2006; Sasanuma *et al.* 2008; Wan *et al.* 2008)、DDK による Mer2 のリン酸化は減数分裂前 DNA 複製後に起こると考えられている (Murakami & Keeney 2008; Blitzblau & Hochwagen 2013)。DSB は通常 DNA 複製後に形成されるが (Borde *et al.* 2000)、Mer2-Mei4-Rec114 複合体は、DNA 複製と共役して行われる DSB 形成制御に重要な役割を果たす。Mre11-Rad50-Xrs2 複合体は多くの種で DSB 形成後の DNA 修復に関与しているが、出芽酵母においては DSB 形成自体に必須である。

分裂酵母においては、遺伝学的解析により 6 個の Rec12 (出芽酵母 Spo11 ホモログ) 補助因子 (Rec6、Rec7、Rec14、Rec15、Rec24、Mde2) が同定された (De Veaux *et al.* 1992; Gregan *et al.* 2005; Martin-Castellanos *et al.* 2005; Ponticelli & Smith 1998)。Rec14、Rec7、Rec24 はそれぞれ出芽酵母 Ski8、Rec114、Mei4 のホモログである。Rec15 は分裂酵母の DSB 因子の中で唯一コイルドコイルドメインを有することから、出芽酵母 Mer2 のホモログではないかと考えられる。Mde2 は配列相同検索からはホモログの存在が示されていない。分裂酵母 Mei4 (出芽酵母 Mei4 のホモログとは異なる) は減数分裂後期の進行を制御する重要な転写因子であり、Mde2 は Mei4 によって発現が制御される遺伝子群 (Mei4-dependent expression) の 1 つとして同定された。

所属研究室の先行研究により、分裂酵母の DSB 因子は、SFT 複合体 (Rec7-Rec15-Rec24、seven-fifteen-twenty four) と DSBC 複合体 (Rec6-Rec12-Rec14、DSB core) を形成し、Mde2 が SFT 複合体の Rec15 及び DSBC 複合体の Rec14 と相互作用することが明らかになった (図 2B、三好ら 2012)。

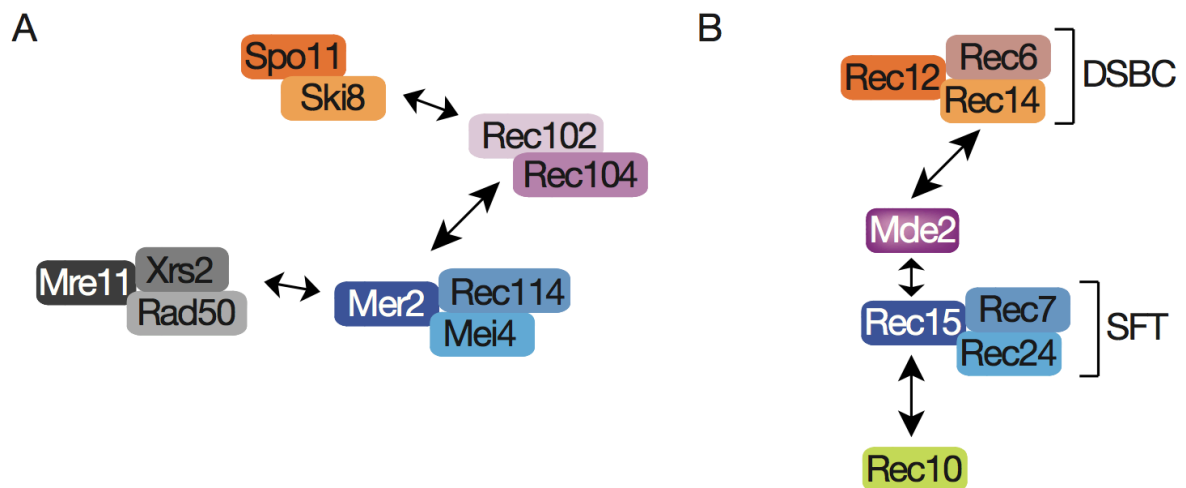


図 2. 出芽酵母及び分裂酵母における DSB 因子複合体

(A) 出芽酵母 Spo11 と補助因子。

(B) 分裂酵母 Rec12 (Spo11 ホモログ) と補助因子。

1-2-2. クロマチン構造による DSB 制御

DSB の制御において重要な役割を果たす要因の 1 つとして、局所的なクロマチン構造が挙げられる。出芽酵母を用いた先行研究により、調べられた複数の DSB ホットスポットはヌクレアーゼによって切断されやすい“開いた”クロマチン構造を形成していることが明らかになった (Ohta *et al.* 1994; Wu & Lichten 1994)。また、ゲノムワイド解析により、出芽酵母の DSB ホットスポットは主にヌクレオソーム非存在領域 (nucleosome-depleted regions; NDRs) に存在し、その大部分が遺伝子のプロモーター領域に位置することが示された (Keeney 2008; Lichten 2008; Lichten & de Massy 2011; Pan *et al.* 2011)。分裂酵母の DSB ホットスポットの多くは長い遺伝子間領域に存在するが、これらの DSB ホットスポットの多くが NDR に位置することが近年明らかになった (de Castro *et al.* 2012)。これらの報告から、DSB ホットスポット周辺はクロマチンが開いた構造を取り、Spo11 等の DSB 因子が機能しやすい状態であることが示唆されている。

DSB 制御に重要な役割を果たす局所的なクロマチン構造のもう 1 つの要因として、ヒストン修飾が挙げられる。

出芽酵母においては、ヒストンメチル化酵素 Set1 によって引き起こされるヒストン H3 の 4 番目のリジン残基のトリメチル化 (H3K4me3) が DSB ホットスポット周辺で見られる (Borde *et al.* 2009)。DSB ホットスポット周辺の H3K4me3 はマウスにおいても見られ、ヒストンメチル化酵素 Prdm9 がマウスの DSB ホットスポットの決定に重要な役割を果たすことが、近年明らかになった (Baudat *et al.* 2010; Myers *et al.* 2010; Parvanov *et al.* 2010)。一方、分裂酵母の DSB ホットスポット周辺においては、H3K4me3 ではなく H3K9 のアセチル化 (H3K9ac) が見られる (Yamada *et al.* 2004; Yamada *et al.* 2013)。

このように DSB ホットスポットとヒストン修飾には相関関係が見られるが、特定のヒストン修飾を示す全ての部位が DSB ホットスポットになるわけではない。逆に DSB ホットスポットであっても、上記のようなヒストン修飾が見られないものも存在する。

これと対応する観察結果として、ヒストン修飾酵素やヒストン修飾残基の変異体における表現型が、必ずしも予測通りにならないケースが存在する。例えば、出芽酵母の *Set1* 欠損株及び *H3K4A* 変異体では、一部のホットスポットで DSB の頻度が著しく低下するものの、DSB が完全に消失するわけではない (Borde *et al.* 2009; Sollier *et al.* 2004; Sommermeyer *et al.* 2013)。一方、分裂酵母では *H3K9A* 変異体において DSB の頻度の低下は見られるものの、影響は部分的に留まる。また DSB ホットスポット周辺で H3K4me3 は見られないが、*Set1* の欠損株で DSB への影響が観察される (Yamada *et al.* 2013)。

マウスの場合は、多くの DSB ホットスポットが、ヒストンメチル化酵素の 1 つである *Prdm9* が有する zinc finger の認識配列と一致する部位に見られる。これらの DSB ホットスポット周辺で検出される H3K4me3 レベルは、転写開始点 (transcription start site; TSS) に比べて高くはない。興味深いことに、*Prdm9*^{-/-} マウスでは、DSB ホットスポットの場所が TSS 近傍へと変化する (Brick *et al.* 2012)。

このように、ヒストン修飾を介した DSB の制御は種によって異なる上に、重層的かつ複雑である。

1-2-3. 染色体高次構造による DSB 制御

局所的な制御に加えて、DSB 形成制御において極めて重要な役割を果たすのが、染色体高次構造である。減数分裂前 DNA 複製の進行に伴い、コヒーシンによる姉妹

染色分体間の接着が起こる。DNA 複製後の染色体は、コヒーシン及び複数の軸因子（出芽酵母 Red1、分裂酵母 Rec10、マウス SYCP3 など）によって形成される“軸部”と、そこから外側に遊離する“ループ部”からなる三次元的な高次構造を形成する（図 1B）。

出芽酵母 *rad50S* 変異体（この変異体では DSB が修復されずに蓄積するため、DSB 部位の検出が簡便である）における DSB 部位の分布と、コヒーシンの分布を比較した結果、DSB がコヒーシン結合部位の間の領域、すなわちループ部で生じることが明らかになった（図 1B、Blat *et al.* 2002; Glynn *et al.* 2004; Kugou *et al.* 2009）。

DSB がループ部で形成されることと一見して矛盾するが、Mer2-Mei4-Rec114 複合体などの Spo11 補助因子が軸部に局在することが報告されている（Panizza *et al.* 2011）。このパラドックスを解く考え方として、ループ部に位置する DSB ホットスポットは軸部と連結することで Spo11 を活性化し、DSB を形成する、という“軸-ループ連結”モデルが提唱されている（図 1C、Blat *et al.* 2002; Kleckner 2006）。

軸-ループ構造による DSB 形成制御において極めて重要な役割を果たすのが、コヒーシン Rec8 である。Rec8 は減数分裂期においてのみ発現する、コヒーシンのクライシンサブユニットである。Rec8 は軸因子（出芽酵母 Red1、Hop1、分裂酵母 Rec10）の軸部への結合に必要であることが既に報告されている（Klein *et al.* 1999; Panizza *et al.* 2011; Lorenz *et al.* 2006）。出芽酵母の軸因子 Red1 及び Hop1 は通常レベルの DSB 形成に必要であり、分裂酵母の軸因子 Rec10（出芽酵母 Red1 ホモログ）は DSB 形成に必須である（Hollingsworth & Ponte 1997; Mao-Draayer *et al.* 1996; Blat *et al.* 2002; Ellermeyer & Smith 2005）。

また、所属研究室の先行研究により、Rec8 を欠損した出芽酵母において、DSB 形成が領域特異的な影響を受け、多くの染色体領域で DSB の頻度が低下することが明

らかになっている (Kugou *et al.* 2009)。さらに、Spo11 が DSB 形成前に軸部において Rec8 と共局在することが示されている (Kugou *et al.* 2009)。

マウスにおいては、Rec8 に加えて Rad21L が減数分裂期特異的に発現するが (Ishiguro *et al.* 2011; Lee & Hirano 2011)、Rec8 と Rad21L の二重欠損マウスにおいて、軸因子 SYCP3 は軸部に完全に局在できなくなる (Llano *et al.* 2012)。

以上の結果から、コヒーシン Rec8 は軸-ループ構造の基盤として軸因子及び DSB 因子の軸部への局在を制御し、DSB の頻度及び場所を空間的に制御する可能性が示唆される。

1-3. 本研究の課題

本研究では、軸-ループ構造による遺伝的組換え開始 (DSB 形成) 制御の分子機構の解明を試みた。実験対象として、分裂酵母及び出芽酵母を用い、主な実験手法として、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) と高解像度ゲノムタイリングアレイを組み合わせた ChIP-chip 法、あるいは ChIP と次世代シーケンサーを組み合わせた ChIP-seq 法を用いることで、Rec8 及び DSB 因子の染色体上の局在をゲノムワイドに検証した。

1-3-1. <第 1 章> 分裂酵母における DSB 制御機構

(Mde2 による複製チェックポイントと連係した軸-ループ連結制御)

まず、分裂酵母を用いて、軸-ループ構造による DSB 制御の分子機構について解析を行った。まず、Rec8 の結合部位を ChIP-chip 法によりゲノムワイドに調べ、“軸部”を決定した。これにより、分裂酵母においても DSB がループで起こることを確認した。また、SFT 複合体の構成因子の局在も ChIP-chip 法により解析した。その結果、これらの因子は、軸因子 Rec10 依存的に軸部へと結合し、Mde2 と共に安定的にルー

ブ上の DSB ホットスポットに結合することが示された。この結果は、軸因子 Rec10 が軸部において SFT 複合体の結合の基盤となることを示している。加えて、Rec10 が Mde2 依存的にループ上の DSB ホットスポットにも結合することを示した。Mde2 は複製チェックポイントの支配を受けて、DNA 複製完了後に発現が誘導される。従って、Mde2 は軸-ループ相互作用という染色体高次構造の変化と DNA 複製チェックポイントを連係させる、DSB の重要な時空間制御因子であるという、新規の分子メカニズムを提唱することにした。

1-3-2. <第 2 章> 出芽酵母における DSB 制御機構

(軸部近傍における DSB コールドスポット形成)

出芽酵母においては、分裂酵母 Mde2 のホモログは見つかっておらず、Mde2 のように発現が複製チェックポイントによって制御される DSB 因子も存在しない (Blitzblau & Hochwagen 2013)。近年、COMPASS 複合体 (Complex Proteins Associated with Set1) の Spp1 が、PHD フィンガーによって DSB ホットスポット周辺の H3K4me3 を認識し、軸部に局在している Mer2 との相互作用することで、ループ上の DSB ホットスポットと軸部の連結を促進するのではないかという仮説が提唱されている (Acquaviva *et al.* 2013; Sommermeyer *et al.* 2013; Borde & de Massy 2013)。しかし、前述の通り、H3K4me3 を示す全ての部位が DSB ホットスポットになるわけではなく、軸-ループ連結を介した DSB 制御の詳細な機構は明らかになっていない。

本研究ではまず、ChIP-seq 法により Rec8 の局在を高解像度で調べ、近年明らかになった高解像度の DSB 部位の分布と比較することで、軸部と DSB 部位の位置関係を詳細に検証した。その結果、DSB ホットスポットはループ内にほぼ一様に存在するが、軸部 (Rec8 結合部位) 近傍では、その頻度が顕著に低いことを示した。転写因

子 Gal4 の DNA 結合ドメイン (Gal4BD) と Spo11 を融合し、ループ部あるいは軸部近傍に強制結合させたところ、軸部近傍においてのみ Gal4BD-Spo11 による DSB が抑制されることが明らかになった。この原因として考えられることの 1 つとして、軸部における H3K4me3 レベルの低下を明らかにした。すなわち、軸部近傍では H3K4me3 レベルが低いために軸-ループ連結が形成されにくく、結果として Spo11 による DNA 切断活性が局所的に抑制され、DSB ホットスポットが形成されにくいのではないかと考えられる。

2. 材料と方法（分裂酵母）

2-1. 分裂酵母株

全ての実験において、同調性の高い減数分裂誘導を行うために、*pat1-114* 半数体の温度シフトによる減数分裂誘導系を用いた (Iino & Yamamoto 1985)。各タンパクの C 末端への FLAG 及び HA タグの付加は、pSLF172 ベクターを用いた形質転換により行った (Forsburg & Sherman 1997)。各遺伝子の欠損株は、遺伝子の ORF 内に薬剤耐性遺伝子マーカー (hygromycin (*hph*), Clonnat/noursethecin (*nat*)) を挿入した DNA 断片を PCR 増幅し、内在性の遺伝子をマーカーを挿入した DNA 断片で置換することにより作成した。使用した分裂酵母株は表 2 に示した。OTM 株は、三好博士から供与された。

表 2. 本研究で使用した分裂酵母株

	Strain	Genotype
図3A	OTM587	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 mde2-3HA:ura4⁺</i>
	OTM598	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec15-3Flag:kanMX6 mde2-3HA:ura4⁺</i>
図3B	OTM413	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec15-3Flag:kanMX6</i>
	OTM598	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec15-3Flag:kanMX6 mde2-3HA:ura4⁺</i>
図3C	OTM611	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec14-3HA:ura4⁺</i>
	OTM651	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 mde2-3Flag:kanMX6 rec14-3HA:ura4⁺</i>
図3D	OTM658	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 mde2-3Flag:kanMX6</i>
	OTM651	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 mde2-3Flag:kanMX6 rec14-3HA:ura4⁺</i>
図3E	OTM688	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec24-3HA:ura4⁺</i>
	OTM660	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec15-3Flag:kanMX6 rec24-3HA:ura4⁺</i>
	OTM727	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec15-3Flag:kanMX6 rec24-3HA:ura4⁺ rec12::hygMX6</i>
	OTM742	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec15-3Flag:kanMX6 rec24-3HA:ura4⁺ mde2::hygMX6</i>
図3F	OTM611	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec14-3HA:ura4⁺</i>
	OTM708	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec12-3Flag:kanMX6 rec14-3HA:ura4⁺</i>
	OTM760	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec12-3Flag:kanMX6 rec14-3HA:ura4⁺ mde2::natMX6</i>
図4	OTM540	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec24-3Flag:kanMX6 rec8-3HA:ura4⁺</i>
	OTM595	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec10-3Flag:kanMX6 rec7-3HA:ura4⁺</i>
	OTM416	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec15-3Flag:kanMX6 rec7-3HA:ura4⁺</i>
	OTM578	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec15-3Flag:kanMX6 rec7-3HA:ura4⁺ rec10::hygMX6</i>
	OTM442	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec15-3Flag:kanMX6 rec7-3HA:ura4⁺ rec24::hygMX6</i>
	OTM727	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec15-3Flag:kanMX6 rec7-3HA:ura4⁺ mde2::hygMX6</i>
図5A	OTM416	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec15-3Flag:kanMX6 rec7-3HA:ura4⁺</i>
	OTM720	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec15-3Flag:kanMX6 rec7-3HA:ura4⁺ rec6::hygMX6</i>
	OTM700	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec15-3Flag:kanMX6 rec24-3HA:ura4⁺ rec7::hygMX6</i>
	OTM444	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec15-3Flag:kanMX6 rec7-3HA:ura4⁺ rec12::hygMX6</i>
	OTM744	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec15-3Flag:kanMX6 rec7-3HA:ura4⁺ rec14::hygMX6</i>
	OTM442	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec15-3Flag:kanMX6 rec7-3HA:ura4⁺ rec24::hygMX6</i>
	OTM514	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec15-3Flag:kanMX6 rec7-3HA:ura4⁺ rec8::hygMX6</i>
	OTM578	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec15-3Flag:kanMX6 rec7-3HA:ura4⁺ rec10::hygMX6</i>
	OTM727	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec15-3Flag:kanMX6 rec7-3HA:ura4⁺ mde2::hygMX6</i>
図5C	OTM595	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec10-3Flag:kanMX6 rec7-3HA:ura4⁺</i>
	OTM725	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec10-3Flag:kanMX6 rec7-3HA:ura4⁺ rec6::hygMX6</i>
	OTM701	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec10-3Flag:kanMX6 rec6-3HA:ura4⁺ rec7::hygMX6</i>
	OTM649	<i>h⁻ ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec10-3Flag:kanMX6 rec7-3HA:ura4⁺ rec12::hygMX6</i>

	OTM749	<i>h⁻</i>	<i>ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec10-3Flag:kanMX6 rec7-3HA:ura4⁺ rec14::hygMX6</i>
	OTM607	<i>h⁻</i>	<i>ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec10-3Flag:kanMX6 rec7-3HA:ura4⁺ rec15::hygMX6</i>
	OTM653	<i>h⁻</i>	<i>ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec10-3Flag:kanMX6 rec7-3HA:ura4⁺ rec24::hygMX6</i>
	OTM753	<i>h⁻</i>	<i>ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec10-3Flag:kanMX6 rec7-3HA:ura4⁺ rec8::hygMX6</i>
	OTM729	<i>h⁻</i>	<i>ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec10-3Flag:kanMX6 rec7-3HA:ura4⁺ mde2::hygMX6</i>
☒6B-D	OTM416	<i>h⁻</i>	<i>ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec15-3Flag:kanMX6 rec7-3HA:ura4⁺</i>
	OTM651	<i>h⁻</i>	<i>ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 mde2-3Flag:kanMX6 rec14-3HA:ura4⁺</i>
	OMI32	<i>h⁻</i>	<i>ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 mde2-3Flag:kanMX6 rec14-3HA:ura4⁺ rec15::hygMX6</i>
☒6E	OTM708	<i>h⁻</i>	<i>ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec12-3Flag:kanMX6 rec14-3HA:ura4⁺</i>
	OTM760	<i>h⁻</i>	<i>ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec12-3Flag:kanMX6 rec14-3HA:ura4⁺ mde2::natMX6</i>
☒9	OTM540	<i>h⁻</i>	<i>ade6-M26 ura4-D18 pat1-114 rec24-3Flag:kanMX6 rec8-3HA:ura4⁺</i>

2-2. 分裂酵母の減数分裂誘導

栄養増殖寒天培地 (YES 寒天; 0.5% Bacto™ yeast extract、3% dextrose、200mg/l アデニン、200mg/l ロイシン、200mg/l ヒスチジン、100mg/l ウラシル、2% 寒天) で3日間培養した株を、5ml YES 液体培地 (0.5% Bacto™ yeast extract、3% dextrose、200mg/l アデニン、200mg/l ロイシン、200mg/l ヒスチジン、100mg/l ウラシル) で $1-2 \times 10^7$ cells/ml になるまで一晩振盪培養した。 0.05×10^7 cells/ml になるように 100ml の MM+N 培地 (MM 培地 (Alfa *et al.* 1993) を 1% dextrose に変更し、200mg/l アデニン、200mg/l ロイシン、200mg/l ヒスチジン、200mg/l ウラシルを加えた) に移し、 $1-2 \times 10^7$ cells/ml になるまで一晩振盪培養した。3,000 rpm で2分間遠心した後、10ml の滅菌水で2回洗浄し、 0.5×10^7 cells/ml になるように 200ml の MM-N 培地 (MM+N 培地からアデニン、ロイシン、ヒスチジン、ウラシル、NH₄Cl を除いた) に移した。16-20 時間振盪培養し、G1 期に停止させた。ここまでの培養を全て許容温度 (25℃) で行った。G1 期に停止させた細胞を 3,000 rpm で2分間遠心した後、150ml の MM+1/10N 培地 (MM+N 培地を 0.05% NH₄Cl に変更した) に懸濁し、 $1.3-1.5 \times 10^7$ cells/ml とした。制限温度 (34℃) に移して振盪培養し、減数分裂に誘導した。

2-3. クロマチン免疫沈降 (ChIP)

先行研究 (Hirota *et al.* 2007) の方法を改変し、以下のような手順で行った。

2-3-1. *in vivo* クロスリンク

分裂酵母培養液に、37% ホルムアルデヒド溶液を終濃度 1% になるように加えて室温で 15 分間インキュベートし、*in vivo* クロスリンクを行った。その後、氷上で 45 分間インキュベートし、クロスリンクを停止した。3,000 rpm、4℃で2分間遠心した後、PBS (137mM NaCl、8.1mM Na₂HPO₄、2.68mM KCl、1.47mM KH₂PO₄) で2回洗浄し、

