

染色体動態制御研究ユニット

Genetic Dynamics Research Unit

ユニットリーダー 太田 邦史
OHTA, Kunihiro

染色体は DNA とヒストン等のタンパク質成分からなるオルガネラであり、遺伝情報の発現・維持・分配・再編成において決定的な役割を担う。染色体の動態制御の仕組みを明らかにすることで、染色体動態と密接に関連する細胞がん化・老化機構の理解、また生物多様化の原動力である生殖細胞における遺伝的多様性獲得の仕組みの解明、新たな染色体加工技術の開発などが期待される。そこで、当研究ユニットでは染色体を構成し、その機能制御に重要な役割を果たすクロマチン構造に注目し、研究を進めている。特に、クロマチン構造が染色体再編成や遺伝的組換えなどの染色体の動的側面にどのように関わっているか、出芽・分裂酵母や、鳥類 DT40 細胞・ヒト培養細胞を用いて研究を行っている。現時点では、減数分裂期に活性化される相同染色体組換えがどのように制御されているかについて、数種の鍵を握るタンパク質に焦点を絞って分子生物学的な解析を行っている。将来的には、染色体動態を制御するクロマチン再編成やクロマチン関連因子の分子機構を明らかにし、その原理を利用して染色体動態を人為的に制御する方法を開発することを目指している。

1. 組換え開始複合体による組換え制御の分子機構（太田, 古瀬^{*1}, 村上^{*2}, 大崎^{*3}）

酵母からヒトに至る真核生物の減数分裂期染色体には、染色体組換えが頻発する特異箇所が存在し、ホットスポットと呼ばれている。この箇所には DNA 切断酵素である Spo11 が何らかの機構によって特異的に呼び込まれ、減数分裂期特異的に DNA 二本鎖切断が生じる。このときに活性化される組換えは、真核生物の通常の細胞周期では抑制されている相同組換え（類似した DNA 配列間での遺伝情報交換現象）と呼ばれる種類のものである。

当研究ユニットでは何故このホットスポット部分で相同組換えが特異的に誘発されるのかという点に関心を持ち、ホットスポット領域で DNA 切断が特異的に導入される仕組みを出芽酵母や分裂酵母を用いて調べている。組換えホットスポットがヌクレオソームのない「開いた」クロマチン構造を取っていること、またその領域に組換え開始に関わる Mre11-Rad50-Xrs2 タンパク質三者複合体が接近し、二本鎖切断を導入する準備を行う可能性を示唆してきた。また、Mre11 に結合し、組換え開始に協同的に関与する因子として Rec102 と Sae2 の 2 つのタンパク質を同定した。Rec102 は Spo11 と結合することが海外のグループによって予備的ながら明らかにされており、この因子が Mre11 と結合することによって、ホットスポット箇所に Spo11 が特異的に導入され、DNA 二本鎖切断が生じる可能性が示された。Sae2 は二本鎖切断が生じた後、その DNA 末端に結合している Spo11 を取り除く反応に必要なタンパク質である。その反

応自身は Mre11 が有する DNA 分解酵素活性によるものであるが、Sae2 が Mre11 に結合することによって二本鎖切断部位に固着した Spo11 の除去を補助しているものと推測される。

2. クロマチン構造開示による分裂酵母染色体組換えの活性化の仕組み（太田, 水野^{*1}, 長谷見^{*2}, 山田^{*4}, 古瀬^{*1}, 村上^{*2}）

一塩基置換変異である分裂酵母の *ade6M26* アリルは、cAMP 感応配列（CRE）に類似した 7 塩基配列を変異箇所周辺に形成し、その周辺で相同組換えが減数分裂期特異的に活性化される。この配列には CREB/ATF 型転写因子 Atf1-Pcr1 が特異的に結合するが、この因子は減数分裂期に周辺のクロマチン再編成を誘導し、結果として組換え酵素の接近が容易になって、組換えが活性化されると考えられる。