液体窒素にて凍結した後、使用するまで-80℃で保存した。

2-3-2. 細胞抽出

凍結細胞に lysis buffer 140 / Complete / PMSF (0.1% sodium deoxycholate、1mM EDTA (pH 8.0)、50mM HEPES-KOH (pH 7.5)、140mM NaCl、1% Triton X-100、1x Complete, EDTA-free (Roche、プロテアーゼ阻害剤)、1mM Phenylmethylsulfonyl fluoride) と 0.5mm ジルコニアビーズを加え、マルチビーズショッカー（安井機械）を用いて細胞を完全に破碎した。細胞破碎液を Handy Sonic model UR-20P（トミー精工）を用いて超音波処理し、染色体 DNA を平均 500bp の長さに断片化した。その後、12,000 rpm、4℃で 10 分間遠心し、この上清を細胞抽出液とした。

2-3-3. 免疫沈降

Dynabeads protein A（Invitrogen）を PBS / 0.5% BSA で 3 回洗浄した後、抗体（抗 FLAG 抗体（Sigma）あるいは抗 HA 抗体 16B12（Covance））を加えて 4℃で 1 時間インキュベートした。その後、PBS / 0.5% BSA で 2 回洗浄し、細胞抽出液と混合し、4℃で 3 時間インキュベートすることで免疫沈降を行った。免疫沈降後のビーズを lysis buffer 140 で 3 回、lysis buffer 500 (0.1% sodium deoxycholate、1mM EDTA (pH 8.0)、50mM HEPES-KOH (pH 7.5)、500mM NaCl、1% Triton X-100) で 2 回、LiCl / detergent buffer (0.5% sodium deoxycholate、1mM EDTA (pH 8.0)、10mM Tris-HCl (pH 8.0)、250mM LiCl、0.5% Nonident P-40) で 1 回洗浄した。洗浄後のビーズを 2x stop buffer (20mM Tris-HCl (pH 8.0)、20mM EDTA (pH 8.0)、100mM NaCl、1% SDS) に懸濁した（IP 溶液）。

2-3-4. DNA 精製

免疫沈降に用いなかった細胞抽出液の一部を 2x stop buffer と混合し、input 溶液とした。IP 溶液と input 溶液を 75℃で一晩インキュベートし、クロスリンクを解消した。

その後、プロテアーゼ K を加えて 55℃で 3 時間インキュベートし、タンパク質を分解した。その後、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて DNA を精製し、EB buffer にて溶出した。

2-3-5. Realtime PCR を用いた定量解析 (ChIP-qPCR)

SYBR® Premix Extaq™ II (タカラバイオ) と ABI 7300 Real-Time PCR System (Life Technologies) を用い、添付のマニュアルに従って IP 及び input サンプル中の DNA 量を測定した。使用したプライマーペアは以下の通り。

sibI:

5'-TGGCTCTAGATGTATCAGCG-3'

5'-ACGGCTGTCGAATCAGTTAC-3'

mbsI:

5'-AAACACTGGTCATCTCGGAACCAGC-3'

5'-TCCTTTGCAGTGAATGGTTGGGCTAC-3'

satI:

5'-TCATCTCATTAAGAGTGTTCTGG-3'

5'-GATGCAAAGCAAATGCGCAAGT-3'

SPBC3H7.03:

5'-TGCCATGAATTCCTATCGTAG-3'

5'-GTTGCAAGGCTTATGTACATAC-3'

birI:

5'-CTTGCTCTGTAGCTTAGGAG-3'

5'-GACAGAAACGTCGGAAACTC-3'

2-4. ChIP-chip によるタンパク質の DNA 結合領域の決定

2-4-1. タイリングアレイによるシグナルの検出

IVT (*in vitro* transcription) Amplification 法 (Katou *et al.* 2006) に従って、IP DNA サンプル及び input DNA サンプルの増幅、断片化、末端標識を行った。その後、Affymetrix Chromatin Immunoprecipitation Assay Protocol (P/N 702238 Rev. 3、Affymetrix) に従って、各 DNA サンプルを GeneChip® *S. pombe* Tiling 1.0FR Array (P/N 900647、Affymetrix) に、それぞれハイブリダイゼーションした。Affymetrix Fluidics station でアレイを洗浄、染色し (Midi-euk2.v3 プロトコール)、GeneChip Scanner 3000 7G でスキャンを行い、各プローブに対するシグナルを得た。

2-4-2. タンパク質の結合領域の予測

得られたシグナルデータから、CisGenome v2 ソフトウェア (Ji *et al.* 2008) を用いて、DSB 因子 (Rec10、Rec15、Mde2) 及び Rec8 の DNA 結合領域を予測した。まず、CisGenome v2 ソフトウェアの `tilemapv2_importaffy` コマンド (初期設定) を使用して、全てのアレイについてのシグナルの正規化 (quantile normalization 法) を行った。その後、`tilemapv2` コマンドを用いて、各サンプルについて IP DNA サンプルと input DNA サンプルの統計的比較を行い、DSB 因子及び Rec8 の DNA 結合領域を決定した。使用したパラメーターの内、初期設定と異なるパラメーターを以下に示す。なお、参照ゲノム配列は、Sanger Genome Database の 2004 年 9 月版を使用した。

DSB 因子 : [Method to Compute FDR] = UMS, [W] = 38, [Window Boundary] = 750, [Standardize MA Statistics] = No, [Region Boundary Cutoff, MA>] = 0.33, [Max Gap within a Region] = 750, [Max Run of Insignificant Probes within a Region] = 25, [Min Region Length] = 750, [Min No. of Significant Probes within a Region] = 25

Rec8 : [Region Boundary Cutoff, MA>] = 0.1, [Expected Hybridization Length] = 140, [Max

Gap within a Region] = 1300, [Min Region Length] = 1300, [Min No. of Significant Probes within a Region] = 20

2-4-3. 各タンパク質の結合領域と DSB 部位との比較解析

DSB 因子 (Rec10、Rec15、Mde2) 及び Rec8 の結合領域と DSB 部位 (Hyppa *et al.* 2008) を比較するために、CisGenome v2 ソフトウェアを使用して、より厳しい定義で結合領域を求めた。tilemapv2 コマンドのパラメーターを以下に示す。

DSB 因子 : [Method to Compute FDR] = UMS, [W] = 38, [Window Boundary] = 750, [Standardize MA Statistics] = No, [Region Boundary Cutoff, MA>] = 0.33, [Max Gap within a Region] = 750, [Max Run of Insignificant Probes within a Region] = 25, [Min Region Length] = 750, [Min No. of Significant Probes within a Region] = 25

Rec8 : [Method to Compute FDR] = Estimate from Left Tail, [W] = 13, [Window Boundary] = 260, [Standardize MA Statistics] = Yes, [Region Boundary Cutoff, MA>] = from 0.96, [Expected Hybridization Length] = 150, [Min No. of Significant Probes within a Region] = 10

2-4-4. GEO accession number

本研究により得られた DSB 因子 (Rec10、Rec15、Mde2) 及び Rec8 の ChIP-chip データは、Gene Expression Omnibus (GEO) に登録した (accession number はそれぞれ GSE31846 と GSE52863)。

2-5. sequential ChIP (re-ChIP)

先行研究 (Ishizaka *et al.* 2012) の方法を改変し、以下のような手順で行った。

2-5-1. 一次免疫沈降

通常の ChIP 同様に抗 FLAG 抗体 (Sigma) で免疫沈降を行い、洗浄を行った後、ビーズを elution buffer (10mM Tris-HCl (pH 7.6)、1mM EDTA (pH 8.0)、1% SDS、10mM Dithiothreitol) に懸濁した。室温で 15 分間インキュベートすることで免疫沈降されたタンパク質-DNA 複合体を溶出し (一次溶出)、これを再度繰り返した (二次溶出)。一次溶出液と二次溶出液を混合した後、9 倍量の lysis buffer 140 / Complete / PMSF を加えた。Dynabeads protein A (Invitrogen) を PBS / 0.5% BSA で 3 回洗浄した後、この希釈溶出液に加えて 4℃で 30 分間インキュベートし、変性した一次抗体を除去した。これを二次細胞抽出液とした。

2-5-2. 二次免疫沈降

Dynabeads protein A (Invitrogen) を PBS / 0.5% BSA で 3 回洗浄した後、抗体 (抗 FLAG 抗体 (Sigma) あるいは抗 HA 抗体 16B12 (Covance)) を加えて 4℃で 1 時間インキュベートした。その後、PBS / 0.5% BSA で 2 回洗浄し、二次細胞抽出液と混合し、4℃で 3 時間インキュベートすることで免疫沈降を行った。免疫沈降後のビーズを lysis buffer 140 で 1 回、lysis buffer 500 で 1 回、LiCl / detergent buffer で 1 回洗浄し、洗浄後のビーズを 2x stop buffer に懸濁した (IP 溶液)。

2-5-3. DNA 精製

免疫沈降に用いなかった二次細胞抽出液の一部を 2x stop buffer と混合し、input 溶液とした。IP 溶液と input 溶液を 75℃で一晩インキュベートし、クロスリンクを解消した。その後、プロテアーゼ K を加えて 55℃で 3 時間インキュベートし、タンパク質を分解した。その後、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて DNA を精製し、EB buffer にて溶出した。

2-6. 共免疫沈降

2-6-1. 細胞抽出

減数分裂誘導後 4 時間の細胞を 3,000 rpm、4℃で 2 分間遠心して回収し、液体窒素にて凍結した後、使用するまで-80℃で保存した。凍結細胞に lysis buffer / Complete / PMSF (25mM MOPS (pH 7.2)、5mM EDTA (pH 8.0)、0.1% Nonident P-40、100mM KCl、1mM Dithiothreitol、10% glycerol、1x Complete, EDTA-free (Roche、プロテアーゼ阻害剤)、1mM Phenylmethylsulfonyl fluoride) と 0.5mm ジルコニアビーズを加え、マルチビーズショッカー（安井機械）を用いて細胞を完全に破碎した。細胞破碎液を 12,000 rpm、4℃で 10 分間遠心し、この上清を細胞抽出液とした。

2-6-2. 免疫沈降

Anti-Flag M2-agarose resin (Sigma) を PBS / 0.5% BSA で 3 回洗浄した後、細胞抽出液と混合し、4℃で 2 時間インキュベートすることで免疫沈降を行った。免疫沈降後のビーズを lysis buffer で 4 回洗浄し、2x SDS sample buffer (125mM Tris-HCl (pH 6.8)、20% glycerol、4% SDS、2% β -mercaptoethanol、0.001% Bromophenol blue) を加えて 100℃で 5 分間インキュベートし、IP サンプルとした。

細胞抽出液の一部は同量の 4x SDS sample buffer と混合して 100℃で 5 分間インキュベートし、WCE サンプルとした。

2-7. 共免疫沈降（クロスリンクあり）

先行研究 (Tsukahara *et al.* 2010) の方法を改変し、以下のような手順で行った。

2-7-1. *in vivo* クロスリンク

分裂酵母培養液に、11% ホルムアルデヒド溶液 (11% ホルムアルデヒド、100mM NaCl、1mM EDTA (pH 8.0)、0.5mM EGTA (pH 8.0)、50mM Tris-HCl (pH 7.6)) を終濃

度 0.9%になるように加えて室温で 10 分間インキュベートし、*in vivo* クロスリンクを行った。その後、氷上で 20 分間インキュベートし、クロスリンクを停止した。3,000 rpm、4℃で 2 分間遠心した後、PBS で 4 回、IP buffer (50mM HEPES-KOH (pH 7.5)、140mM NaCl、1mM EDTA (pH 8.0)、0.1% Triton X-100) で 1 回洗浄し、液体窒素にて凍結した後、使用するまで-80℃で保存した。

2-7-2. 細胞抽出

凍結細胞に IP buffer / MNase / Complete / PMSF (50mM HEPES-KOH (pH 7.5)、140mM NaCl、1mM EDTA (pH 8.0)、0.1% Triton X-100、4U/5x10⁹ cells Nuclease micrococcal (Sigma)、3mM CaCl₂、1x Complete, EDTA-free (Roche、プロテアーゼ阻害剤)、1mM Phenylmethylsulfonyl fluoride) と 0.5mm ジルコニアビーズを加え、マルチビーズショッカー (安井機械) を用いて細胞を完全に破碎した。細胞破碎液を Handy Sonic model UR-20P (トミー精工) を用いて超音波処理した後、0.5M EDTA (pH 8.0) を終濃度 3mM になるように加えて MNase を不活性化した。その後、12,000 rpm、4℃で 10 分間遠心し、この上清を細胞抽出液とした。

2-7-3. 免疫沈降

Anti-Flag M2-agarose resin (Sigma) を PBS / 0.5% BSA で 3 回洗浄した後、細胞抽出液と混合し、4℃で 2 時間インキュベートすることで免疫沈降を行った。免疫沈降後のビーズを IP buffer で 4 回洗浄し、1.5x SDS sample buffer (75mM Tris-HCl (pH 6.8)、15% glycerol、3% SDS、167mM Dithiothreitol、0.1% Bromophenol blue) を加えて 100℃で 5 分間インキュベートし、IP サンプルとした。

細胞抽出液の一部は同量の 3x SDS sample buffer と混合して 100℃で 5 分間インキュベートし、WCE サンプルとした。

2-8. ウェスタンブロット

SDS で変性処理した IP サンプル及び WCE サンプルを、0.9% アクリルアミドゲルを用いて電気泳動により分離した。分離されたタンパク質を polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Millipore) に転写し、一次抗体（抗 FLAG 抗体（Sigma、希釈率 1:10,000）あるいは抗 HA 抗体 12CA5（Roche、希釈率 1:5,000））、二次抗体（抗 mouse IgG 抗体 HRP 標識（GE Healthcare、希釈率 1:5,000））で処理した後、ImageQuant LAS 4000（GE Healthcare）で検出を行った。

3. 材料と方法（出芽酵母）

3-1. 出芽酵母株

全ての実験において、同調性の高い減数分裂の誘導が可能な SK1 バックグラウンドの株を使用した。Rec8、Spo11、Gal4BD-Spo11 タンパクの C 末端への FLAG タグの付加は、pU6H3FLAG ベクターの FLAG カセット部分を PCR 増幅し、形質転換により行った (De Antoni & Gallwitz 2000; Katou *et al.* 2003)。使用した出芽酵母株は表 3 に示した。

表 3. 本研究で使用した出芽酵母株

	Strain	Genotype
図8	YSD3	<i>a/a arg4-bgl/arg4-nsp cyh2-z/" REC8-6His-3FLAG-loxP-KanMX-loxP/"</i>
図11A	YSD7	<i>a/a arg4/" trp1::ADH1-GAL4BD-SPO11-TRP1-KanMX/" REC8-6His-3FLAG-loxP-KanMX-loxP/" spo11Δ::URA3/"</i>
図11B-E	TFY372	<i>a/a VMA1-105/" sae2Δ::KanMX/"</i>
	TFY011	<i>a/a VMA1-105/" trp1::ADH1-GAL4BD-SPO11-TRP1-KanMX/" spo11Δ::KanMX/" sae2Δ::KanMX/"</i>
	YMD97	<i>a/a arg4-bgl/arg4-nsp cyh2-z/" trp1::ADH1-GAL4BD-SPO11-3FLAG-TRP1-KanMX/" spo11Δ::URA3/"</i>
図12	RKD1311	<i>a/a arg4-bgl/arg4-nsp cyh2-z/" SPO11-6His-3FLAG-loxP-KanMX-loxP/"</i>

All strains are homozygous for *ura3 lys2 ho::LYS2 leu2Δ*

3-2. 出芽酵母の減数分裂誘導

ρ +選択寒天培地（YPG 寒天; 1% Bacto™ yeast extract、2% Bacto™ peptone、3% glycerol、2% 寒天）で2日間培養した株を、栄養増殖寒天培地（YPD 寒天; 1% Bacto™ yeast extract、2% Bacto™ peptone、2% dextrose、2% 寒天）で2日間培養した。シングルコロニーを3ml YPD 液体培地（1% Bacto™ yeast extract、2% Bacto™ peptone、2% dextrose）で一晩振盪培養し、1/100 に希釈して5ml の前孢子形成培地（SPS; 0.5% Bacto™ yeast extract、1% Bacto™ peptone、0.17% Bacto™ yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium sulfate、1% potassium acetate、0.5% ammonium sulfate、50mM potassium hydrogen phthalate、適量の CSM (Complete Supplement Mixture)、0.006% 化学信越シリコーン KM-27FNET (消泡剤)、pH5.5）で8時間振盪培養した。 2.0×10^5 cells/ml になるように適量の SPS 培地に移し、 $4-6 \times 10^7$ cells/ml になるまで振盪培養した。3,000 rpm で3分間遠心した後、SPS 培地と同量の滅菌水で洗浄し、倍量の孢子形成培地（SPM; 1% potassium acetate、1/5 量の CSM、0.001% polypropylene glycol）に懸濁し、 $2-3 \times 10^7$ cells/ml とした。500ml フラスコに50ml ずつ分注し、激しく振盪培養し、減数分裂に誘導した。全ての培養を30℃で行った。

3-3. クロマチン免疫沈降 (ChIP)

先行研究 (Kugou *et al.* 2009) の方法を改変し、以下のような手順で行った。

3-3-1. *in vivo* クロスリンク

出芽酵母培養液に、37% ホルムアルデヒド溶液を終濃度 1%になるように加えて室温で10分間インキュベートし、*in vivo* クロスリンクを行った。その後、2.5M グリシンを終濃度 125mM になるように加えて室温で5分間インキュベートし、クロスリンクを停止した。3,000 rpm、4℃で2分間遠心した後、TBS (20mM Tris-HCl (pH 7.6)、

150mM NaCl) で 2 回洗浄し、液体窒素にて凍結した後、使用するまで-80℃で保存した。

3-3-2. 細胞抽出

凍結細胞に lysis buffer 140 / Complete (0.1% sodium deoxycholate、1mM EDTA (pH 8.0)、50mM HEPES-KOH (pH 7.5)、140mM NaCl、1% Triton X-100、1x Complete, EDTA-free (Roche、プロテアーゼ阻害剤)) と 0.5mm ジルコニアビーズを加え、マルチビーズショッカー (安井機械) を用いて細胞を完全に破碎した。細胞破碎液をコバリス (Covaris) を用いて超音波処理し、染色体 DNA を平均 300bp の長さに断片化した。その後、15,000 rpm、4℃で 15 分間遠心し、この上清を細胞抽出液とした。

3-3-3. 免疫沈降

Dynabeads protein A (Invitrogen) を PBS / 0.5% BSA で 3 回洗浄した後、抗 FLAG 抗体 (Wako) を加えて 4℃で 1 時間インキュベートした。その後、PBS / 0.5% BSA で 2 回洗浄し、細胞抽出液と混合し、4℃で 3.5-5.5 時間インキュベートすることで免疫沈降を行った。免疫沈降後のビーズを lysis buffer 140 で 2 回、lysis buffer 500 で 1 回、LiCl / detergent buffer で 2 回、TE で 1 回洗浄した。洗浄後のビーズを TE /1% SDS (50mM Tris-HCl (pH 8.0)、10mM EDTA (pH 8.0)、1% SDS) に懸濁し、65℃で 15 分間インキュベートすることで、免疫沈降されたタンパク質-DNA 複合体を溶出した (一次溶出)。溶出後のビーズを TE /0.67% SDS (50mM Tris-HCl (pH 8.0)、10mM EDTA (pH 8.0)、0.67% SDS) に懸濁し、65℃で 5 分間インキュベートすることで更なる溶出を行い (二次溶出)、二次溶出液を一次溶出液と混合した (IP 溶液)。

3-3-4. DNA 精製

免疫沈降に用いなかった細胞抽出液の一部を TE /1.33% SDS (50mM Tris-HCl (pH 8.0)、10mM EDTA (pH 8.0)、1.33% SDS) と混合し、input 溶液とした。IP 溶液と input

溶液を 65℃で一晩インキュベートし、クロスリンクを解消した。その後、プロテアーゼ K を加えて 50℃で 2 時間インキュベートし、タンパク質を分解した。その後、QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて DNA を精製し、EB buffer にて溶出した。

3-4. ChIP-seq によるタンパク質の結合ピークの検出

3-4-1. ライブラリ調製とシーケンスラン

NEBNext ChIP-Seq Library prep master mix set for Illumina (P/N E6240、NEB) を用いて、IP DNA サンプルと input DNA サンプルにシーケンス用配列の付加と PCR による増幅を行った (ライブラリ調製)。この際に、NEB Next multiplex oligos for Illumina (P/N E7335、NEB) を併用し、マルチプレックス用バーコード配列も合わせて付加した。シーケンスは、MiSeq (Illumina) と MiSeq Reagent Kit v2 (50 cycles) (P/N MS-102-2001、Illumina) を用い、4 サンプル/ランの 50 bp シングルエンドマルチプレックス解析を行った。

3-4-2. リードのマッピング

FASTX-Toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) を用いて、品質の低いリード末端配列のトリミング (Q 値 20 以下)、及び品質の低いリードの除去 (Q 値 20 以上の配列の割合が 80%以下) を行った。その後、tagdust (Lassmann *et al.* 2009) を用いて、Illumina のシーケンス用配列を含むリードの除去を行った。残ったリードを、bowtie ソフトウェア (Langmead *et al.* 2009) を用いて出芽酵母の参照ゲノム配列 (ゲノムバージョン sacCer1 と sacCer2 と SK1) にマッピングした。マッピングパラメーターは、「-n 3」を除いて初期設定を使用し、ゲノム中の繰り返し配列にはランダムにマッピングを行った。

3-4-3. タンパク質の結合領域の検出

まず、ゲノム全体を 10-bp bin に分割した。続いて、drompa ソフトウェア (Nakato *et al.* 2013) の parse2wig コマンドを用いて、各 bin に含まれるリード数の計算と正規化を行った。「-binsize 10 -F3 47 -flen 150」以外は、初期設定を用いた。その後、各 bin についての DNA 濃縮度 (DNA enrichment; IP/input) を、前後 300 bp 以内に含まれるデータの平均として計算した。結合領域は drompa ソフトウェアを用いて決定した。

「-sw 300 -binsize 10 -ipm 1 -divide -ethre 1.2」以外は、初期設定を用いた。その後、600 bp 以下の長さの領域をピークリストから除いた上で、PeakSplitter (<http://www.ebi.ac.uk/research/bertone/software>) を用いて、結合領域を更に細かいピークに分割した。「-c 第3四分位点の値 -v 0.4」以外は、初期設定を用いた。

出芽酵母の Rec8 については、検出されたピークから、セントロメア周辺 (70 kb) 及びテロメア周辺 (各染色体末端から 30 kb) に位置するピークを除いた上で、上位 75%以上の DNA enrichment を示すピークを「Rec8 結合部位」とした。

Gal4BD-Spo11 については、Rec8 に比べてピークが顕著でなかったため、より厳しい定義で結合ピークを求めた。具体的には、染色体腕部に位置するピークの内、上位 25%以上の DNA enrichment を示すピークのみを、有意な Gal4BD-Spo11 結合部位であるとした。

3-4-4. GEO accession number

本研究により得られた Rec8、Spo11、及び Gal4BD-Spo11 の ChIP-seq データは、Gene Expression Omnibus (GEO) に登録した (accession number は GSE52863)。

3-5. サザンハイブリダイゼーション

先行研究 (Borde *et al.* 1999) の方法を改変し、以下のような手順で行った。

3-5-1. ゲノム DNA 抽出

減数分裂誘導後 0、5、8 時間の *sae2* 欠損細胞をそれぞれ 35ml、20ml、20ml ずつ、3,200g で 5 分間遠心して回収し、使用するまで -20℃ で保存した。凍結細胞を zymolyase solution (0.1M EDTA (pH 8.0)、0.96M sorbitol、1% β -mercaptoethanol、1mg/ml zymolyase 20T) に懸濁し、37℃ で 45 分間インキュベートした。その後、4,500g で 5 分間遠心し、spheroplast 化した細胞を extraction buffer (50mM EDTA (pH 8.0)、50mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.5% SDS、0.2mg/ml プロテアーゼ K) に再懸濁し、65℃ で 1 時間インキュベートした。その後、5M 酢酸カリウムを最終濃度 1.4M になるように加え、氷上で 10 分間インキュベートした。16,000g、4℃ で 30 分間遠心し、上層をイソプロパノールと混合して沈殿させ、75% エタノールでリンスした。生じた DNA 沈殿に TE / 0.1mg/ml RNaseA を加えて 37℃ で 1 時間インキュベートし、RNA を消化した。その後、3M sodium acetate (pH 5.2) と 100% エタノールを加えてエタノール沈殿させ、75% エタノールでリンスした。生じた DNA 沈殿を TE に溶かし、約 5 μ g の DNA を適当な制限酵素で処理した後、電気泳動に使用した。

3-5-2. 電気泳動

電気泳動は、0.8% アガロースゲル、泳動バッファーには 1x TAE (40mM Tris-acetate、1mM EDTA (pH 8.0)) を使用し、80V で 13 時間行った。

3-5-3. サザンハイブリダイゼーション

電気泳動後のゲルを Nylon membrane (Amersham Hybond-XL、GE Healthcare) の上に乗せ、バキュームブロッター (GE Healthcare) を用いたアルカリトランスファー法により DNA を転写した。その際に、まず Denature solution (1.5M NaCl、0.5M NaOH) をゲル表面に加えて 45 分間吸引し、その後 Transfer solution (1.5M NaOH、0.25M NaOH) を加えて 5-6 時間吸引した。転写後のメンブレンを 2x SSC (0.3M NaCl、33.7mM sodium

citrate、pH 7.0) で 3 回洗浄し、ハイブリダイゼーションボトルに入れて 0.125M Na₂HPO₄ (pH 7.4) で洗浄した後、Hybridization buffer (1% BSA、7% SDS、1mM EDTA (pH 8.0)、0.25M Na₂HPO₄ (pH 7.4)) を加えて 20 rpm、62°C で 30 分間プレハイブリダイゼーションを行った。その後、Hybridization buffer を交換し、³²P で標識された DNA プローブを加えて 62°C で一晩、ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後のメンブレンを Wash buffer (1% SDS、1mM EDTA (pH 8.0)、0.1M Na₂HPO₄ (pH 7.4)) で洗浄した後、autoradiography film (GE Healthcare) に現像した。なお、DNA プローブは、以下に示すプライマーペアを用いて出芽酵母ゲノム DNA から増幅した DNA 断片を、Ready-To-Go DNA Labelling Beads (-dCTP) (GE Healthcare) を用いて ³²P でランダム標識し、ProbeQuant G-50 Micro Columns (GE Healthcare) で精製して使用した。

GAL2:

5'-CGGAGTTATAGAGGATTCGC-3'

5'-GAAGTTTGACCTTCTTGATGTC-3'

YNL241c:

5'-GGTGCCAGAAGTAAACTATCC-3'

5'-CTCATCGGGTTCATCTACTC-3'

YLR333c:

5'-GCCTCCAAAGCAACAATTGTC3'-

5'-CGTTACATACGATTGTCACTG-3'

YOR219c:

5'-GAACGGAGATTTTGCCATCC-3'

5'-CATATATCCAGTCTGGTTTGG-3'

3-6. permutation test による軸部近傍での DSB ホットスポット頻度の評価

Rec8 結合部位近傍において、DSB ホットスポットの頻度が有意に低いかどうかを検証する方法として、permutation test を用いた。DSB ホットスポットが遺伝子のプロモーター領域に多く存在することを考慮し、各 DSB ホットスポットと最も近い下流の TSS との距離を固定したまま、DSB ホットスポットを TSS 上流にランダムに配置する方法を用いた。具体的には、まず、染色体腕部に位置する 3,175 個の DSB ホットスポットに対し、最も近い下流の TSS との距離 ($d1, d2, \dots, d3175$ bp) を算出した。次に、先行研究 (Jiang & Pugh 2009) により示されている遺伝子の内、染色体腕部に位置する 4,836 遺伝子からランダムに遺伝子を選び、その遺伝子の TSS の上流 $d1$ bp の位置に DSB ホットスポットを配置した。これを 3,175 個の DSB ホットスポット全てに対して同様に行い、TSS 上流にランダムに割り当てられた 3,175 個の DSB ホットスポットについて、Rec8 間領域における相対的な位置と、最も近い Rec8 結合部位までの物理的な距離を算出した。この試行を 10^5 回繰り返し、Rec8 結合部位近傍 (Rec8 間領域における相対値 : 0-0.05/0.95-0.1、0-0.1/0.9-1、Rec8 結合部位までの物理的な距離 : 0.6 kb、0.8 kb、1 kb、1.5 kb、2kb) に位置する DSB ホットスポットの頻度が実際に観察された頻度よりも小さくなる回数 (N) を求め、 p 値 ($=N/10^5$) を算出した。

また、Rec8 結合部位近傍の TSS 上流において、それ以外の TSS 上流に比べて DSB ホットスポットの頻度が有意に低いかどうかを検証するために「Rec8 結合部位近傍 (Rec8 結合部位から ≤ 0.8 kb) に位置する 197 個の TSS と、それ以外 (Rec8 結合部位から > 0.8 kb) の 4,639 個の TSS とで、TSS から最も近い上流の DSB ホットスポットまでの距離の平均は等しい」という帰無仮説の検証を permutation test により行った。具体的には、染色体腕部に位置する 4,836 遺伝子をランダムに 197 個と 4,639 個の 2 グループに分割し、各グループについて、TSS と最も近い上流の DSB ホットスポッ

トまでの距離の平均を求めた。この試行を 10^5 回繰り返す、2 つのグループの平均距離の差が、実際に観察された距離の差よりも大きくなる回数 (N) を求め、 p 値 ($=N/10^5$) を算出した。加えて、Rec8 結合部位近傍とそれ以外の境界を 0.6 kb、1 kb、1.5 kb、2 kb に設定し、同様の解析を行った。

4.〈第 1 章〉 結果

4-1. 分裂酵母においても DSB はループで形成される

出芽酵母の *rad50S* 変異体における DSB 部位は、Rec8 結合部位の間に位置することが報告されている (Glynn *et al.* 2004; Kugou *et al.* 2009)。Rec8 は軸部を構成する因子の 1 つであることから、DSB はループで起こると考えられている (Blat *et al.* 2002; Kleckner 2006)。しかし、分裂酵母においては DSB 部位と Rec8 結合部位の位置関係は明らかにされていない。そこで本研究ではまず、ChIP-chip 法により Rec8 の分布をゲノムワイドに調べ、既に報告されている DSB 部位の分布と比較することにした。

DSB が起こると考えられる減数分裂誘導後 4 時間の細胞において、Rec8 はセントロメア、テロメア、及び染色体腕部において顕著な結合を示し、561 ヶ所の Rec8 結合部位が検出された (図 3A)。先行研究において報告されている *rad50S* 変異体の DSB ホットスポットの分布 (Hyppa *et al.* 2008) と比較したところ、両者はほとんど一致しなかった (1.4% (5 ヶ所/365 ヶ所) の DSB ホットスポットのみが Rec8 結合部位、すなわち軸部と一致した、図 3A)。また、Rec8 結合部位と DSB ホットスポットとの相関を統計的に調べたところ、Rec8 の局在は DSB ホットスポットと逆相関を示した (図 3B)。これにより、分裂酵母においても DSB はループで起こることが明らかになった。

4-2. Rec15 は Rec10 依存的に軸部に結合する

所属研究室の先行研究において、三好ら (2012) は網羅的な yeast two hybrid 及び質量分析を行い、分裂酵母において DSB 形成に必須である 10 個の因子は、Spo11 のホモログである Rec12 を含む DSBC 複合体 (Rec6-Rec12-Rec14) と SFT 複合体 (Rec7-Rec15-Rec24) の 2 種の複合体を形成することを示した。また、Mde2 が DSBC

複合体の Rec14 及び SFT 複合体の Rec15 と相互作用すること、軸因子(分裂酵母 Linear Element: LinE) の 1 つである Rec10 が SFT 複合体の Rec15 と相互作用することを示した(図 2B)。本研究では、実際に Mde2 が Rec15 及び Rec14 と *in vivo* で相互作用することを共免疫沈降法により示し、sequential ChIP (re-ChIP) 法により、これらの因子が DSB ホットスポットにおいて共局在することを明らかにした(図 4A-D)。さらに、Mde2 の欠損細胞において、SFT 複合体が不安定化すること(SFT 複合体の構成因子間の相互作用が低下すること)を示した(図 4E, F)。続いて、これらの DSB 因子が染色体上においてどのような機能を果たしているか、ChIP-chip 法を用いてゲノムワイドに検証を行った。

まず、軸因子 Rec10 の分布を調べ、軸部構成因子であるコヒーシン Rec8 の結合部位と比較した(図 3A)。その結果、ゲノム全体で検出された 634 ヶ所の Rec10 結合部位の内、315 ヶ所(49.7%)が一致した(図 3E)。また、既に報告されている DSB ホットスポット(Hyppa *et al.* 2008)と比較したところ、29.7%(188 ヶ所/634 ヶ所)が一致した。これら Rec10 の結合部位と、Rec8 結合部位及び DSB ホットスポットとの相関を統計的に調べたところ、Rec10 の局在は Rec8 結合部位及び DSB ホットスポット双方に相関を示した(図 3C)。これにより、軸因子 Rec10 は軸部に加えて、少なくとも部分的あるいは一時的に DSB ホットスポットにも結合することが示された(例: *mbs1* ホットスポット、図 3A)。

続いて、SFT 複合体の Rec15 の分布を調べた(図 3A)。その結果、43.7%(292 ヶ所/668 ヶ所)が DSB ホットスポットと一致し、29.8%(199 ヶ所/668 ヶ所)が軸部(Rec8 結合部位)と一致した(図 3D, E)。また、Rec15 の結合部位の 67.5%(451 ヶ所/668 ヶ所)が Rec10 結合部位と一致し、特に軸部において非常に良く一致した(96.0%、191 ヶ所/199 ヶ所)。

これらの結果と、Rec15 と Rec10 が物理的に相互作用するという先行研究（三好ら 2012）から、Rec15 の染色体における局在は、Rec10 によって制御されている可能性が考えられた。この可能性を検証するために、Rec10 の欠損細胞（*rec10Δ*）を用いて Rec15 の分布を調べた（図 3A）。その結果、軸部（Rec8 結合部位）における Rec15 結合部位のみが顕著に減少した（野生型で 199 ヶ所に対し、*rec10Δ*株で 8 ヶ所、図 3D, E）。一方、DSB ホットスポットにおける Rec15 結合部位はあまり減少しなかった（野生型で 292 ヶ所に対し、*rec10Δ*株で 170 ヶ所）。これらの結果から、Rec10 は Rec15 の軸部への結合に必要であるが、DSB ホットスポットへの結合には必要ではないことが示唆された。

続いて、Rec10 を含む全ての DSB 因子の欠損細胞を用いて、Rec15 の軸部への結合を ChIP-qPCR により定量的に検証した（図 5A、表 4）。その結果、DSBC 複合体（Rec6、Rec12、Rec14）の欠損細胞においては、Rec15 の軸部への結合には大きな変化が見られなかったが、SFT 複合体（Rec7、Rec15、Rec24）及び Mde2 の欠損細胞では減少は観察されず、むしろ若干の増加が見られた。一方、Rec10 及び Rec8 の欠損細胞では、Rec15 の軸部への結合がほぼ完全に失われた。

4-3. Rec15 は Rec24/Mde2 依存的に DSB ホットスポットに結合する

続いて、Rec15 の DSB ホットスポットへの結合が他の DSB 因子に依存するかどうか、検証を行った。各 DSB 因子の変異体を作成し、*mbs1* ホットスポットにおける Rec15 の結合を、ChIP-qPCR により定量的に調べた。その結果、DSBC 複合体（Rec6、Rec12、Rec14）を欠損した細胞においては Rec15 の結合に変化は見られなかったが、SFT 複合体（Rec7、Rec24）及び Mde2 の欠損細胞においては、Rec15 の結合が著しく低下した（図 5A、表 4）。

そこで、Rec24 及び Mde2 の欠損細胞 (*rec24Δ*株、*mde2Δ*株) を用いて、Rec15 の分布を ChIP-chip 法によりゲノムワイドに調べた。その結果、やはり DSB ホットスポットにおいて、Rec15 の結合の顕著な低下が見られた (図 3A, D)。一方、*rec24Δ*株、*mde2Δ*株において、軸部における Rec15 の結合の減少は見られなかった (野生型で 199 ヶ所に対し、*rec24Δ*株で 300 ヶ所、*mde2Δ*株で 298 ヶ所、図 3D, E)。これにより、Rec15 の軸部への結合は、Rec24 及び Mde2 に依存しないことが示唆された。

なお、*rec24Δ*株や *mde2Δ*株において、Rec15 の結合があまり減少しない例外的な DSB ホットスポットが複数観察された。これらの DSB ホットスポットは、Rec15 が顕著に結合している軸部と近接しているために、DSB ホットスポットにおける結合量の減少が観察しにくくなっているのではないかと考えられる。

4-4. Rec10 の DSB ホットスポットへの結合は Mde2 及び SFT 複合体に依存する

前述の通りに、軸因子 Rec10 の分布を ChIP-chip によりゲノムワイドに検証した結果、Rec10 は軸部 (Rec8 結合部位) に加えて、DSB ホットスポットにも結合することが明らかになった (図 3A、表 4)。Rec10 の DSB ホットスポットへの結合は、ループに位置する DSB ホットスポットと軸部との相互作用 (軸-ループ相互作用) を介していると考えられる。

そこで、軸-ループ相互作用がどのように制御されているか検証するために、DSB 因子の欠損細胞を用いて Rec10 の DSB ホットスポット (*mbs1*、*sat1*) 及び軸部 (*SPBC3H7.03*、*bir1*) への結合を ChIP-qPCR により調べた (図 5B, C、表 4)。その結果、Rec10 の DSB ホットスポットへの結合は、SFT 複合体及び Mde2 の欠損細胞で著しく低下した。

一方、DSBC 複合体の欠損細胞では、DSB ホットスポットへの結合に変化は見られなかった。Rec10 の軸部における結合は、Rec8 の欠損細胞で低下が見られたが、DSBC 複合体の欠損細胞では変化が見られず、SFT 複合体及び Mde2 の欠損細胞ではわずかな増加が見られた。以上の結果から、SFT 複合体及び Mde2 の共同作業が軸-ループ相互作用に必要であることが示唆された（表 4）。

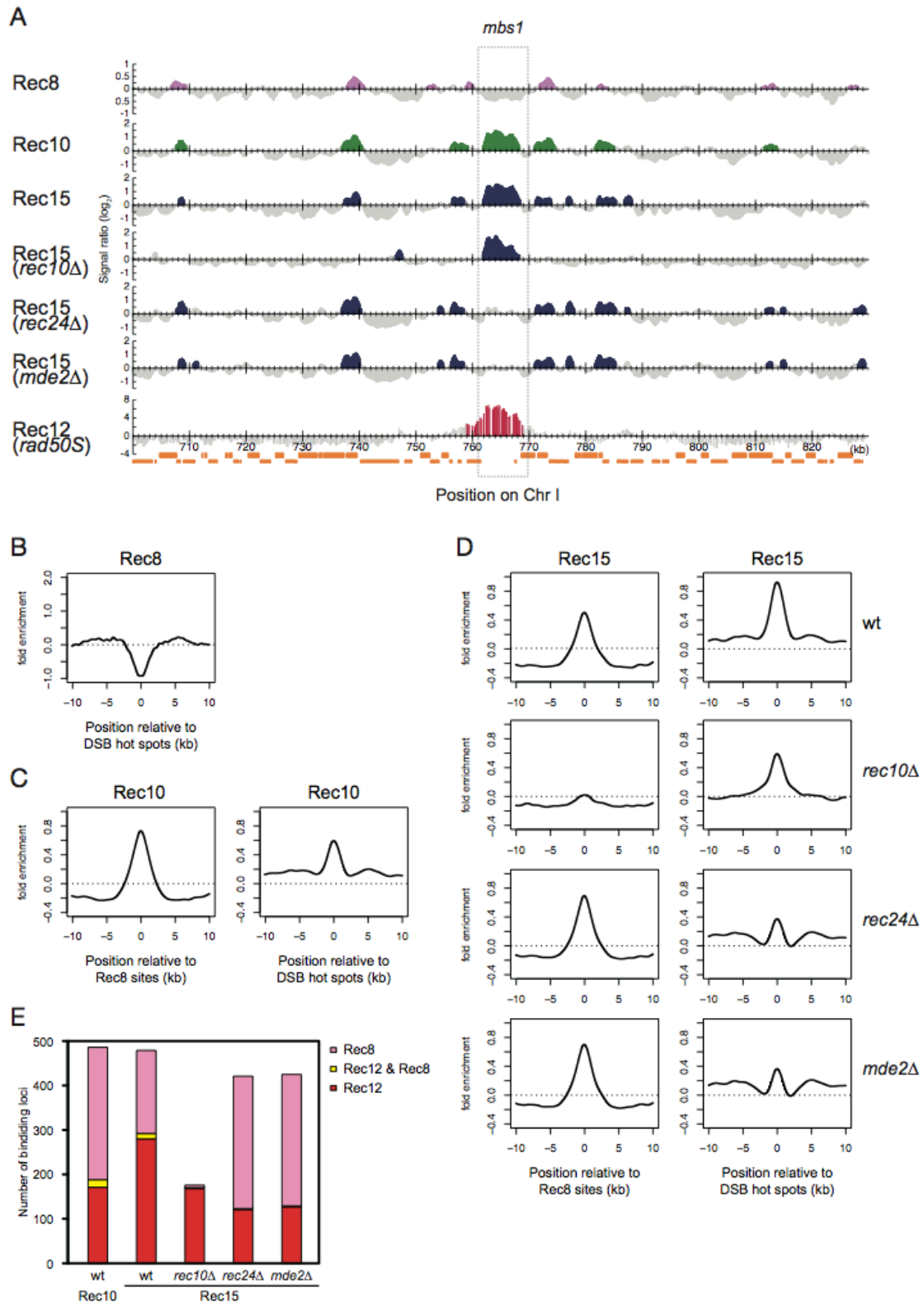


図 3. Rec15 は Rec10 依存的に軸部に、Rec24/Mde2 依存的に DSB ホットスポットに結合する

(A) ChIP-chip によって明らかにした Rec10、Rec15 及び Rec8 の分布。減数分裂誘導後 4 時間の細胞をホルマリン固定し、ChIP-chip 解析を行った。縦軸はシグナル強度 (IP/input、log2) を表す。濃緑色 (Rec10)、濃青色 (Rec15)、濃赤色 (Rec12)、濃桃色 (Rec8) の領域は、各因子が有意に結合している領域を示す (有意な結合領域の決定方法は“材料と方法 (分裂酵母)”を参照)。横軸の橙色の四角は遺伝子の ORF を示す。Rec12 のデータは先行研究 (Hyppa *et al.* 2008) を参照した。*mbs1* は DSB ホットスポット。

(B) DSB ホットスポット周辺の Rec8 の結合。365 ヶ所の DSB ホットスポットに対し、周辺 10 kb の領域における Rec8 の結合 (シグナル強度 (IP/input、log2)) を R (<http://www.r-project.org>) の smooth.spline コマンドを用いて平均化した。

(C) Rec8 結合部位及び DSB ホットスポット周辺の Rec10 の結合。561 ヶ所の Rec8 結合部位、及び 365 ヶ所の DSB ホットスポットに対し、周辺 10 kb の領域における Rec10 の結合 (シグナル強度 (IP/input、log2)) を平均化した。