今回この配列にランダム突然変異を施し、組換え活性化に必要な共通配列を検索し、さらにそれら配列の組換えやクロマチン構造への役割を検討した。（米国 G. Smith 博士との共同研究）その結果、新たに数種の配列が同様の組換え活性化能を有することが判明した。それらの配列を比較すると、CRE のコア配列が共通要素として認められた。また、Atf1-Pcr1 がこれらの配列に特異的に結合することが示された。さらに、新たに見いだされた配列が、*M26* 配列同様のクロマチン再編成を誘起することを明らかにした。また、染色体に存在する天然のヘプタマー配列でも、*ade6M26* と同様なクロマチン再編成が起きることを確認した。以上の結果から、染色体上に散在する多数の CRE 類似配列が、減数分裂期のクロマチン再編成部位として機能し、ある場合には組換えホットスポットとしても機能する可能性が示唆された。

3. 染色体組換えの活性化と DNA 複製反応の関係（太田, 村上^{*2}, 大崎^{*3}）

出芽酵母第 3 染色体の複製開始点の 1 つである *ARS310* は、break-induced replication（BIR）という有糸分裂期染色体再編成や、減数分裂期組換えの制御への関与が示唆されている。BIR は、HO エンドヌクレアーゼによる染色体切断が契機となって引き起こされる組換え修復型 DNA 合成であり、*RAD51* 非存在下の条件で顕著に観察される。出芽酵母第 III 染色体上の BIR の起点は *ARS310* 付近の領域になっている。*ARS310* を欠く場合、BIR は全く観察されなくなるが、*ARS310* の複製開始因子結合配列を改変しても BIR は正常に起きる。一方、*ARS310* 領域に含まれる 200 塩基対の配列のみで、BIR が誘起され得る。我々は、*ARS310* に関する種々の変異株を用いてその周辺のクロマ

チン構造と BIR の相関を調べた。(米国 Haber 博士と共同研究) その結果, 組換え活性化に必要な 200 塩基対の配列以外の配列が, 周辺のクロマチン構造の規定に関与していることを明らかにした。一方, 減数分裂期の組換え制御においては, *ARS310* を除いてもほとんど影響がないことを見いだした。

減数分裂期の組換え開始は, 必ず減数分裂期 DNA 合成後に起きる。そこで, 減数分裂期 DNA 合成に特異的欠損を示す変異体 (*clb5.6* 二重変異株など) を用いて, DNA 合成と組換え開始反応の相関を調べた。(フランス Nicolas 博士, オーストリア Klein 教授, 米国 Lichten 博士との共同研究) その結果, 減数分裂期 DNA 合成に依存して, ホットスポット部位におけるクロマチン構造転換や DNA 二本鎖切断・シナプトネマル構造の形成が誘導されることが明らかになった。すなわち, 減数分裂期の DNA 合成と組換えが共役していることが示された。

4. 免疫グロブリン遺伝子座の染色体再編成の機構 (太田, 瀬尾^{*4})

ニワトリ培養細胞株 DT40 では, 免疫グロブリン遺伝子座で常時相同組換えを用いた遺伝子変換が起きている。興味深いことに, この擬可変領域から免疫グロブリン遺伝子座に対する遺伝子変換は, 他の高等真核生物の免疫グロブリン遺伝子座で見られる遺伝子再編成同様に, 対立遺伝子排除という現象を伴っている。これは, 遺伝子変換の受容が, 転写が活性な一方の相同染色体に限定されるという現象である。この問題は免疫遺伝学上の 1 つの大きな課題となっている。我々は DT40 細胞のクロマチン構造の解析を行い, 組換え活性型の対立遺伝子ではクロマチンが「開いた」状態になっているのに対し, 組換えを受け入れない側の染色体では, クロマチン構造が密になっていることを明らかにした。この結果は, 対立遺伝子排除がクロマチン構造の差異によってもたらされることを強く示唆する。