(D) Rec8 結合部位及び DSB ホットスポット周辺の Rec15 の結合。

(E) Rec8 及び Rec12 結合部位と重複する Rec10、Rec15 結合部位の数。

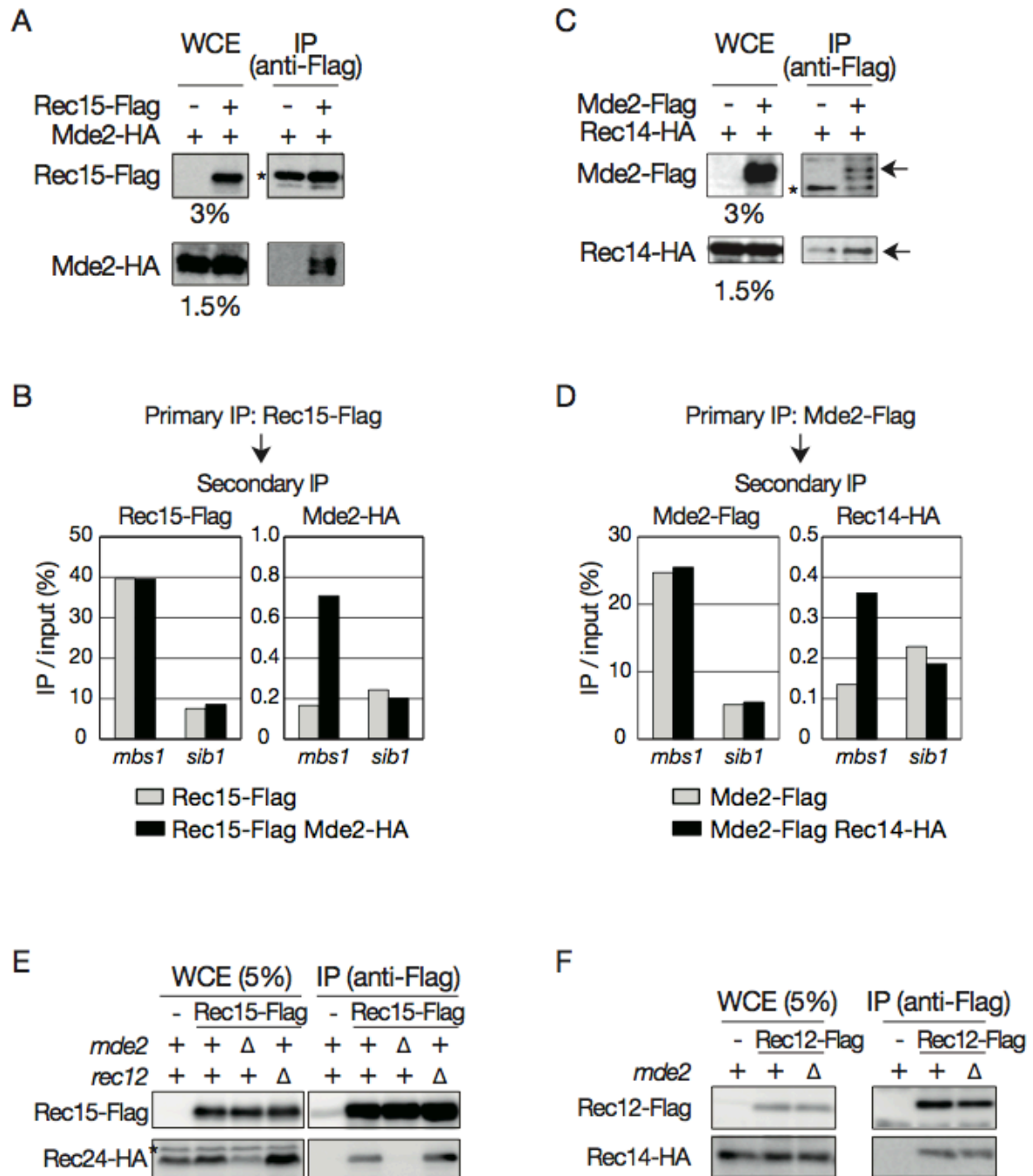


図 4. Mde2 は SFT 複合体 (Rec15) と DSBC 複合体 (Rec14) と相互作用し、SFT 複合体を安定化する

(A) Mde2 と Rec15 の相互作用。減数分裂誘導後 4 時間の細胞をホルマリン固定し、MNase 処理後に共免疫沈降を行った。IP サンプルに対し、3% (Rec15-Flag)、1.5% (Mde2-HA) 量の WCE を用いた。アスタリスクは非特異的バンド。

(B) Mde2 と Rec15 の DSB ホットスポットにおける共局在。減数分裂誘導後 4 時間の細胞をホルマリン固定し、sequential ChIP (re-ChIP) を行った。抗 FLAG 抗体で一次免疫沈降を行った後、抗 HA 抗体で二次免疫沈降を行った。DSB ホットスポット (*mbs1*)、コールドスポット (*sib1*) において qPCR により IP 効率を測定した (各領域は図 5B 参照)。

(C) Mde2 と Rec14 の相互作用。減数分裂誘導後 4 時間の細胞をホルマリン固定し、MNase 処理後に共免疫沈降を行った。IP サンプルに対し、3% (Mde2-Flag)、1.5% (Rec14-HA) 量の WCE を用いた。黒矢印は、Mde2-Flag 及び Rec14-HA の位置を示す。アスタリスクは非特異的バンド。

(D) Mde2 と Rec14 の DSB ホットスポットにおける共局在。減数分裂誘導後 4 時間の細胞をホルマリン固定し、(B)同様に re-ChIP を行った。

(E) Mde2 による SFT 複合体の安定化。減数分裂誘導後 4 時間の細胞を回収し、共免疫沈降を行った後、ウェスタンブロットにより検出した。IP サンプルに対し、5%量の WCE を用いた。アスタリスクは非特異的バンド。

(F) Mde2 に依存しない DSBC 複合体の安定性。減数分裂誘導後 4 時間の細胞を回収し、(E)と同様に共免疫沈降を行った後、ウェスタンブロットにより検出した。IP サンプルに対し、5%量の WCE を用いた。

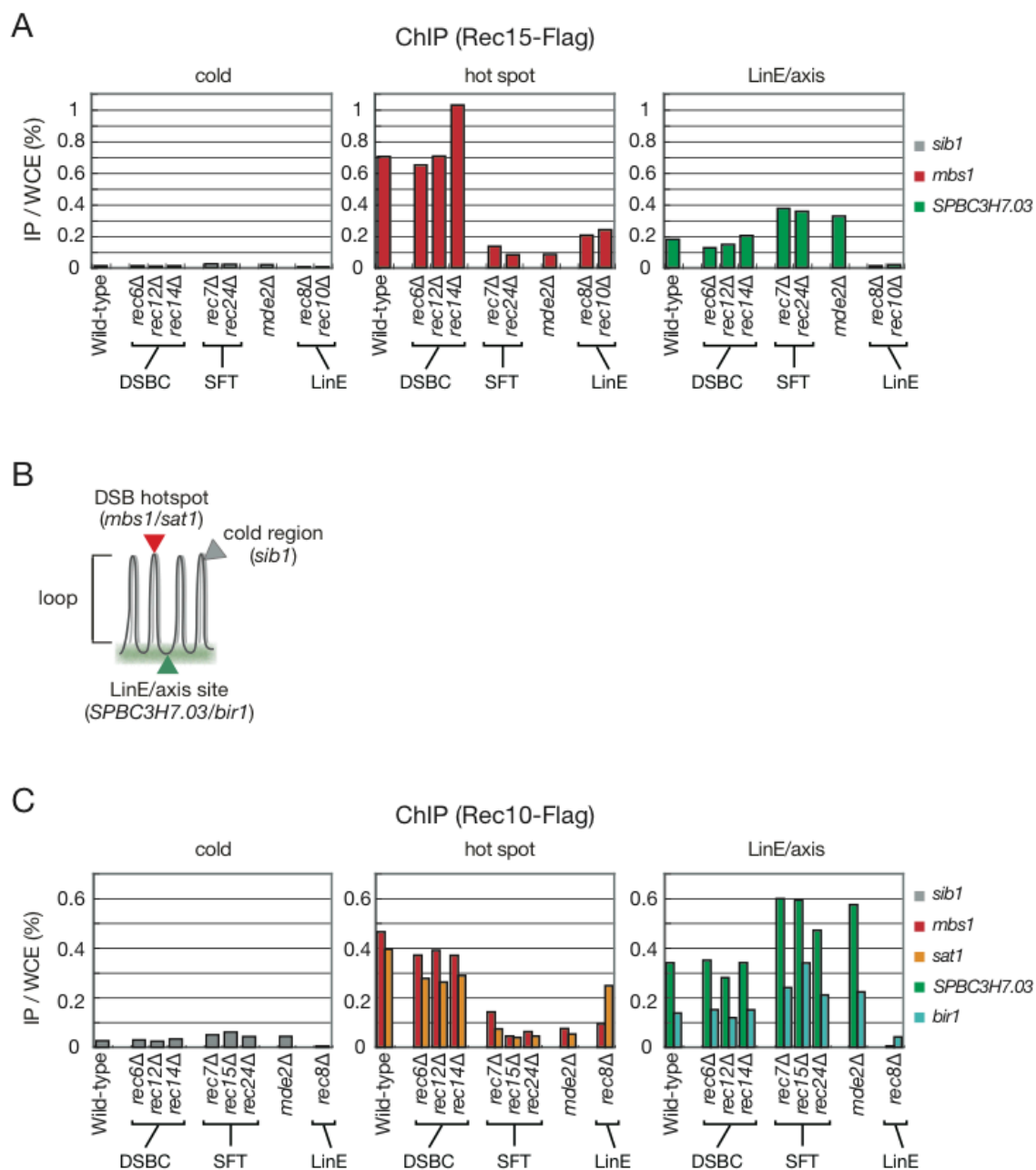


図 5. Rec15 と Rec10 の DSB ホットスポットへの結合は Mde2 及び SFT 複合体に依存する

(A) DSB 因子の欠損細胞における Rec15 の DSB ホットスポット及び軸部への結合。
減数分裂誘導後 4 時間の細胞をホルマリン固定し、ChIP を行った。コールドスポット (*sib1*)、DSB ホットスポット (*mbs1*)、軸部 (*SPBC3H7.03*) の各領域において qPCR

により IP 効率を測定した。

(B) qPCR により検証を行った各領域（コールドスポット：*sib1*、DSB ホットスポット：*mbs1*、*sat1*、軸部：*SPBC3H7.03*、*bir1*）の模式図。

(C) DSB 因子の欠損細胞における Rec10 の DSB ホットスポット及び軸部への結合。
減数分裂誘導後 4 時間の細胞をホルマリン固定し、ChIP を行った。コールドスポット（*sib1*）、DSB ホットスポット（*mbs1*、*sat1*）、軸部（*SPBC3H7.03*、*bir1*）の各領域において qPCR により IP 効率を測定した。

表 4. Rec15 及び Rec10 の軸部及び DSB ホットスポットにおける結合

	Rec15		Rec10	
	DSB hot spot	axis	DSB hot spot	axis
wt	+++	+	+++	+++
<i>rec6Δ, rec12Δ, rec14Δ</i> (DSBC)	+++	+	+++	+++
<i>rec7Δ, rec15Δ, rec24Δ</i> (SFT)	-	++	-	++++
<i>mde2Δ</i>	-	++	-	++++
<i>rec10Δ</i>	+	-		
<i>rec8Δ</i>	+	-	-/+	-

4-5. Mde2 は複製チェックポイントと係し、SFT 複合体を DSB ホットスポットにおいて安定化して DSBC 複合体を呼び込む

続いて、DSB 制御における Mde2 の役割に着目した。*mde2*⁺遺伝子の転写は、転写因子 Mei4 に依存する (Abe & Shimoda 2000)。また、*mei4*⁺遺伝子の転写は、Rad3-Cds1 依存的な複製チェックポイントの制御下にあり、複製チェックポイントが活性化された場合には *mde2*⁺遺伝子の転写は起こらない (Ogino & Masai 2006)。所属研究室における先行研究により、DSB 因子の中で Mde2 のみが、複製阻害剤であるヒドロキシウレア (HU) 添加により発現が完全に消失することが明らかになった (図 6A、三好ら 2012)。複製チェックポイントの活性化により、Mde2 の機能が抑制されていることが示唆される。

本研究により、Rec15 の DSB ホットスポットへの結合が、*mde2Δ*株において *rec24Δ* 株と同様に著しく低下することが、ゲノムワイドに明らかになった (図 3A, D、表 4)。また、*mde2Δ*株において、SFT 複合体が不安定化することを示した (図 4E, F)。これらの結果から、Mde2 は DSB ホットスポットにおける SFT 複合体の安定的な結合を制御していると考えられた。

そこで、Mde2 の染色体上の局在を ChIP-chip により検証したところ、Mde2 は軸部への結合は弱い一方、DSB ホットスポットにおいて顕著な結合を示した。さらに、この Mde2 の DSB ホットスポットへの結合は、Rec15 に依存することが明らかになった (図 6B-D)。これらの結果は、Mde2 と SFT 複合体が協調的に機能することで DSB ホットスポットに安定的に結合することを再度強く示唆する。

さらに、DSBC 複合体の構成因子である Rec12 の *mbs1* ホットスポットへの結合は、Mde2 の欠損細胞で消失した (図 6E)。以上の結果から、Mde2 は DSB ホットスポットにおいて SFT 複合体を安定化し、DSBC 複合体を DSB ホットスポットへと呼び込

む機能を持ち、この機能を DNA 複製チェックポイントと関係させることで DSB 形成を制御していることが示唆された。

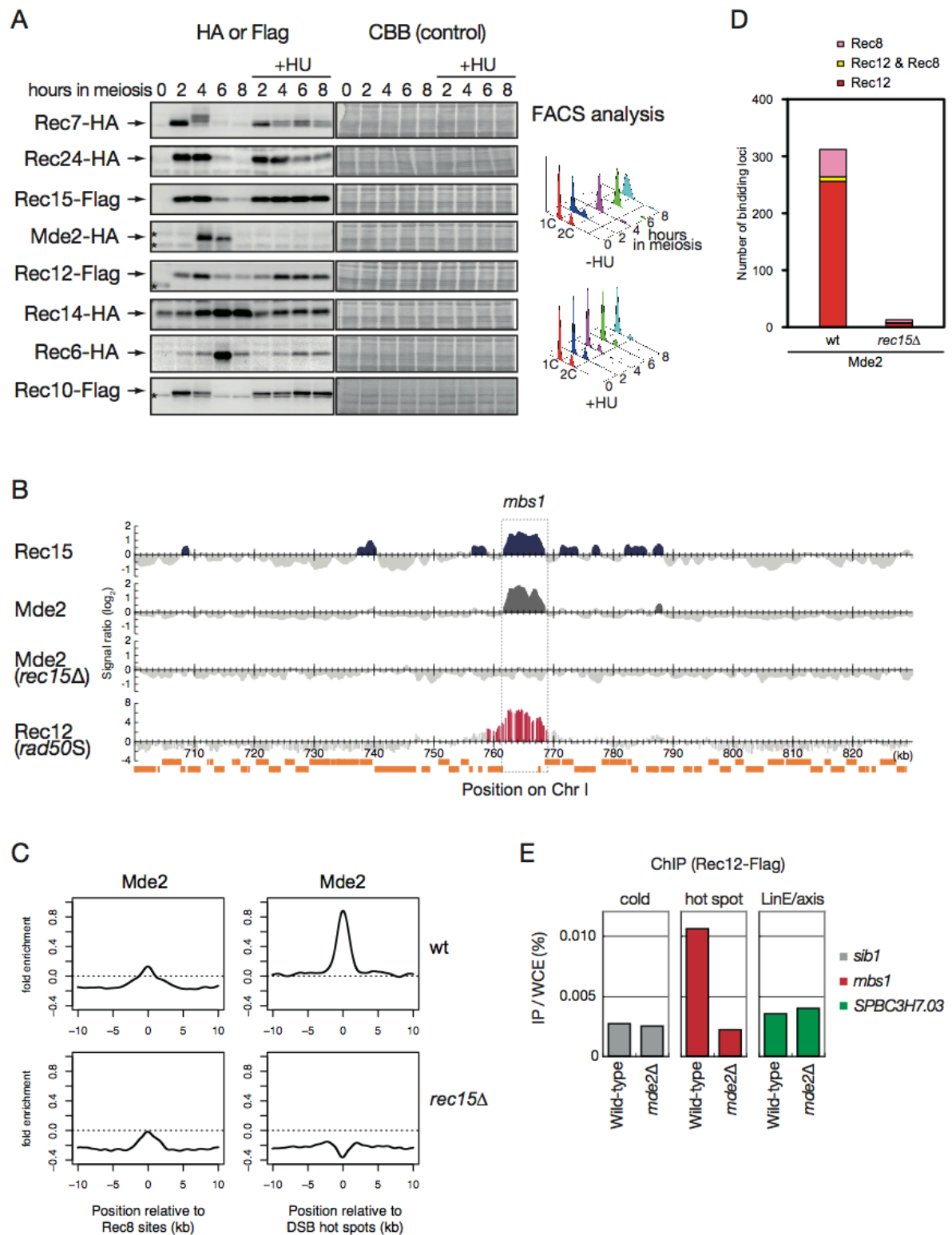


図 6. Mde2 は SFT 複合体と協調的に DSB ホットスポットに結合し、DSBC 複合体を DSB ホットスポットに呼び込む

(A) DNA 複製阻害剤 HU 添加による Mde2 の発現抑制。20mM HU（ヒドロキシウレア）存在、非存在下で減数分裂に誘導し、誘導後 0、2、4、6、8 時間の細胞を回収し、タンパク質抽出後にウェスタンブロットにより検出した（左）。細胞内の DNA 含量をフローサイトメトリーにより調べ、DNA 複製の進行を確認した（右）。共に三好ら（2012）による先行研究。

(B) ChIP-chip によって明らかにした Mde2 の分布。減数分裂誘導後 4 時間の細胞をホルマリン固定し、ChIP-chip 解析を行った。表示は図 3A 同様。

(C) Rec8 結合部位及び DSB ホットスポット周辺の Mde2 の結合。561 ヶ所の Rec8 結合部位、及び 365 ヶ所の DSB ホットスポットに対し、周辺 10 kb の領域における Mde2 の結合（シグナル強度（IP/input、log2））を平均化した。

(D) Rec8 及び Rec12 結合部位と重複する Mde2 結合部位の数。

(E) *mde2* 欠損細胞における Rec12 の DSB ホットスポットへの結合。減数分裂誘導後 4 時間の細胞をホルマリン固定し、ChIP を行った。コールドスポット（*sib1*）、DSB ホットスポット（*mbs1*）、軸部（*SPBC3H7.03*）の各領域において qPCR により IP 効率を測定した。

5. <第 1 章> 考察

5-1. 染色体高次構造による DSB 制御モデル

本研究により、DSB 因子がループ部に位置する DSB ホットスポット及び軸部にどのように集合し、軸-ループ連結構造を確立するのかが、初めて明らかになった。具体的には、DSB 因子が形成する 2 つの複合体が、段階的かつ協調的に DSB ホットスポットへと集合するモデルが考えられる (図 7)。

減数分裂前の DNA 複製の進行に伴い、コヒーシン Rec8 及び軸因子 Rec10 によって軸部が構成され、減数分裂期に特有の軸-ループ構造が確立される。Rec15 は Rec10 によって軸部へと呼び込まれ、それと同時に SFT 複合体と Mde2 は強制的に、ループに位置する DSB ホットスポットへと結合する。安定的にホットスポットに結合した Mde2/SFT 複合体は、Rec15 の自己相互作用 (三好ら 2012) を中心としたタンパク間相互作用によって、軸部と DSB ホットスポットの連結を誘導する。軸部に近接した DSB ホットスポット上の Mde2/SFT 複合体は、DSBC 複合体を DSB ホットスポットへと呼び込む。この DSBC 複合体の呼び込みにおいて、Mde2 と Rec14 の相互作用が重要であると考えられる。

このモデルの優れた点は、ループに位置する DSB ホットスポットが軸部と相互作用する仕組みと DNA 複製の連係が明確になったこと、また、軸因子が DSB 形成に影響を及ぼす理由についても説明可能となったことである。

今回提唱したモデルにおいて、Mde2 は DSB ホットスポットにおいて SFT 複合体を安定化し、それに続いて DSBC 複合体を DSB ホットスポットへ呼び込むという機能を果たすと考えられる。この過程においては、以下の 2 つの分子機構が考えられる。

第 1 は、Mde2 は Rec15 との相互作用を介して SFT 複合体を安定化し、その後 Mde2 は Rec15 から離れ、新たに Rec14 との相互作用を介して DSBC 複合体を呼び込む、

という機構である。第2は、Mde2はRec15及びRec14と同時に相互作用することで、SFT複合体とDSBC複合体の相互作用を仲介する、という機構が考えられる。

第2の機構の場合、SFT複合体とDSBC複合体は *in vivo* で相互作用することになる。実際に、Bonfils & Martin-Castellanos が、SFT複合体のRec7とDSBC複合体のRec12との相互作用を共免疫沈降により検出している（S. Bonfils & C. Martin-Castellanos, personal communication）ことから、後者の機構が支持される。1つの解釈として、Mde2が単独でSFT複合体とDSBC複合体を結びつけるのではなく、Mde2とSFT複合体が安定的に結合することで、初めてDSBC複合体が結合するための土台が完成するのかもしれない。Mde2の役割について更なる検証を進める必要がある。

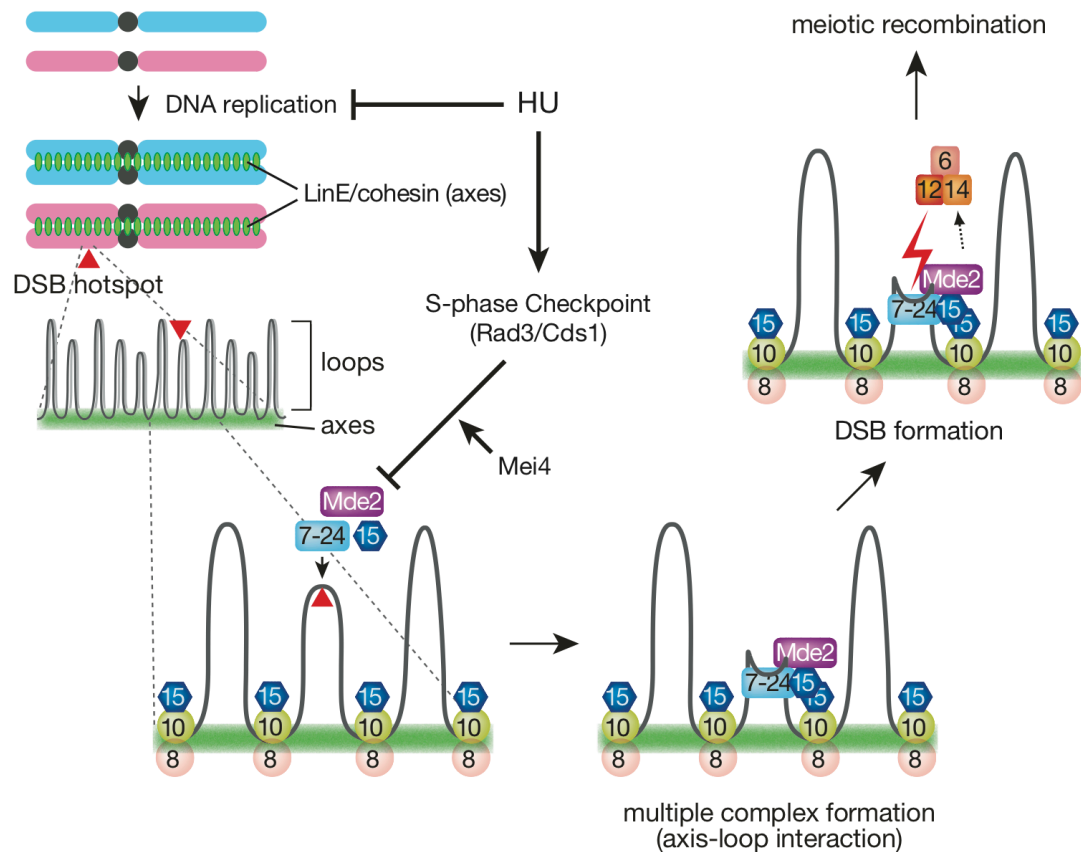


図 7. Mde2 による軸-ループ連結を介した DSB 制御モデル

減数分裂前 DNA 複製の進行に伴い、コヒーシンによる姉妹染色分体間の接着が起こり、減数分裂期に特異的な軸-ループ構造が形成される。SFT 複合体の Rec15 は軸因子 Rec10 依存的に軸部に結合する。DNA 複製が完了すると、Rad3-Cds1 依存的な複製チェックポイントが解除され、Mde2 が発現する。Mde2 は SFT 複合体を安定化し、Mde2 と SFT 複合体は強制的に、ループに位置する DSB ホットスポットに結合する。Mde2 は DSB ホットスポットと軸部の相互作用（軸-ループ連結）を仲介し、Mde2 依存的に、Rec12 を含む DSBC 複合体が軸部と連結した DSB ホットスポットへと結合する。Rec10、SFT 複合体、Mde2 と複合体を形成した DSBC 複合体は活性化され、DSB 形成が起こる。

5-2. Mde2/SFT 複合体の呼び込みにおける局所的なクロマチン構造の役割

本研究で提唱したモデルにより、Mde2/SFT 複合体がどのようにして DSB ホットスポットに結合するのか、という新たな課題が浮上する。1つの可能性として、局所的なクロマチン構造やヒストン修飾が重要な役割を果たしているかもしれない。序章で述べたように、近年、ヒストン修飾やクロマチン構造が DSB ホットスポットの位置の決定に重要な役割を果たす、という報告がなされている (Borde *et al.* 2009; Yamada *et al.* 2004; Yamada *et al.* 2013; Baudat *et al.* 2010; Parvanov *et al.* 2010; Myers *et al.* 2010)。Mde2/SFT 複合体が、ヒストン修飾あるいはそれと関係したクロマチン結合因子と相互作用している可能性が高い。今後、この可能性について検証していきたい。

5-3. Rec15 は軸-ループ相互作用の核である

所属研究室における先行研究により、Rec15 が Yeast two hybrid により自己相互作用を示すことが明らかになった (三好ら 2012)。この自己相互作用を介して、Rec15 は軸部と DSB ホットスポットそれぞれに結合した DSB 因子の集合を促進し、ループに位置する DSB ホットスポットと軸部の連結を誘導すると考えられる。

Rec15 のホモログである出芽酵母の Mer2 は、CDK や DDK などの細胞周期制御因子の標的であり、リン酸化されることで他の DSB 因子との相互作用を促進することが報告されている (Henderson *et al.* 2006; Sasanuma *et al.* 2008; Wan *et al.* 2008)。

分裂酵母においては、Rec15 ではなく、Rec7 が DDK の標的となっている可能性が示唆されている (正井ら、未発表データ)。事実、DDK の機能を欠損した細胞では DSB が形成されない (Ogino *et al.* 2006)。また、Rec7 のタンパク量とリン酸化レベルは、Rec15 あるいは Rec24 の欠損細胞において共に低下する。従って、細胞周期に依存した Rec7 のリン酸化が、DSB ホットスポットにおける SFT 複合体の安定的な結合

を制御している可能性がある。さらに興味深いことに、HUで処理した細胞において、Rec7 のリン酸化レベルの低下が観察された（三好ら 2012）。一方、Rec7 のリン酸化レベルは Rec12 の欠損細胞において変化が見られなかった（三好ら 2012）ことから、HU 処理によるリン酸化レベルの低下は、DSB 非依存的なものであると考えられる。このことは、Rec7 のリン酸化が複製チェックポイントの制御下にある可能性を示唆する。今後、Rec7 のリン酸化が果たす役割について検証を進めていきたい。

5-4. Mde2（リエゾン因子）は複製チェックポイントと関係して軸-ループ相互作用を介した DSB 形成機構を制御する

本研究において、Mde2 は DSB 形成に必要な軸-ループ連結構造の確立に必要であるだけでなく、DNA 複製チェックポイントの標的として、DNA 複製が完了する前に DSB が生じないように制御する機能も有することが明らかになった。この結果から、Mde2 は複製チェックポイントと関係しながら、軸-ループ相互作用を仲介して DSB を制御するリエゾン因子（“liaisonin”、liaison はフランス語で「繋げる・橋渡しする」の意）として機能する、という新たな概念を提示することにした。

この概念は、分裂酵母において DSB 形成は DNA 複製自体ではなく複製チェックポイントによって制御される（Murakami & Nurse 2001, Tonami *et al.* 2005）、という先行研究と一致する。分裂酵母の減数分裂において、Rad3-Cds1 依存的な複製チェックポイントは複製フォークの安定性の維持だけでなく、転写因子 Mei4 の制御下遺伝子（*mde2*⁺を含む）の発現を抑制することで、DSB を含む下流の反応を制御している（Ogino & Masai 2006, Young *et al.* 2004）。*rad3* 及び *cds1* の変異体は HU により複製を阻害した細胞において DSB を形成する。しかしながら、本研究において HU 処理した細胞に Mde2 を過剰発現させたところ、DSB は形成されなかった。このことから、

例えば前述した Rec7 のリン酸化など、Mde2 以外にも複製チェックポイントの標的となる DSB 因子が存在するのではないかと考えられる。

出芽酵母においても、分裂酵母同様に DNA 複製自体は DSB 形成には必要ではない (Hochwagen *et al.* 2005)。前述の通り出芽酵母の DSB 因子の 1 つである Mer2 は CDK 及び DDK の標的であり、これらのキナーゼによる Mer2 のリン酸化が DSB 形成に必須である (Henderson *et al.* 2006; Sasanuma *et al.* 2008; Wan *et al.* 2008)。近年、Mec1 (分裂酵母 Rad3 ホモログ) -Rad53 (分裂酵母 Cds1 ホモログ) 依存的複製チェックポイントが DDK の活性を抑制し、Mer2 のリン酸化を介して DSB 形成を制御する可能性が示された (Blitzblau & Hochwagen 2013)。しかしながら、*mec1* の変異体は HU で処理した細胞において DSB 形成が起こるのに対し、*rad53* の変異体では DSB 形成が起こらない。また、分裂酵母 Mde2 のように HU 処理により発現が消失する DSB 因子は見つかっていない。出芽酵母の複製チェックポイントによる DSB 制御については、まだ未解明の点が多い。

軸-ループ連結を介した DSB 制御モデルは、出芽酵母において DSB ホットスポットが軸部構成因子 (コヒーシン、Red1 (分裂酵母 Rec10 ホモログ) 等) の結合部位の間に観察されたことから、提唱されたモデルである。先行研究において、軸-ループ連結を実験的に示唆する報告はなされていない。しかしながら、出芽酵母の Red1 の局在を ChIP-seq により検証した結果、分裂酵母 Rec10 と同様に、軸部に加えて DSB ホットスポットにも結合することが明らかになった (伊藤ら、未発表データ)。この結果から、DSB 制御に関わる染色体構造の保存性は高いと考えられる。

前述の通り、出芽酵母において Mde2 同様に複製チェックポイントによって発現が制御されている因子は存在しないが、例えば Mer2 のリン酸化のように、複製チェックポイントの標的と成り得る DSB 因子は存在する。今後、これらの因子が DSB ホッ

トスポット及び軸部にどのように結合し、どのように軸-ループ連結構造を形成するのか、検証していく必要がある。

本研究において、配列検索からはMde2のホモログを同定することができなかった。しかしながら、分裂酵母は出芽酵母に比べてループの長さが長く（第2章に記述）、クロマチン構造など、より高等真核生物に近いことから、他の生物種においてMde2と同等の機能を有する因子が存在する可能性は極めて高い。将来的には、X線解析を用いたMde2の立体構造の解析や、マウスなどの高等真核生物におけるMde2のオルソログの同定を通じて、リエゾン因子（“liaisonin”）の普遍的な役割について検証していきたい。

6. <第 2 章> 結果

6-1. Rec8 結合部位間の距離

ChIP-chip 法を用いた先行研究において、出芽酵母の *rad50S* 変異体における DSB 部位は、Rec8 結合部位の間に位置することが報告されている (Glynn *et al.* 2004; Kugou *et al.* 2009)。しかしながら、DSB 部位と軸部の詳細な位置関係は明らかにされていない。

近年、DSB 導入後に生じる Spo11-DNA 複合体 (図 1D、Spo11-oligo) の DNA 配列を次世代シーケンサーを用いて解析することにより、高解像度での DSB 部位の分布が明らかになった (Spo11-oligo mapping、Pan *et al.* 2011)。また、ChIP 法と次世代シーケンサーを組み合わせることにより (ChIP-seq 法)、ChIP-chip よりも高解像度での Rec8 の局在解析が可能となった。そこで本研究では、これらの新技術を用いて明らかになった DSB 部位と Rec8 結合部位の位置関係を、詳細に検証することにした。

まず、Rec8 の全ゲノムにおける分布を、ChIP-seq 法を用いて調べた (図 8A)。所属研究室の先行研究により、減数分裂誘導後 3-5 時間において Rec8 の局在は変化しないことが示されている (Kugou *et al.* 2009)。本研究では減数分裂誘導後 4 時間の細胞を用いて検証を行った。その結果、Rec8 はセントロメア及び染色体腕部において顕著な結合を示した。セントロメア周辺 (70 kb) 及びテロメア周辺 (各染色体末端から 30 kb) を除いた染色体腕部において、724 ヶ所の Rec8 結合部位が検出された (図 8B)。これはすなわち、出芽酵母においては 8 遺伝子に 1 ヶ所の割合で Rec8 結合部位が存在することを意味する。また、先行研究における報告と同様、Rec8 の結合部位はコンバージェント方向に転写される遺伝子の間に多く位置することが明らかになった (図 8C)。

Rec8 は軸部を構成する因子の 1 つであるため、隣接する Rec8 結合部位に挟まれた

領域は、最小のループであると考えられる。そこで、染色体腕部に位置する Rec8 結合部位に対し、各 Rec8 結合部位によって挟まれる領域 (Rec8 間領域) の長さの分布を調べた (図 8B)。Rec8 はセントロメア及びテロメア周辺において、染色体腕部とは異なった局在パターンを示し、また、これらの領域においては DSB の頻度が低いことが既に報告されている。そこで本研究では、染色体腕部に位置する Rec8 結合部位のみを考慮することとした。その結果、Rec8 間領域の長さの平均値は 13.6 kb、中央値は 12.1 kb であった (表 5)。

続いて、第 1 章において ChIP-chip により局在を明らかにした分裂酵母の Rec8 についても、染色体腕部における Rec8 間領域の長さの分布を調べた (図 9)。その結果、Rec8 間領域の長さの平均値は 23.6 kb、中央値は 20.2 kb であり、出芽酵母と比較して約 2 倍であることが明らかになった。

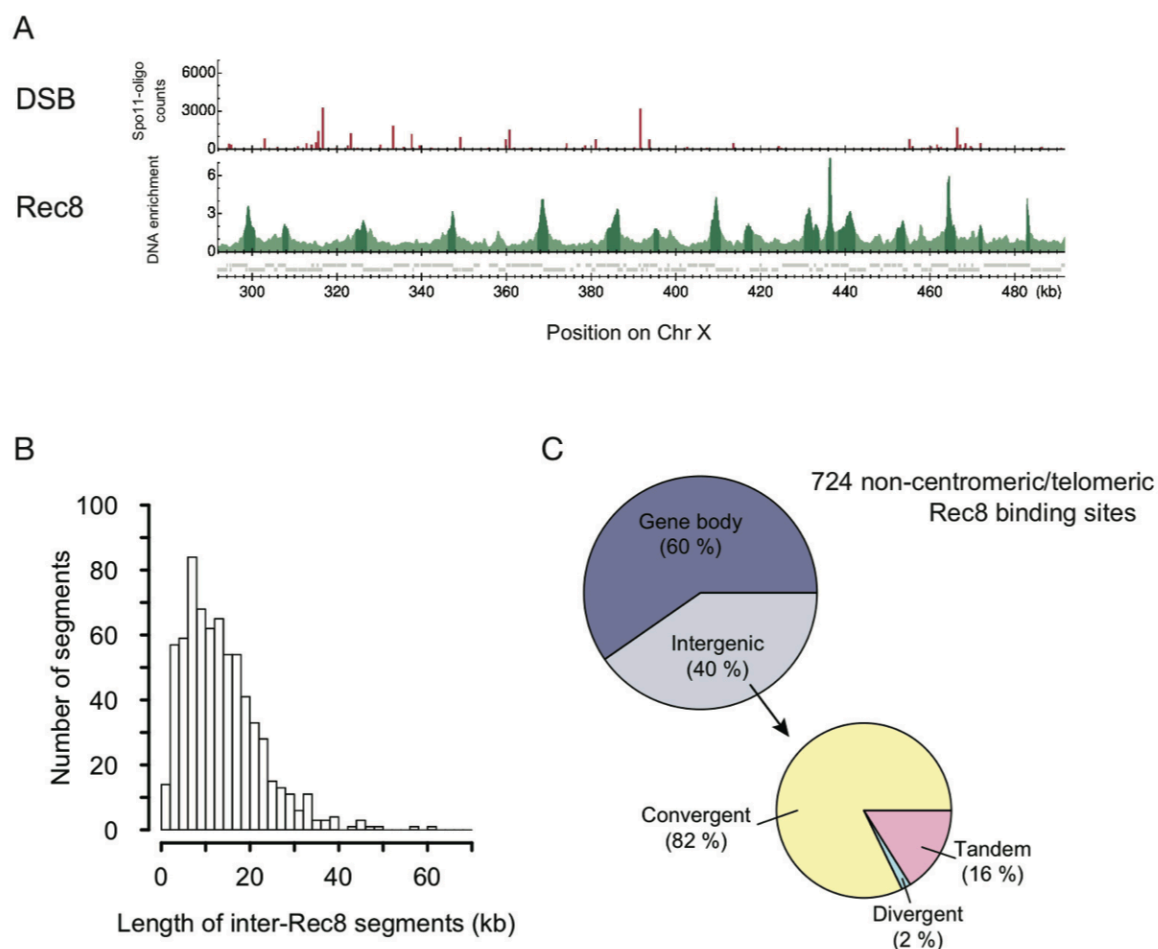


図 8. 出芽酵母 Rec8 の分布

(A) ChIP-seq によって明らかにした Rec8 の分布。減数分裂誘導後 4 時間の細胞をホルマリン固定し、ChIP-seq 解析を行った。Rec8 の分布 (緑色) の縦軸は DNA enrichment (IP タグカウント/input タグカウント)、DSB の分布 (赤色) の縦軸は Spo11-oligo タグカウントを表す。濃緑色の領域は、Rec8 が有意に結合している領域を示す (有意な結合領域の決定方法は“材料と方法 (出芽酵母)”を参照)。横軸の灰色の四角は遺伝子の ORF を示す。Spo11-oligo のデータは先行研究 (Pan *et al.* 2011) を参照した。

(B) Rec8 間領域の長さの分布。染色体腕部において検出された 724 ヶ所の Rec8 結合部位に対し、隣り合う Rec8 結合部位の間の領域を“Rec8 間領域”と定義した (全 693

領域)。

(C) Rec8 結合領域の、遺伝子内領域、遺伝子間領域に位置する割合。染色体腕部に位置する 724 ヶ所の Rec8 結合部位は、遺伝子内領域に位置するものと、遺伝子間領域に位置するものの 2 つに分類された。さらに、遺伝子間領域に位置する 292 ヶ所の Rec8 結合部位は、コンバージェント方向の遺伝子間領域、ダイバージェント方向の遺伝子間領域、タンデム方向の遺伝子間領域に位置するものの 3 つに分類された。遺伝子内領域、遺伝子間領域の決定は、先行研究 (Jiang & Pugh 2009) により示されている遺伝子の転写開始点 (TSS)、転写終結点 (TTS) に従って行った。

表 5. 出芽酵母 Rec8 結合の特徴

Region	Length of inter-Rec8 segments (kb)		Width of Rec8 peaks (kb)		Strength of Rec8 binding ¹	
	mean	median	mean	median	mean	median
arm	13.6	12.1	2.5	2.4	2.53	2.30
centromeric	7.4	6.4	3.7	3.4	3.29	2.91
telomeric	19.0	7.3	2.2	2.0	2.25	1.93

¹Values represent DNA enrichment (IP/input) of peak summits

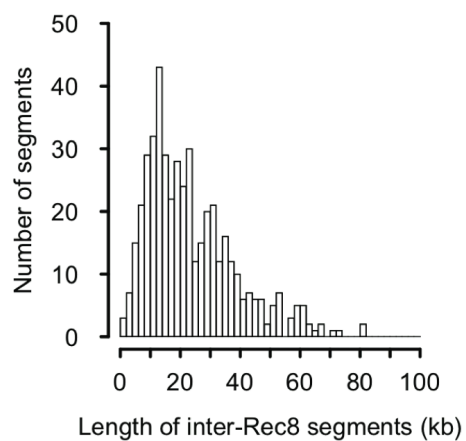


図 9. 分裂酵母 Rec8 間領域の長さの分布

ChIP-chip により明らかにした 561 ヶ所の Rec8 結合部位（図 3A）の内、染色体腕部に位置する 468 ヶ所の Rec8 結合部位に対し、隣り合う Rec8 結合部位の間の領域を“Rec8 間領域”と定義した（全 462 領域）。

6-2. Rec8 結合部位近傍に形成される DSB コールドスポット

次に、本研究によって明らかになった出芽酵母 Rec8 の結合部位を、“Spo11-oligo mapping”によって明らかになった DSB 部位 (Pan *et al.* 2011) と比較検証した。

“Spo11-oligo mapping”により、出芽酵母全ゲノムにおいて 3,600 ヶ所の DSB ホットスポットが同定され、その内 3,175 ヶ所が染色体の腕部に位置している。そこで、これら染色体腕部に位置する DSB ホットスポットについて、Rec8 間領域における相対位置を調べた。その結果、DSB ホットスポットの頻度は、Rec8 間領域においてほぼ一様であった (図 10A)。また、各 Rec8 間領域に含まれる DSB ホットスポットの数は、0 個から 17 個まで幅があり (平均 4.3 個、図 10B)、各 Rec8 間領域における DSB の頻度 (DSB ホットスポットの数と Spo11-oligo のカウント数の合計) と Rec8 間領域の長さとの間には、正の相関が見られた (図 10C)。

興味深いことに、Rec8 間領域の中心部ではほぼ一様である DSB ホットスポットの頻度が、Rec8 結合部位の近傍では著しく低いことが明らかになった (図 10A、青矢印)。この Rec8 結合部位近傍における“DSB コールドスポット”は、Rec8 結合部位から 0.8 kb の領域で見られ (図 10D)、この領域にはわずか 2.7% (86 ヶ所/3,175 ヶ所) の DSB ホットスポットしか含まれていない。これらの結果から、Rec8 結合部位 (軸部) で挟まれた領域 (ループ) は DSB が起こりやすい状態にあるが、Rec8 結合部位近傍では、DSB が起こりにくい状態にあることが明らかになった。

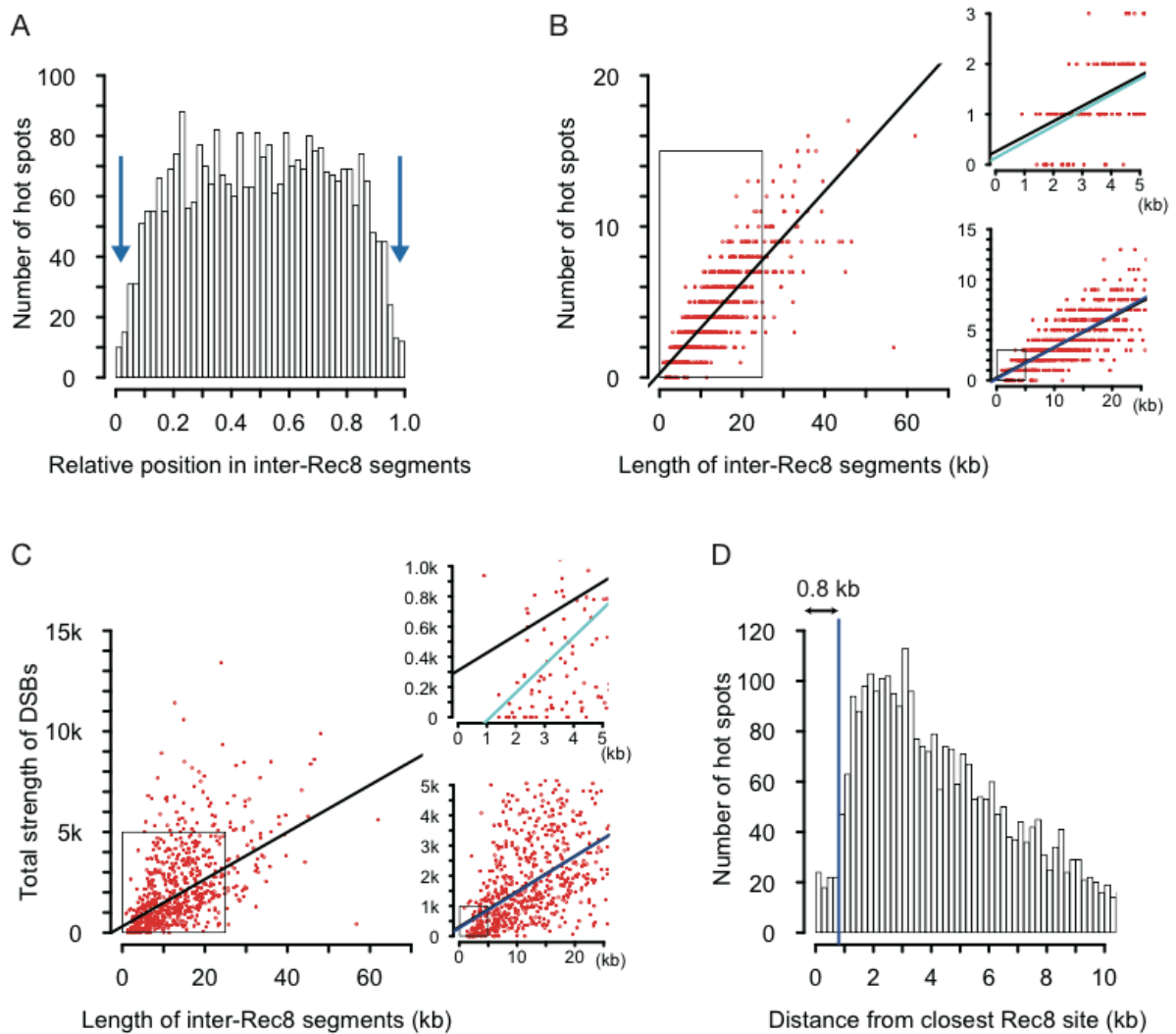


図 10. Rec8 間領域における DSB ホットスポットの分布

Pan *et al.* (2011)によって同定された 3,600 ヶ所の DSB ホットスポットの大部分 (3,175 ヶ所) は染色体腕部に位置する。これら 3,175 ヶ所の DSB ホットスポットについて、Rec8 間領域 (全 693 領域) における分布を検証した。セントロメア周辺、及びテロメア周辺は Rec8 結合部位間の距離が染色体腕部に比べて短く、異なった Rec8 の局在パターンを示すため、これらの領域に位置する DSB ホットスポット (425 ヶ所) は解析対象から除いた。