^{*1} 基礎科学特別研究員, ^{*2} 研修生 (埼玉大学院), ^{*3} 研修生, ^{*4} ジュニア・リサーチ・アソシエイト

誌 上 発 表 Publications

(原著論文) *印は査読制度がある論文誌

- Smith K., Penkner A., Ohta K., Klein F., and Nicolas A.: “B-type cyclins *CLB5* and *CLB6* control the initiation of recombination and synaptonemal complex formation in yeast meiosis”, *Curr. Biol.* **11**, 88–97 (2001). *
- Fox M. E., Yamada T., Ohta K., and Smith G. R.: “A family of cAMP-response-element-related DNA sequences with meiotic recombination hotspot activity in *Schizosaccharomyces pombe*”, *Genetics* **156**, 59–68 (2000). *
- Miyajima A., Seki M., Onoda F., Shiratori M., Odagiri N., Ohta K., Kikuchi Y., Ohno Y., and Enomoto T.: “Sgs1 helicase activity is required for mitotic but apparently not for meiotic functions”, *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6399–6409 (2000). *

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

- Mizuno K., Wahls W. P., Hasemi T., Ubukata T., Watanabe Y., Iino Y., Yamamoto M., Fox M. E., Smith G. R., Kohli J., Shibata T., and Ohta K.: “Signaling for meiosis induces chromatin remodeling to activate homologous recombination”, Gordon Research Conf. on Molecular Genetics, New London, USA, July (2000).
- Murakami H., Theis J. F., Newlon C., Malkova A., Haber J. E., Shibata T., and Ohta K.: “Chromatin structure defined by *ARS310* on yeast chromosome”, 1st Salk Institute Conf. on Eukaryotic DNA Replication, San Diego, USA, Sept. (2000).
- Seo H., Okuhara K., Yamada T., Kurumizaka H., Ohta K., Shibata T., Akiyama T., and Murofushi H.: “Involvement of DNA unwinding factor (DUF)/FACT in the modulation of chromatin structure”, 1st Salk Institute Conf. on Eukaryotic DNA Replication, San Diego, USA, Sept. (2000).
- Hasemi T. and Ohta K.: “Chromatin remodeling controlled by stress activated MAPkinase and cAMP-dependent kinase pathways”, 4th UK-Japan Cell Cycle Workshop on Regulation of Cell Proliferation, Cambridge, UK, Sept. (2000).
- Ohta K.: “Mre11 is a well-conserved protein involved in both mitotic and meiotic recombination”, 4th UK-Japan Cell Cycle Workshop on Regulation of Cell Proliferation, Cambridge, UK, Sept. (2000).
- Ohta K.: “Collaboration between recombination and transcription in yeast meiosis”, Int. Workshop on Dynamics and Algorithms of Chromosome Function, (The Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas, The Ministry of Education Science, Sports and Culture of Japan), Hiroshima, Nov. (2000).
- Mizuno K., Hasemi T., Ubukata T., Wahls W. P., Watanabe Y., Iino Y., Yamamoto M., Fox M. E., Smith G. R., Lehmann E., Kohli J., Shibata T., and Ohta K.: “Early meiotic signal controls chromatin remodeling at recombination hot spot in fission yeast”, Int. Workshop on Dynamics and Algorithms of Chromosome Function, (The Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas, The Ministry of Education Science, Sports and Culture of Japan), Hiroshima, Nov. (2000).
- Murakami H., Theis J. F., Newlon C., Malkova A., Haber J. E., Shibata T., and Ohta K.: “A replication-dependent repair may require accessible chromatin on ARS”, Int. Workshop on Dynamics and Algorithms of Chromosome Function, (The Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas, The Ministry of Education Science, Sports and Culture of Japan), Hiroshima, Nov. (2000).
- Ohta K., Murakami H., Malkova A., Haber J. E., Theis J. F., Newlon C., Smith K., Nicolas A., Borde V., Lichten M., and Shibata T.: “Replication and recombination: A chromatin aspect”, Natl. Acad. of Science Colloq. on Links Between Recombination and Replication: Vital

Roles of Recombination, Irvine, USA, Nov. (2000).

Ohta K., Furuse M., Ohsaki S., Murakami-Murofushi K., and Shibata T.: "Mre11 and recombination repair in yeast cells", Int. Workshop on Radiation Damage 2001: Repair, Mutagenesis and Visualization, Tokyo, Mar. (2001).