(A) Rec8 間領域における DSB ホットスポットの相対的な位置。注目すべき点として、Rec8 結合部位の近傍において、DSB ホットスポットの数が顕著に低下している (青

色矢印)。

(B) Rec8 間領域における DSB ホットスポットの数と、Rec8 間領域の長さの相関。黒、青、水色の線は、 $\leq 70\text{kb}$ 、 $\leq 25\text{kb}$ 、 $\leq 5\text{kb}$ の Rec8 間領域のプロットに対する回帰直線を示す。

(C) DSB 強度（各 Rec8 間領域に位置する DSB ホットスポットの Spo11-oligo カウン
トの総和）と Rec8 間領域の長さの相関。回帰直線は(B)と同様。

(D) DSB ホットスポットの頻度と、各 DSB ホットスポットから最も近い Rec8 結合部
位までの距離。Rec8 結合部位近傍（Rec8 結合部位から $\leq 0.8\text{ kb}$ 、青色線）において、
DSB ホットスポットの頻度が顕著に低い。

6-3. 軸部近傍における Gal4BD-Spo11 依存的な DSB 形成

Rec8 結合部位近傍において DSB コールドスポットが形成される理由として、軸部近傍では Spo11 の DNA 切断活性が抑制されている可能性が考えられた。そこで、この可能性を検証するために、Gal4BD-Spo11 による Spo11 の強制結合系を用いた。転写因子 Gal4 の DNA 結合ドメイン (Gal4BD) と Spo11 を融合させることで、天然の DSB ホットスポットに加えて、Gal4 結合配列においても新たに DSB を導入することができる (Pecina *et al.* 2002)。Gal4BD-Spo11 を Rec8 結合部位近傍に強制結合させた場合に DSB が導入されるか、検証することにした。

まず初めに、Gal4BD-Spo11 を発現する細胞において Rec8 の局在を ChIP-seq により調べた (図 11A)。その結果、Gal4BD-Spo11 発現細胞における Rec8 の分布は、野生型及び Gal4BD のみの発現細胞と変化しないことが確認された。また、Gal4BD-Spo11 は減数分裂に入る前から Gal4 結合配列 (UAS) に結合していることを確認した。これらの結果から、Gal4BD-Spo11 の染色体への結合は、軸-ループ構造の形成に影響しないことが示された。

続いて、Gal4BD-Spo11 を Rec8 結合部位近傍に強制結合させた場合に DSB が導入されるかどうか、サザンハイブリダイゼーションにより検証を行った。先行研究により Gal4BD-Spo11 依存的な DSB 形成が報告されている *GAL2* 遺伝子のプロモーターに位置する UAS において、DSB が導入されることを確認した (図 11B)。一方、Rec8 結合部位近傍 (Rec8 結合部位から ≤ 0.8 kb) に位置する UAS については、検証を行った全 5 ヶ所において、DSB が検出されなかった (図 11C-E、及びデータ非表示)。

今回検証を行った領域の 1 つである *YNL241c* 領域には、2 つの UAS が存在する。1 つは Rec8 結合部位から 0.3 kb (“軸近接 UAS”)、もう 1 つは 0.9 kb (“軸遠位 UAS”) 離れている。これら 2 つの UAS における Gal4BD-Spo11 の結合を ChIP-seq により調

べたところ、*GAL2* プロモーターの UAS よりは弱いものの、同程度の結合が確認された。しかしながら、軸遠位 UAS においては Gal4BD-Spo11 依存的な DSB が弱いながらも検出されたものの、軸近接 UAS においては DSB が検出されなかった。

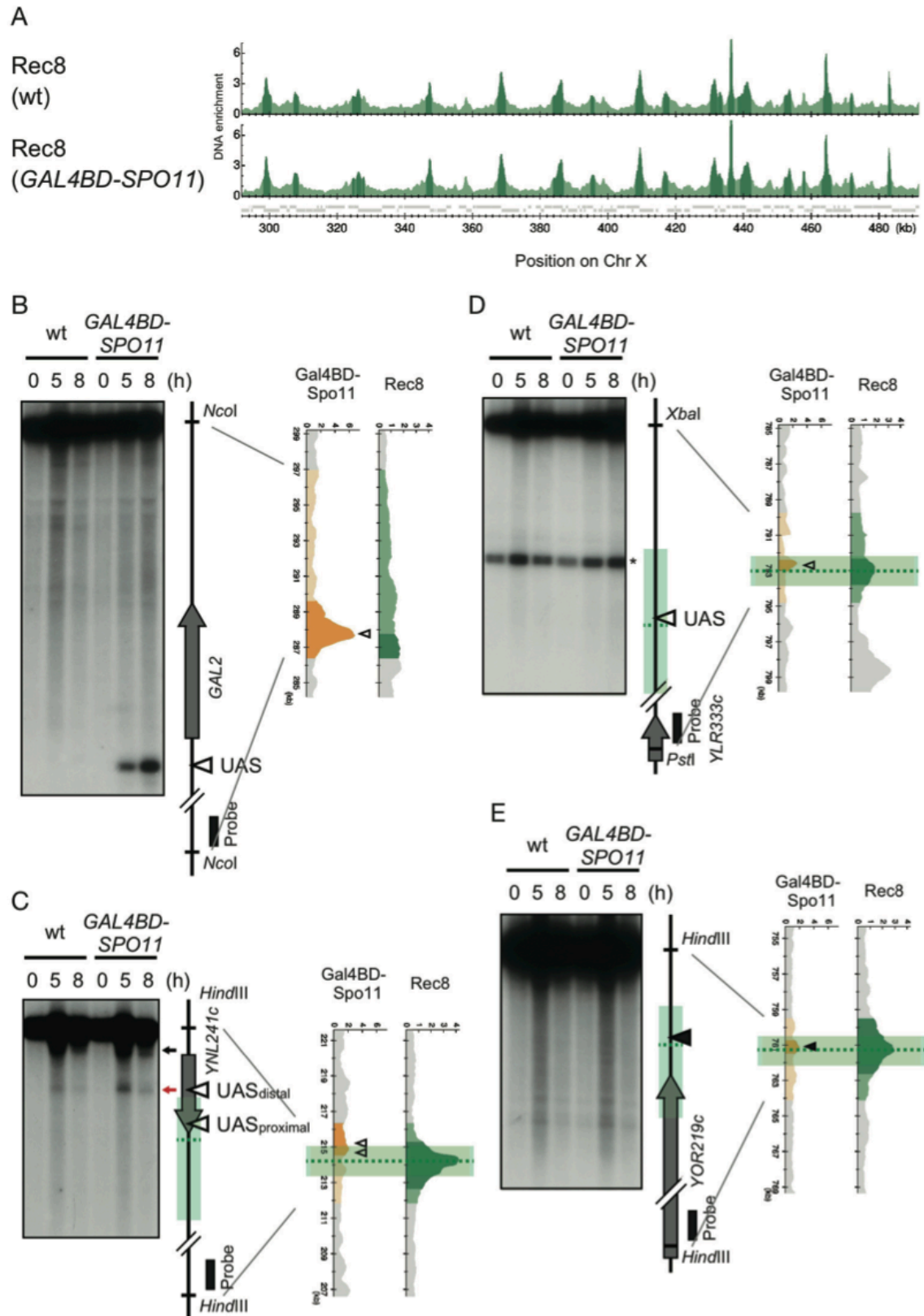


図 11. Rec8 結合部位近傍における Gal4BD-Spo11 誘導型 DSB 形成

(A) 野生型及び *GAL4BD-SPO11* 株における Rec8 の分布。減数分裂誘導後 4 時間の細胞を固定し、ChIP-seq 解析を行った。表示は図 8A 同様。

(B)-(E) *GAL2* (B)、*YNL241c* (C)、*YLR333c* (D)、*YOR219c* (E) 各領域におけるサザンブロット解析。*sae2* 欠損株 (*rad50S* 変異体同様、DSB が修復されずに蓄積する変異体) を減数分裂誘導後 0、5、8 時間に回収し、サザンブロット解析により DSB の検出を行った。減数分裂誘導後 0 時間の Gal4BD-Spo11 の分布 (黄色) と、誘導後 4 時間の Rec8 の分布 (緑色) を併せて示した。Gal4BD-Spo11、及び Rec8 が有意に結合している領域をそれぞれ濃緑色、濃黄色で示した (有意な結合領域の決定方法は“材料と方法 (出芽酵母)”を参照)。Gal4 結合配列 (UAS) の位置は白抜き矢頭で示した。*YOR219c* 領域(E)には UAS は存在しないが、有意な Gal4BD-Spo11 結合ピークが存在する (黒塗り矢頭、有意な結合領域の決定方法は“材料と方法 (出芽酵母)”を参照)。Rec8 結合部位は緑色の点線で、Rec8 結合部位近傍 ≤ 0.8 kb の領域は薄緑色の四角で示した。各 Gal4 結合部位 (白抜き矢頭、黒塗り矢頭) から最も近い Rec8 結合部位までの SK1 配列上の距離は以下の通り。UAS_{proximal}、*YNL241c* 領域(C) : 332 bp、UAS_{distal}、*YNL241c* 領域(C) : 917 bp、*YLR333c* 領域(D) : 55 bp、*YOR219c* 領域(E) : 130 bp。黒色矢印は天然の DSB、赤色矢印は Gal4BD-Spo11 誘導型 DSB を示す。アスタリスクはクロスハイブリダイゼーション由来の非特異的バンド。

6-4. DSB 形成時における Spo11 の軸部への結合

所属研究室における先行研究により、Spo11 が DSB を形成する前に軸部において Rec8 と共局在し、その後 DSB 形成時には、ループに位置する DSB ホットスポットへと局在を変化させることが示された (図 12A、Kugou *et al.* 2009)。このことから、Spo11 が DSB 形成時に軸部から離れることで、軸部近傍において DSB コールドスポットが形成される可能性が考えられた。この可能性をゲノムワイドに検証するために、減数分裂誘導後 3-5 時間の細胞をホルマリンで固定し、Spo11 の分布を ChIP-seq 法により調べた (図 12B)。統計解析の結果、DSB 形成時 (減数分裂誘導後 4 時間前後) においても、Spo11 が軸部に相当量結合していることが明らかになった。これにより、軸部近傍における DSB コールドスポット形成は、Spo11 の軸部からの局在変化が理由ではないことが示された。

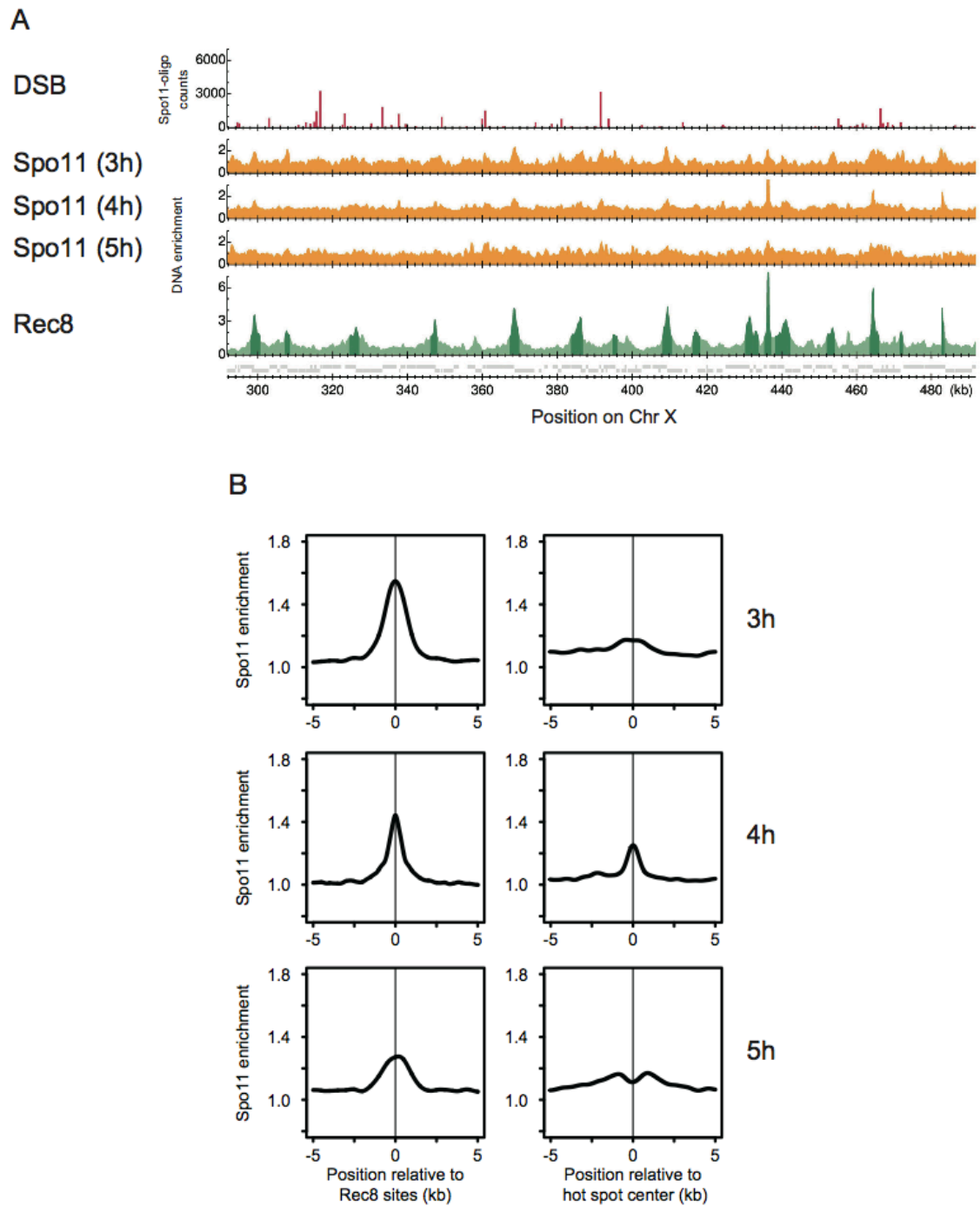


図 12. DSB 形成時期における Spo11 の分布

(A) ChIP-seq によって明らかにした Spo11 の分布。減数分裂誘導後 3、4、5 時間の細胞をホルマリン固定し、ChIP-seq 解析を行った。表示は図 8A 同様。

(B) Rec8 結合部位及び DSB ホットスポット周辺の Spo11 の結合。染色体腕部に位置

する 724 ヶ所の Rec8 結合部位に対し、周辺 5 kb の領域における Spo11 の結合 (DNA enrichment (IP/input)) を R (<http://www.r-project.org>) の smooth.spline コマンドを用いて平均化した (左)。DSB ホットスポットの内、Spo11-oligo カウント上位 25% の DSB ホットスポットについても、同様に解析した (右)。

6-5. Rec8 結合部位近傍における H3K4 の低メチル化

出芽酵母の DSB ホットスポット周辺では、H3K4me3 レベルが高いことが報告されている (Borde *et al.* 2009)。そこで、Rec8 の分布について、先行研究により調べられた H3K4me3 レベル (Zhang *et al.* 2011) との比較検証を行った。その結果、先行研究による報告と同様、DSB ホットスポット周辺 0.5 kb の領域において、ヌクレオソーム量 (ヒストン H3 の量) が顕著に少ないことを確認した (図 13A、Hansen *et al.* 2011; Pan *et al.* 2011)。また、Rec8 結合部位周辺 0.5 kb の領域においても、ヌクレオソーム量がわずかながら減少していることが明らかになった (図 13B)。

H3K4me3 レベル (H3 量で平均化した値) については、先行研究による報告と同様に、ホットスポット周辺で高い一方、DSB ホットスポット自体 (ホットスポットの中心から 0.1 kb の領域) は顕著に低い (図 13C、Borde *et al.* 2009; Hansen *et al.* 2011; Tischfield & Keeney 2012)。これに対し Rec8 結合部位周辺 0.8 kb の領域では、H3K4me3 レベルが低いことが初めて明らかになった (図 13D)。これにより、軸部近傍において H3K4me3 レベルが低いことが示された。

先行研究において、コヒーシンはコンバージェント方向に転写される遺伝子の間に局在することが報告されている (Glynn *et al.* 2004; Lengronne *et al.* 2004)。一方で、DSB ホットスポットの多くは、遺伝子のプロモーター領域に存在する (Baudat & Nicolas 1997; Pan *et al.* 2011; Tischfield & Keeney 2012)。これらの観察結果から、軸部近傍で DSB ホットスポットの頻度が低いのは、Rec8 結合部位近傍にプロモーターが少ないだけではないか、という懸念が考えられた。

そこで、これについて検証するために、転写開始点 (transcription start site; TSS) 及び終結点 (transcription termination site; TTS) 周辺における Rec8 の結合と H3K4me3 レベルを比較した。TSS 及び TTS の位置については、既に報告されているデータを

参照した (Jiang & Pugh 2009)。その結果、TTS 周辺において、確かに Rec8 が多く結合しており、H3K4me3 レベルが低いことが示された (図 13E)。この傾向は、特にコンバージェント方向に転写される遺伝子の TTS 周辺で顕著に見られた。

続いて、DSB ホットスポットの大多数が遺伝子のプロモーターに存在することを考慮した上で、DSB ホットスポットの頻度が Rec8 結合部位近傍で有意に低いかどうか検証するために、permutation test を行った。この解析では、染色体腕部に位置する 3,175 ヶ所の DSB ホットスポットそれぞれについて、下流に位置する最も近い TSS までの距離を調べ、その距離を維持したまま DSB ホットスポットを TSS の上流にランダムに割り振る、という方法を用いた。その結果、DSB ホットスポットが遺伝子のプロモーターに頻出することを考慮した上で、Rec8 結合部位近傍における DSB ホットスポットの頻度が有意に低いことが示された (Rec8 間領域が 0-0.1/0.9-1.0 の領域で $p < 0.05$ 、Rec8 結合部位から ≤ 0.8 kb の領域で $p < 0.001$ 、その他のパラメーターについては表 6 参照)。

TSS は Rec8 結合部位近傍 (Rec8 結合部位から ≤ 0.8 kb) にも存在する (同一方向に転写される遺伝子の間など、図 8C)。これらの TSS においては、Rec8 結合部位から離れた領域に位置する TSS に比べて H3K4me3 レベルが低く (図 13F)、DSB コールドスポットの割合も高い (図 13G)。さらに、permutation test の結果、Rec8 結合部位近傍 (Rec8 結合部位から ≤ 0.8 kb) の TSS と DSB ホットスポットとの距離は、他の TSS と比べて有意に大きいことが明らかになった (表 7)。

以上の結果から、Rec8 結合部位近傍に位置するプロモーター領域は、Rec8 結合部位から離れた領域に位置するプロモーターに比べて、確かに DSB ホットスポットを形成しにくいことが明らかになった。

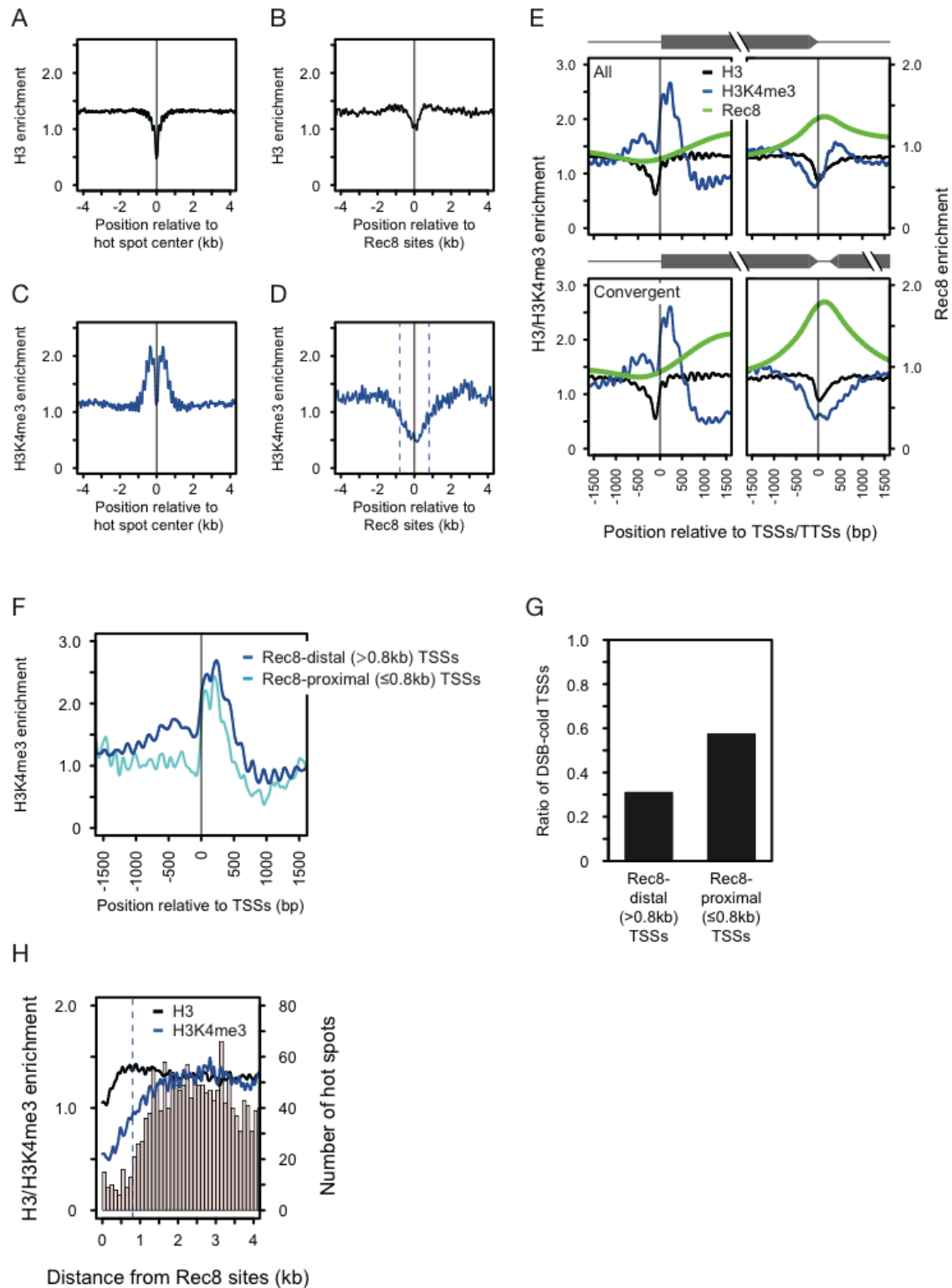


図 13. H3K4me3 レベルと Rec8 結合の逆相関

H3 及び H3K4me3 の分布について、先行研究 (Zhang *et al.* 2011) における減数分

裂誘導後 2 時間の ChIP-seq の結果の midpoint 値を参照した。H3 タグカウントは 3-bp bin で平滑化した後、全タグカウントで標準化することで“H3 enrichment”として示した。H3K4me3 タグカウントは、H3 同様に 3-bp bin で平滑化し、全タグカウントを H3 と揃えた上で H3 タグカウントで標準化し、“H3K4me3 enrichment”とした。DSB ホットスポット、Rec8 結合部位、転写開始点 (TSS)、転写終結点 (TTS) 周辺の H3 及び H3K4me3 のデータは、3 bin で平均化された後、R の ksmooth コマンドに従って平均化された。

(A、B) DSB ホットスポット及び Rec8 結合部位周辺の H3 レベル。3,600 ヶ所の DSB ホットスポット (A)、あるいは染色体腕部に位置する 724 ヶ所の Rec8 結合部位 (B) に対し、周辺 4 kb の領域における H3 のデータを平均化した。

(C、D) DSB ホットスポット及び Rec8 結合部位周辺の H3K4me3 レベル。青色点線は Rec8 結合部位から ± 0.8 kb の位置を示す。

(E) TSS 及び TTS 周辺の H3 レベル、H3K4me3 レベル、Rec8 の結合。上段は先行研究 (Jiang & Pugh 2009) によって示されている全遺伝子 (5,771 遺伝子) の TSS 及び TTS に対して、下段はこれらの内、コンバージェント方向に転写される遺伝子 (2,200 遺伝子) に対して、周辺 1,500 bp の領域における H3、H3K4me3、Rec8 のデータを平均化した。

(F) Rec8 近接 TSS、遠位 TSS 周辺の H3K4me3 レベル。染色体腕部に位置する遺伝子 (4,836 遺伝子) の TSS を、Rec8 結合部位近傍 (Rec8 結合部位から ≤ 0.8 kb) に位置するもの (Rec8 近接 TSS、197 ヶ所) と、そうでないもの (Rec8 遠位 TSS、4,639 ヶ所) に分類し、Rec8 近接 TSS、遠位 TSS それぞれに対し、周辺 1,500 bp の領域における H3K4me3 データを平均化した。

(G) Rec8 近接、遠位領域における DSB コールドな TSS の割合。各 TSS について、TSS

上流に位置する最も近いDSBホットスポットまでの距離を測定した。197ヶ所の Rec8 近接 (≤ 0.8 kb) TSS の内 113 ヶ所 (57%) が、TSS 上流 400 bp に DSB ホットスポットを 1 つも持たない“DSB コールド”な TSS であった。一方、4,639 ヶ所の Rec8 遠位 (>0.8 kb) TSS の内、1,438 ヶ所 (31%) が“DSB コールド”な TSS であった。

(H) Rec8 結合部位周辺における DSB ホットスポットの数と H3K4me3 レベルの相関。
染色体腕部に位置する 724 ヶ所の Rec8 結合部位に対し、周辺 4 kb の領域における H3 と H3K4me3 のデータを平均化した。青色点線は Rec8 結合部位から 0.8 kb の位置を示す。

表 6. Rec8 結合部位近傍における DSB ホットスポットの数

	Observed	<i>p</i> -value ¹
Relative position in inter-Rec8 segments: 0-0.05/0.95-1	102	0.00085
Relative position in inter-Rec8 segments: 0-0.1/0.9-1	345	0.03
Distance from closest Rec8 binding site: ≤0.6 kb	64	0.023
Distance from closest Rec8 binding site: ≤0.8 kb	86	0.00027
Distance from closest Rec8 binding site: ≤1 kb	132	0.00027
Distance from closest Rec8 binding site: ≤1.5 kb	334	0.0071
Distance from closest Rec8 binding site: ≤2 kb	573	0.019

¹Probability for obtaining less than observed number based on 10⁵ permutation runs

表 7. Rec8 近接 TSS 及び遠位 TSS から上流の最も近い DSB ホットスポットまでの平均距離

Border (kb) ¹	Number of TSSs		Average distance (bp)		<i>p</i> -value ²
	proximal	distal	proximal	distal	
0.6	127	4709	4423	1145	<0.00001
0.8	197	4639	3495	1134	<0.00001
1	296	4540	3023	1114	<0.00001
1.5	636	4200	2126	1095	0.00002
2	1009	3827	1782	1085	0.00006

¹Cutoff to determine Rec8-proximal and -distal TSSs

²Probability for obtaining less than observed difference between the average distances based on 10⁵ permutation runs

TSS から、TSS 上流に位置する最も近い DSB ホットスポットまでの距離の平均が、Rec8 近傍に位置する TSS (Rec8 近接 TSS) の方が Rec8 近傍に位置しない TSS (Rec8 遠位 TSS) よりも長いことは、すなわち Rec8 近接 TSS の方が、TSS 上流における DSB ホットスポットの頻度が低い (DSB コールドスポットを形成しやすい) ことを意味する。

7. <第 2 章> 考察

7-1. 出芽酵母、分裂酵母、及びマウスにおけるループの長さ

本研究により、減数分裂期の染色体に特有の軸-ループ構造が酵母においてどのような特徴を有しているか、明らかになった。今回、出芽酵母の染色体腕部において 693 の Rec8 間領域が同定された。この Rec8 間領域の長さは、ループ長の最小値であると想定され、その長さは 5 kb から 50 kb まで多岐に渡る（平均値は 13.6 kb、中央値は 12.1 kb）。

本研究により得られた結果は、既に報告されている有糸分裂期のコヒーシン結合部位間の距離と一致する（Glynn *et al.* 2004; Lengronne *et al.* 2004）。この結果から、減数分裂期の二倍体の出芽酵母は、最大で 1,386 (693 x 2) のループを有すると考えられる。仮に全てのループが相同染色体間で対合していると仮定すると、693 のループ対を有することになり、これは出芽酵母一細胞において検出される DSB の数（～200）の 3-4 倍に相当する。

全ゲノム中に存在するループの長さと数は、種によって異なる。本研究により、分裂酵母の Rec8 間領域の長さは出芽酵母の約 2 倍であることが明らかになった（平均値は 23.6 kb、中央値は 20.2 kb）。また、染色体腕部における Rec8 間領域は 462 領域検出され、これは出芽酵母の 67%に相当する。

マウスの常染色体のループの平均長は 6 μm (Novak *et al.* 2008)、レプトテン期の常染色体のループの平均 DNA 長は、79-94 kb/ μm である (Kauppi *et al.* 2011)。従って、マウスの常染色体のループの DNA 長は約 500 kb であると考えられ、これは出芽酵母の最小ループ長 (Rec8 間領域の距離) の約 50 倍に相当する。減数分裂期の二倍体のマウスのゲノムサイズは 5.0 Gb であるため、約 10,000 のループを有することになり、この数は、酵母のわずか 6 倍に過ぎない。

先行研究において、1つのループが1つのDSB形成ユニットとして機能する（1つのループにおいては1つのDSBが形成される）、というモデルが提唱されている（Kleckner *et al.* 2003）。このモデルを踏まえると、ループの長さ（約50倍の差）に比べて明らかに差の小さいループの数（約6倍の差）が、DSBの数（1細胞当たりのDSBの数が酵母とマウスでほぼ同等）を制御する可能性が考えられる。

本研究により、1つのループが複数のDSBホットスポットを含むことが明らかになった。このモデルに従うと、1つのループに含まれる複数のDSBホットスポットの中で、1ヶ所のみが実際にDSBを形成すると考えられる。この考えは、ゲノム上にDSBホットスポットが大多数存在するにもかかわらず1細胞においてはわずか200ヶ所程度でしかDSBが起こらないという観察結果と矛盾しない。ループ内においてDSB部位がどのようにして選択されるのか、今後その機構について検証していきたい。

7-2. Rec8 結合部位近傍におけるDSB コールドスポット形成

本研究により、DSBホットスポットの頻度がRec8結合部位近傍（Rec8結合部位から ≤ 0.8 kbの領域）で顕著に低いことが明らかになった。これにより、軸部近傍において、“DSB コールドスポット”が形成されていることが示唆された。

今回、Gal4BD-Spo11を軸部近傍に強制的に結合させたところ、DSBは検出されなかった。検証を行った領域の1つである*YNL241c*領域には、2つのUASがあり、Rec8結合部位から0.9 kb離れたUAS（軸遠位UAS）においてはGal4BD-Spo11依存的なDSB形成が検出されたが、Rec8結合部位から0.3 kb離れたもう1つのUAS（軸近接UAS）においては、DSBが検出されなかった（図11C）。これらの2つのUASにおけるGal4BD-Spo11の結合量は同程度（ChIP-seqによるGal4BD-Spo11の結合量は、

それぞれ *GAL2* UAS の 8.8%と 8.5%) であることから、軸近接 UAS は、Rec8 結合部位近傍における DSB 抑制機構の制御下にあるのではないかと考えられる。実際に、軸近接 UAS は、ゲノムワイドに DSB コールドスポット形成が観察された領域 (Rec8 結合部位から ≤ 0.8 kb の領域) の範囲内に位置している。

本研究では Rec8 結合部位近傍 (Rec8 結合部位から ≤ 0.8 kb) に位置する 5 ヶ所の UAS について Gal4BD-Spo11 の強制結合による DSB 誘導を検証したが、その全てにおいて DSB 形成は見られなかった。ChIP-seq により、これら全ての領域において Gal4BD-Spo11 の有意な結合が検出されたことから、Rec8 結合部位近傍では Spo11 による DSB 形成 (DNA 切断活性) が局所的に抑制されている可能性が示唆される。しかしながら、今回検証を行わなかった UAS においては、Gal4BD-Spo11 により DSB が誘導される可能性は否定できない。

ゲノムワイドに検証を行う方法として、“Spo11-oligo mapping”を Gal4BD-Spo11 系に適用し、Gal4BD-Spo11-oligo を検出する方法が極めて有効であると考えたが、成功に至らなかった。原因としては、細胞内に過剰に発現させた Gal4BD-Spo11 の内、DSB を導入し DNA (oligo) と複合体を形成する Gal4BD-Spo11 分子の割合が極端に少なく、免疫沈降による Gal4BD-Spo11-oligo の収量が少なかったことが挙げられる。

出芽酵母において、DSB ホットスポットの多くは遺伝子のプロモーター領域に存在する (Baudat & Nicolas 1997; Pan *et al.* 2011; Tischfield & Keeney 2012)。一方で、Rec8 結合部位は TTS に多い。そのため、Rec8 結合部位近傍での DSB コールドスポットの形成は、単純に Rec8 結合部位近傍に TSS が少ないことによって生じている可能性が考えられた。しかし、TSS の分布を考慮して統計解析を行った結果、Rec8 結合部位近傍では DSB ホットスポットの頻度が有意に低いことが明らかになった (表 6)。また、Rec8 結合部位近傍 (Rec8 結合部位から ≤ 0.8 kb) にも TSS は存在し、これらの

Rec8 近接 TSS は、Rec8 結合部位から離れた領域に位置する TSS に比べて DSB コールドスポットを形成しやすいことが明らかになった (図 13G)。

Rec8 結合部位近傍において DSB ホットスポットが形成されにくいことから、極端に短いループは DSB コールド領域を形成するのではないかと推測できる。実際に、長さが 2 kb 以下の Rec8 間領域 (Rec8 間領域全 693 領域の内 14 領域) のほとんどが、Rec8 間領域の長さから想定される通り、DSB ホットスポットを持たないことが明らかになった (図 10B、インセットと回帰直線)。さらに、このような長さが 2 kb 以下の Rec8 間領域は、単純に Rec8 間領域の長さから想定される以上に DSB の頻度が小さいことが明らかになった (図 10C、インセットと回帰直線)。出芽酵母のセントロメア周辺は DSB ホットスポットがほとんど存在せず、また、Rec8 結合部位が密集している (表 5)。Rec8 結合部位近傍での DSB 抑制機構が、セントロメア周辺における DSB コールド領域の形成に寄与しているのではないかと考えられる。

7-3. Rec8 結合部位近傍における DSB 抑制機構

Rec8 結合部位近傍において DSB ホットスポット形成を抑制する機構の 1 つとして、軸部近傍では Spo11 の DNA 切断活性が抑制されている可能性が考えられる。本研究において Gal4BD-Spo11 を軸部近傍に強制結合させた結果、DSB の誘導が検出されなかったことから、この可能性は支持される。先行研究においては、軸部近傍の Gal4 結合部位でも Gal4BD-Spo11 依存的に DSB が誘導されることが報告されている (Robine *et al.* 2007)。しかしながら、この結果は 1-3kb の ORF プローブを利用した低解像度の ChIP-chip のデータに基づいているため、本研究で示した Rec8 結合部位から ≤ 0.8 kb という狭い領域での DSB 抑制を議論することはできない。

2 つ目の可能性として、DSB 形成時には Spo11 が軸部から離れる、という機構が考

えられた。しかしながら、ゲノムワイド解析の結果、DSB 形成時にも Spo11 は軸部に相当量結合していることが明らかになった。すなわち、Spo11 の軸部からの局在変化は、軸部近傍でのコールドスポット形成の要因ではないと考えられる。

本研究により、Rec8 結合部位近傍 (Rec8 結合部位から ≤ 0.8 kb の領域) において、H3K4me3 レベルが顕著に低下していることが明らかになった。近年の報告により、COMPASS 複合体の構成因子の 1 つである Spp1 が DSB ホットスポット近傍の H3K4me3 を認識し、軸部に結合する DSB 因子 Mer2 との相互作用を介して、ループに位置する DSB ホットスポットと軸部との連結を促進する、というモデルが提唱されている (Borde & de Massy 2013)。従って、軸部近傍では H3K4me3 が起こらないために、軸とループの連結が抑制され、その結果、DSB ホットスポットが形成されないのではないかと考えられる (図 14)。実際に、Rec8 結合部位近傍で DSB ホットスポットの頻度が低い領域の範囲 (Rec8 結合部位から ≤ 0.8 kb) と H3K4me3 レベルが低い領域の範囲は、良く一致している (図 13H)。

現在のところ、Rec8 結合部位近傍で H3K4me3 レベルを低下させる分子機構については明らかになっていない。しかし、転写がなんらかの形で軸部近傍でのこのようなヒストン修飾パターンを制御しているのではないかと考えられる。コヒーシンが遺伝子の TTS で頻繁に検出されることが既に報告されており、これは、RNA ポリメラーゼ II によってコヒーシンが遺伝子の 3' 末端へと押し出されることが原因ではないかと考えられている (Lengronne *et al.* 2004)。

先行研究により、Jmj ファミリーの H3K4me3 デメチレースである Jhd2 の変異体において、TTS から ≤ 0.3 kb の領域で特異的に H3K4me3 レベルが上昇することが報告されている (Xu *et al.* 2012)。この領域は、H3K4me3 レベルの低下が見られる Rec8 結合部位近傍の領域と良く一致する。従って、Jhd2 などのヒストンデメチレースが Rec8

結合部位に局在し、H3K4me3 の形成を阻害しているか、あるいは、H3K4me3 レベルが低い状態を維持している可能性が考えられる。

その他の可能性としては、Rec8 結合部位が TTS 周辺に多く存在する結果、H3K4me3 レベルが高い TSS の頻度が Rec8 結合部位近傍で相対的に低くなり、結果として Rec8 結合部位近傍の H3K4me3 レベルの低下として観察されたと考えることもできる。しかしながら、Rec8 結合部位近傍に位置する TSS 上流の H3K4me3 レベルが、Rec8 から離れた領域に位置する TSS 上流に比べて低下していることから（図 13F）、この可能性は低いと考えられる。

今後、出芽酵母の Jmj ファミリーヒストンデメチラーゼ全てについて、変異体を用いて Rec8 結合部位近傍での H3K4me3 レベル、及び DSB コールドスポット形成へ影響を検証していきたい。

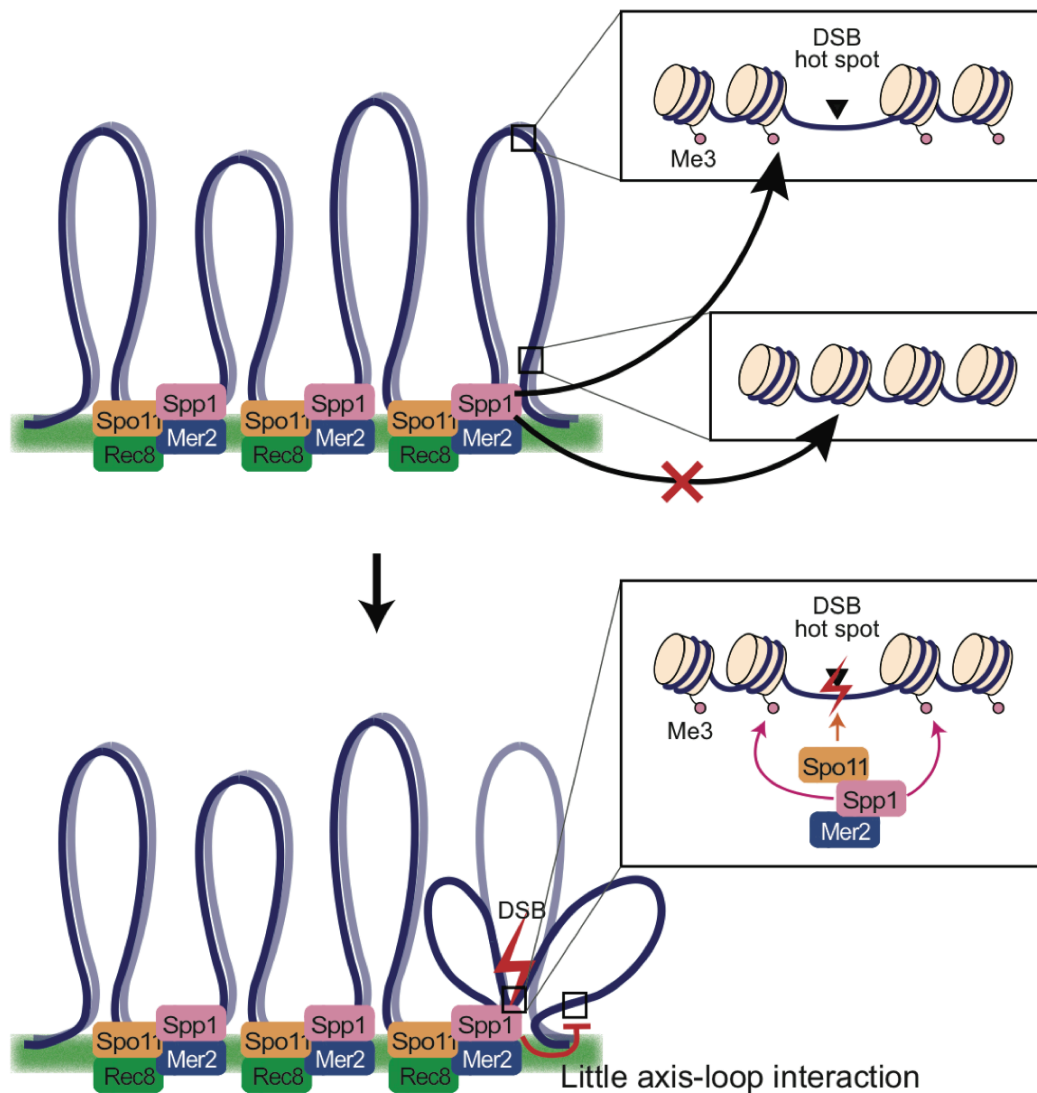


図 14. 軸部近傍における DSB 抑制モデル

減数分裂期特異的なコヒーシンである Rec8 に加え、Spo11、Mer2 を含む複数の DSB 因子が DSB 形成の前後に軸部に結合している。Spp1 は、ループに位置する DSB ホットスポット周辺の H3K4me3 を認識し、Mer2 との相互作用を介して軸-ループ連結複合体の形成を促進する。Rec8 結合部位近傍の染色体領域は H3K4me3 レベルが低い、または H3K4me3 が起こらないため、軸-ループ連結が起こりにくく、そのために、DSB ホットスポットの形成が抑制されている。

7-4. 軸部近傍における DSB コールドスポット形成の意義

軸部近傍で DSB コールドスポットを形成する生物学的意義とは一体なんなのだろうか。

DSB は基本的にはループで形成され、Spo11 によって切断された DNA 末端は、相同配列を持った無傷の二本鎖 DNA へと侵入し、相同組換えによって修復される。DSB 修復の鋳型には、相同染色体あるいは姉妹染色分体が使用されるが、序章でも述べた通り、相同染色体間で行われる組換えによって生じるキアズマは、正常な染色体分配に必須である。そのため、全ゲノムにおいて形成される DSB の内、常に一定数が相同染色体間で修復されるように、厳密に制御されている (Martini *et al.* 2006)。

軸部はコヒーシン結合部位であり、姉妹染色分体間の距離が極めて近いこと、軸部近傍で形成された DSB は相同染色体ではなく姉妹染色分体間で組換え起こす可能性が高い。軸部近傍における DSB コールドスポットの形成は、相同染色体間での組換えの確率の維持に寄与し、それにより正常な染色体分配を保証しているのでないかと考えられる。

8. 総括

本研究ではまず、分裂酵母においても DSB がループ部で生じることを示した。その上で、Mde2 が DSB ホットスポットと軸部の連結（軸-ループ相互作用）という染色体高次構造の変化と DNA 複製チェックポイントを連係させることで DSB を時空間的に制御するリエゾン因子（“liaisonin”）である、という新規の分子メカニズムの提唱に成功した。

また、出芽酵母を用いて Rec8 結合部位（軸部）と DSB ホットスポットの位置関係を詳細に検証した結果、軸部近傍において DSB コールドスポットが形成されることを見出した。軸部近傍において H3K4me3 レベルの低下が明らかになったことから、軸部近傍では軸-ループ連結が形成されにくいために、DSB ホットスポットの形成が抑制されているのではないかと考えられた。

今後、出芽酵母やマウスにおいてリエゾン因子を同定し、普遍的な機能を検証していくと共に、H3K4me3 などのヒストン修飾とリエゾン因子の関係を明らかにしていくことで、染色体高次構造を介した遺伝的組換え開始（DSB）機構の詳細が更に明らかになっていくと考えられる。

9. 謝辞

本研究を行うに当たり、指導教員である太田邦史教授には、研究生活全般に渡り、多大なお力添え、ご指導を頂きました。厚く御礼申し上げます。久郷和人特任助教には、出芽酵母の実験から情報解析に至るまで、基礎から丁寧なご指導を頂きました。三好知一郎博士には、分裂酵母の実験を丁寧にご指導頂きました。また、山田貴富助教には、研究について貴重な助言をして頂きました。心より感謝申し上げます。

大学4年次から今に至るまで、太田研究室に在籍された多くの方々にお力添えを頂きました。この場を借りて御礼申し上げます。

10. 参考文献

- Abe, H. & Shimoda, C. (2000) Autoregulated expression of *Schizosaccharomyces pombe* meiosis-specific transcription factor Mei4 and a genome-wide search for its target genes. *Genetics* **154**, 1497-1508.
- Acquaviva, L., Szekvolgyi, L., Dichtl, B., Dichtl, B.S., de La Roche Saint Andre, C., Nicolas, A. & Geli, V. (2013) The COMPASS subunit Spp1 links histone methylation to initiation of meiotic recombination. *Science* **339**, 215-218.
- Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLeod, M., Warbrick, E. (1993) Experiments with Fission Yeast: A Laboratory Course Manual, *New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- Arora, C., Kee, K., Maleki, S. & Keeney, S. (2004) Antiviral protein Ski8 is a direct partner of Spo11 in meiotic DNA break formation, independent of its cytoplasmic role in RNA metabolism. *Molecular cell* **13**, 549-559.
- Baudat, F., Buard, J., Grey, C., Fledel-Alon, A., Ober, C., Przeworski, M., Coop, G. & de Massy, B. (2010) PRDM9 is a major determinant of meiotic recombination hotspots in humans and mice. *Science* **327**, 836-840.
- Baudat, F. & Nicolas, A. (1997) Clustering of meiotic double-strand breaks on yeast chromosome III. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 5213-5218.
- Blat, Y., Protacio, R.U., Hunter, N. & Kleckner, N. (2002) Physical and functional interactions among basic chromosome organizational features govern early steps of meiotic chiasma formation. *Cell* **111**, 791-802.
- Blitzblau, H.G. & Hochwagen, A. (2013) ATR/Mec1 prevents lethal meiotic recombination initiation on partially replicated chromosomes in budding yeast. *eLife* **2**, e00844.
- Borde, V. & de Massy, B. (2013) Programmed induction of DNA double strand breaks during meiosis: setting up communication between DNA and the chromosome structure. *Current opinion in genetics & development* **23**, 147-155.

- Borde, V., Goldman, A.S. & Lichten, M. (2000) Direct coupling between meiotic DNA replication and recombination initiation. *Science* **290**, 806-809.
- Borde, V., Robine, N., Lin, W., Bonfils, S., Geli, V. & Nicolas, A. (2009) Histone H3 lysine 4 trimethylation marks meiotic recombination initiation sites. *The EMBO journal* **28**, 99-111.
- Borde, V., Wu, T.C. & Lichten, M. (1999) Use of a recombination reporter insert to define meiotic recombination domains on chromosome III of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **19**, 4832-4842.
- Brick, K., Smagulova, F., Khil, P., Camerini-Otero, R.D. & Petukhova, G.V. (2012) Genetic recombination is directed away from functional genomic elements in mice. *Nature* **485**, 642-645.
- Cervantes, M.D., Farah, J.A. & Smith, G.R. (2000) Meiotic DNA breaks associated with recombination in *S. pombe*. *Molecular cell* **5**, 883-888.
- De Antoni, A. & Gallwitz, D. (2000) A novel multi-purpose cassette for repeated integrative epitope tagging of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **246**, 179-185.
- de Castro, E., Soriano, I., Marin, L., Serrano, R., Quintales, L. & Antequera, F. (2012) Nucleosomal organization of replication origins and meiotic recombination hotspots in fission yeast. *The EMBO journal* **31**, 124-137.
- De Veaux, L.C., Hoagland, N.A. & Smith, G.R. (1992) Seventeen complementation groups of mutations decreasing meiotic recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **130**, 251-262.
- Ellermeier, C. & Smith, G.R. (2005) Cohesins are required for meiotic DNA breakage and recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 10952-10957.
- Evans, D.H., Li, Y.F., Fox, M.E. & Smith, G.R. (1997) A WD repeat protein, Rec14, essential for meiotic recombination in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **146**, 1253-1264.
- Forsburg, S.L. & Sherman, D.A. (1997) General purpose tagging vectors for fission yeast. *Gene* **191**, 191-195.

- Fukuda, T., Kugou, K., Sasanuma, H., Shibata, T. & Ohta, K. (2008) Targeted induction of meiotic double-strand breaks reveals chromosomal domain-dependent regulation of Spo11 and interactions among potential sites of meiotic recombination. *Nucleic acids research* **36**, 984-997.
- Glynn, E.F., Megee, P.C., Yu, H.G., Mistrot, C., Unal, E., Koshland, D.E., DeRisi, J.L. & Gerton, J.L. (2004) Genome-wide mapping of the cohesin complex in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS biology* **2**, E259.
- Gregan, J., Rabitsch, P.K., Sakem, B., Csutak, O., Latypov, V., Lehmann, E., Kohli, J. & Nasmyth, K. (2005) Novel genes required for meiotic chromosome segregation are identified by a high-throughput knockout screen in fission yeast. *Current biology : CB* **15**, 1663-1669.
- Hansen, L., Kim, N.K., Marino-Ramirez, L. & Landsman, D. (2011) Analysis of biological features associated with meiotic recombination hot and cold spots in *Saccharomyces cerevisiae*. *PloS one* **6**, e29711.
- Henderson, K.A., Kee, K., Maleki, S., Santini, P.A. & Keeney, S. (2006) Cyclin-dependent kinase directly regulates initiation of meiotic recombination. *Cell* **125**, 1321-1332.
- Hirota, K., Steiner, W.W., Shibata, T. & Ohta, K. (2007) Multiple modes of chromatin configuration at natural meiotic recombination hot spots in fission yeast. *Eukaryotic cell* **6**, 2072-2080.
- Hochwagen, A., Tham, W.H., Brar, G.A. & Amon, A. (2005) The FK506 binding protein Fpr3 counteracts protein phosphatase 1 to maintain meiotic recombination checkpoint activity. *Cell* **122**, 861-873.
- Hollingsworth, N.M. & Ponte, L. (1997) Genetic interactions between *HOP1*, *RED1* and *MEK1* suggest that *MEK1* regulates assembly of axial element components during meiosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **147**, 33-42.
- Hyppa, R.W., Cromie, G.A. & Smith, G.R. (2008) Indistinguishable landscapes of meiotic DNA breaks in *rad50+* and *rad50S* strains of fission yeast revealed by a novel *rad50+* recombination intermediate. *PLoS genetics* **4**, e1000267.

- Iino, Y. & Yamamoto, M. (1985) Negative control for the initiation of meiosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 2447-2451.
- Ishiguro, K., Kim, J., Fujiyama-Nakamura, S., Kato, S. & Watanabe, Y. (2011) A new meiosis-specific cohesin complex implicated in the cohesin code for homologous pairing. *EMBO reports* **12**, 267-275.
- Ishizaka, A., Mizutani, T., Kobayashi, K., Tando, T., Sakurai, K., Fujiwara, T. & Iba, H. (2012) Double plant homeodomain (PHD) finger proteins DPF3a and -3b are required as transcriptional co-activators in SWI/SNF complex-dependent activation of NF-kappaB RelA/p50 heterodimer. *The Journal of biological chemistry* **287**, 11924-11933.
- Ji, H., Jiang, H., Ma, W. & Wong, W.H. (2011) Using CisGenome to analyze ChIP-chip and ChIP-seq data. *Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D. Baxevanis ... [et al.]* **Chapter 2**, Unit2 13.
- Jiang, C. & Pugh, B.F. (2009) A compiled and systematic reference map of nucleosome positions across the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Genome biology* **10**, R109.
- Jiao, K., Salem, L. & Malone, R. (2003) Support for a meiotic recombination initiation complex: interactions among Rec102p, Rec104p, and Spo11p. *Molecular and cellular biology* **23**, 5928-5938.
- Katou, Y., Kaneshiro, K., Aburatani, H. & Shirahige, K. (2006) Genomic approach for the understanding of dynamic aspect of chromosome behavior. *Methods in enzymology* **409**, 389-410.
- Katou, Y., Kanoh, Y., Bando, M., Noguchi, H., Tanaka, H., Ashikari, T., Sugimoto, K. & Shirahige, K. (2003) S-phase checkpoint proteins Tof1 and Mrc1 form a stable replication-pausing complex. *Nature* **424**, 1078-1083.
- Kauppi, L., Barchi, M., Baudat, F., Romanienko, P.J., Keeney, S. & Jasin, M. (2011) Distinct properties of the XY pseudoautosomal region crucial for male meiosis. *Science* **331**, 916-920.
- Kee, K., Protacio, R.U., Arora, C. & Keeney, S. (2004) Spatial organization and dynamics of the association of Rec102 and Rec104 with meiotic chromosomes. *The EMBO journal* **23**, 1815-1824.

Keeney, S. (2001) Mechanism and control of meiotic recombination initiation. *Current topics in developmental biology* **52**, 1-53.

Keeney, S. (2008) Spo11 and the Formation of DNA Double-Strand Breaks in Meiosis. *Genome dynamics and stability* **2**, 81-123.

Keeney, S., Giroux, C.N. & Kleckner, N. (1997) Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* **88**, 375-384.

Kleckner, N. (2006) Chiasma formation: chromatin/axis interplay and the role(s) of the synaptonemal complex. *Chromosoma* **115**, 175-194.

Kleckner, N., Storlazzi, A. & Zickler, D. (2003) Coordinate variation in meiotic pachytene SC length and total crossover/chiasma frequency under conditions of constant DNA length. *Trends in genetics : TIG* **19**, 623-628.

Klein, F., Mahr, P., Galova, M., Buonomo, S.B., Michaelis, C., Nairz, K. & Nasmyth, K. (1999) A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. *Cell* **98**, 91-103.

Kugou, K., Fukuda, T., Yamada, S., Ito, M., Sasanuma, H., Mori, S., Katou, Y., Itoh, T., Matsumoto, K., Shibata, T., Shirahige, K. & Ohta, K. (2009) Rec8 guides canonical Spo11 distribution along yeast meiotic chromosomes. *Molecular biology of the cell* **20**, 3064-3076.

Kumar, R., Bourbon, H.M. & de Massy, B. (2010) Functional conservation of Mei4 for meiotic DNA double-strand break formation from yeasts to mice. *Genes & development* **24**, 1266-1280.

Langmead, B., Trapnell, C., Pop, M. & Salzberg, S.L. (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome biology* **10**, R25.

Lassmann, T., Hayashizaki, Y. & Daub, C.O. (2009) TagDust--a program to eliminate artifacts from next generation sequencing data. *Bioinformatics* **25**, 2839-2840.

Lee, J. & Hirano, T. (2011) RAD21L, a novel cohesin subunit implicated in linking homologous chromosomes in mammalian meiosis. *The Journal of cell biology* **192**, 263-276.

- Lengronne, A., Katou, Y., Mori, S., Yokobayashi, S., Kelly, G.P., Itoh, T., Watanabe, Y., Shirahige, K. & Uhlmann, F. (2004) Cohesin relocation from sites of chromosomal loading to places of convergent transcription. *Nature* **430**, 573-578.
- Li, J., Hooker, G.W. & Roeder, G.S. (2006) *Saccharomyces cerevisiae* Mer2, Mei4 and Rec114 form a complex required for meiotic double-strand break formation. *Genetics* **173**, 1969-1981.
- Lichten, M. (2008) Genomics: Thoroughly modern meiosis. *Nature* **454**, 421-422.
- Lichten, M. & de Massy, B. (2011) The impressionistic landscape of meiotic recombination. *Cell* **147**, 267-270.
- Lin, Y. & Smith, G.R. (1994) Transient, meiosis-induced expression of the *rec6* and *rec12* genes of *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **136**, 769-779.
- Lin, Y. & Smith, G.R. (1995a) An intron-containing meiosis-induced recombination gene, *rec15*, of *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular microbiology* **17**, 439-448.
- Lin, Y. & Smith, G.R. (1995b) Molecular cloning of the meiosis-induced *rec10* gene of *Schizosaccharomyces pombe*. *Current genetics* **27**, 440-446.
- Llano, E., Herran, Y., Garcia-Tunon, I., Gutierrez-Caballero, C., de Alava, E., Barbero, J.L., Schimenti, J., de Rooij, D.G., Sanchez-Martin, M. & Pendas, A.M. (2012) Meiotic cohesin complexes are essential for the formation of the axial element in mice. *The Journal of cell biology* **197**, 877-885.
- Lorenz, A., Estreicher, A., Kohli, J. & Loidl, J. (2006) Meiotic recombination proteins localize to linear elements in *Schizosaccharomyces pombe*. *Chromosoma* **115**, 330-340.
- Lorenz, A., Wells, J.L., Pryce, D.W., Novatchkova, M., Eisenhaber, F., McFarlane, R.J. & Loidl, J. (2004) *S. pombe* meiotic linear elements contain proteins related to synaptonemal complex components. *Journal of cell science* **117**, 3343-3351.
- Maleki, S., Neale, M.J., Arora, C., Henderson, K.A. & Keeney, S. (2007) Interactions between Mei4, Rec114, and other proteins required for meiotic DNA double-strand break formation in

Saccharomyces cerevisiae. *Chromosoma* **116**, 471-486.

Mao-Draayer, Y., Galbraith, A.M., Pittman, D.L., Cool, M. & Malone, R.E. (1996) Analysis of meiotic recombination pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **144**, 71-86.

Martin-Castellanos, C., Blanco, M., Rozalen, A.E., Perez-Hidalgo, L., Garcia, A.I., Conde, F., Mata, J., Ellermeier, C., Davis, L., San-Segundo, P., Smith, G.R. & Moreno, S. (2005) A large-scale screen in *S. pombe* identifies seven novel genes required for critical meiotic events. *Current biology : CB* **15**, 2056-2062.

Martini, E., Diaz, R.L., Hunter, N. & Keeney, S. (2006) Crossover homeostasis in yeast meiosis. *Cell* **126**, 285-295.

Molnar, M., Parisi, S., Kakiyama, Y., Nojima, H., Yamamoto, A., Hiraoka, Y., Bozsik, A., Sipiczki, M. & Kohli, J. (2001) Characterization of *rec7*, an early meiotic recombination gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **157**, 519-532.

Murakami, H. & Keeney, S. (2008) Regulating the formation of DNA double-strand breaks in meiosis. *Genes & development* **22**, 286-292.

Murakami, H. & Nurse, P. (2001) Regulation of premeiotic S phase and recombination-related double-strand DNA breaks during meiosis in fission yeast. *Nature genetics* **28**, 290-293.

Myers, S., Bowden, R., Tumian, A., Bontrop, R.E., Freeman, C., MacFie, T.S., McVean, G. & Donnelly, P. (2010) Drive against hotspot motifs in primates implicates the *PRDM9* gene in meiotic recombination. *Science* **327**, 876-879.

Nakato, R., Itoh, T. & Shirahige, K. (2013) DROMPA: easy-to-handle peak calling and visualization software for the computational analysis and validation of ChIP-seq data. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **18**, 589-601.

Neale, M.J., Pan, J. & Keeney, S. (2005) Endonucleolytic processing of covalent protein-linked DNA double-strand breaks. *Nature* **436**, 1053-1057.

Novak, I., Wang, H., Revenkova, E., Jessberger, R., Scherthan, H. & Hoog, C. (2008) Cohesin

Smc1beta determines meiotic chromatin axis loop organization. *The Journal of cell biology* **180**, 83-90.

Ogino, K., Hirota, K., Matsumoto, S., Takeda, T., Ohta, K., Arai, K. & Masai, H. (2006) Hsk1 kinase is required for induction of meiotic dsDNA breaks without involving checkpoint kinases in fission yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 8131-8136.

Ogino, K. & Masai, H. (2006) Rad3-Cds1 mediates coupling of initiation of meiotic recombination with DNA replication. Mei4-dependent transcription as a potential target of meiotic checkpoint. *The Journal of biological chemistry* **281**, 1338-1344.

Ohta, K., Nicolas, A., Furuse, M., Nabetani, A., Ogawa, H. & Shibata, T. (1998) Mutations in the *MRE11*, *RAD50*, *XRS2*, and *MRE2* genes alter chromatin configuration at meiotic DNA double-stranded break sites in premeiotic and meiotic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 646-651.

Ohta, K., Shibata, T. & Nicolas, A. (1994) Changes in chromatin structure at recombination initiation sites during yeast meiosis. *The EMBO journal* **13**, 5754-5763.

Pan, J., Sasaki, M., Kniewel, R., Murakami, H., Blitzblau, H.G., Tischfield, S.E., Zhu, X., Neale, M.J., Jasin, M., Socci, N.D., Hochwagen, A. & Keeney, S. (2011) A hierarchical combination of factors shapes the genome-wide topography of yeast meiotic recombination initiation. *Cell* **144**, 719-731.

Panizza, S., Mendoza, M.A., Berlinger, M., Huang, L., Nicolas, A., Shirahige, K. & Klein, F. (2011) Spo11-accessory proteins link double-strand break sites to the chromosome axis in early meiotic recombination. *Cell* **146**, 372-383.

Parvanov, E.D., Petkov, P.M. & Paigen, K. (2010) *Prdm9* controls activation of mammalian recombination hotspots. *Science* **327**, 835.

Pecina, A., Smith, K.N., Mezard, C., Murakami, H., Ohta, K. & Nicolas, A. (2002) Targeted stimulation of meiotic recombination. *Cell* **111**, 173-184.

- Ponticelli, A.S. & Smith, G.R. (1989) Meiotic recombination-deficient mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **123**, 45-54.
- Robine, N., Uematsu, N., Amiot, F., Gidrol, X., Barillot, E., Nicolas, A. & Borde, V. (2007) Genome-wide redistribution of meiotic double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology* **27**, 1868-1880.
- Sasanuma, H., Hirota, K., Fukuda, T., Kakusho, N., Kugou, K., Kawasaki, Y., Shibata, T., Masai, H. & Ohta, K. (2008) Cdc7-dependent phosphorylation of Mer2 facilitates initiation of yeast meiotic recombination. *Genes & development* **22**, 398-410.
- Sollier, J., Lin, W., Soustelle, C., Suhre, K., Nicolas, A., Geli, V. & de La Roche Saint-Andre, C. (2004) Set1 is required for meiotic S-phase onset, double-strand break formation and middle gene expression. *The EMBO journal* **23**, 1957-1967.
- Sommermeier, V., Beneut, C., Chaplais, E., Serrentino, M.E. & Borde, V. (2013) Spp1, a member of the Set1 Complex, promotes meiotic DSB formation in promoters by tethering histone H3K4 methylation sites to chromosome axes. *Molecular cell* **49**, 43-54.
- Steiner, S., Kohli, J. & Ludin, K. (2010) Functional interactions among members of the meiotic initiation complex in fission yeast. *Current genetics* **56**, 237-249.
- Tischfield, S.E. & Keeney, S. (2012) Scale matters: the spatial correlation of yeast meiotic DNA breaks with histone H3 trimethylation is driven largely by independent colocalization at promoters. *Cell cycle* **11**, 1496-1503.
- Tonami, Y., Murakami, H., Shirahige, K. & Nakanishi, M. (2005) A checkpoint control linking meiotic S phase and recombination initiation in fission yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 5797-5801.
- Tsukahara, T., Tanno, Y. & Watanabe, Y. (2010) Phosphorylation of the CPC by Cdk1 promotes chromosome bi-orientation. *Nature* **467**, 719-723.
- Wan, L., Niu, H., Fitcher, B., Zhang, C., Shokat, K.M., Boulton, S.J. & Hollingsworth, N.M. (2008) Cdc28-Clb5 (CDK-S) and Cdc7-Dbf4 (DDK) collaborate to initiate meiotic recombination in

yeast. *Genes & development* **22**, 386-397.

Wu, T.C. & Lichten, M. (1994) Meiosis-induced double-strand break sites determined by yeast chromatin structure. *Science* **263**, 515-518.

Xu, M., Soloveychik, M., Ranger, M., Schertzberg, M., Shah, Z., Raisner, R., Venkatasubrahmanyam, S., Tsui, K., Gebbia, M., Hughes, T., van Bakel, H., Nislow, C., Madhani, H.D. & Meneghini, M.D. (2012) Timing of transcriptional quiescence during gametogenesis is controlled by global histone H3K4 demethylation. *Developmental cell* **23**, 1059-1071.

Yamada, S., Ohta, K. & Yamada, T. (2013) Acetylated Histone H3K9 is associated with meiotic recombination hotspots, and plays a role in recombination redundantly with other factors including the H3K4 methylase Set1 in fission yeast. *Nucleic acids research* **41**, 3504-3517.

Yamada, T., Mizuno, K., Hirota, K., Kon, N., Wahls, W.P., Hartsuiker, E., Murofushi, H., Shibata, T. & Ohta, K. (2004) Roles of histone acetylation and chromatin remodeling factor in a meiotic recombination hotspot. *The EMBO journal* **23**, 1792-1803.

Young, J.A., Hyppa, R.W. & Smith, G.R. (2004) Conserved and nonconserved proteins for meiotic DNA breakage and repair in yeasts. *Genetics* **167**, 593-605.

Zhang, L., Ma, H. & Pugh, B.F. (2011) Stable and dynamic nucleosome states during a meiotic developmental process. *Genome research* **21**, 875-884.

公表に際し、以下を付記します：

この博士論文（平成 26 年 3 月 24 日学位授与）の第 2 章は、*Genes to Cells* 誌掲載論文（Volume 19, Issue 5, pages 359-373）を元にしたものです。

最終版は下記 URL をご参照ください。

<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/gtc.12138/abstract>

（ The definitive version is available at www3.interscience.wiley.com. ）

平成 26 年 7 月 7 日

伊藤将