(国内会議)

太田邦史, 水野健一, 古瀬宗則, 山田貴富, 長谷見倫子, 瀬尾秀宗, 生方寿治, 村上創, 大崎志真, 柴田武彦: "染色体相同組換えの制御システム", 第 53 回日本細胞生物学会大会, 横浜, 10 月 (2000).

太田邦史, 大崎志真, 古瀬宗則, 室伏きみ子, 柴田武彦: "組換え開始因子 Mre11 の過剰発現によるドミナントネガティブ効果", 第 53 回日本細胞生物学会大会, 福岡, 10 月 (2000).

長谷見倫子, 水野健一, 飯野雄一, 渡辺嘉典, 山本正幸, Fox M. E., Smith G. R., Wahls W. P., 太田邦史, 柴田武彦: "M26 組換えホットスポットにおける 2 種のクロマチン再編成", 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2000).

水野健一, 長谷見倫子, 生方寿治, 渡辺嘉典, 飯野雄一, 山本正幸, Kohli J., 柴田武彦, 太田邦史: "減数分裂期のシグナルによる M26 組換え頻発部位のクロマチン再編成制御", 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2000).

太田邦史, Lichten M., 柴田武彦: "減数分裂期相同組換えによるゲノム維持・防御の仕組み", 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2000).

古瀬宗則, 柴田武彦, 太田邦史: "減数分裂時の二重鎖切断関連因子と Mre11 の関連性", 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2000).

瀬尾秀宗, 武田俊一, 室伏擴, 柴田武彦, 太田邦史: "抗体軽鎖遺伝子のアルル間活性調節におけるクロマチン構造の機能", 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2000).

村上創, Theis J. E., Schaefer C., Newlon C., Malkova A., Haber J. E., 柴田武彦, 太田邦史: "出芽酵母 ARS310 複製開始点のクロマチン構造と減数分裂期組換え", 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2000).

太田邦史, Smith K., Nicolas A., Borde V., Lichten M., 柴田武彦: "出芽酵母における組換え開始反応と減数分裂期 DNA 合成の関係", 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2000).

大崎志真, 古瀬宗則, 室伏きみ子, 柴田武彦, 太田邦史: "出芽酵母組換え開始タンパク質 Mre11 の過剰発現によるテロメア長の変化", 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2000).

山田貴富, 水野健一, 室伏擴, 柴田武彦, 太田邦史: "分裂酵母の減数分裂期組換えに伴うクロマチン再編成とヒストンアセチル化", 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2000).

太田邦史, Smith K., Nicolas A., Borde V., Lichten M., 柴田武彦: "出芽酵母における組換え開始反応と減数分裂期 DNA 合成の関係", 第 23 回日本分子生物学会年会サ

テライトシンポジウム, 神戸, 12 月 (2000).

水野健一, Wahls W. P., 長谷見倫子, 生方寿治, 渡辺嘉典, 飯野雄一, 山本正幸, Fox M. E., Smith G. R., Kohli J., 柴田武彦, 太田邦史: "分裂酵母 M26 組換え頻発部位におけるクロマチン再編成の制御", 第 23 回日本分子生物学会年会サテライトシンポジウム, 神戸, 12 月 (2000).

太田邦史, 大崎志真, 白髭克彦, 吉川寛, 柴田武彦: "Mre11 の減数分裂期転写制御における機能: DNA チップによる解析", 第 18 回染色体ワークショップ, 葉山, 1 月 (2001).

水野健一, 長谷見倫子, 生方寿治, Wahls W. P., 渡辺嘉典, 飯野雄一, 山本正幸, Fox M. E., Smith G., Kohli J., 柴田武彦, 太田邦史: "減数分裂シグナル伝達による組換え頻発部位のクロマチン制御", 第 18 回染色体ワークショップ, 葉山, 1 月 (2001).

村上創, Theis J. F., Schaefer C., Newlon C., Malkova A., Haber J. E., 柴田武彦, 太田邦史: "出芽酵母 ARS310 複製開始点改変によるクロマチン構造と減数分裂組織組換えへの影響", 第 18 回染色体ワークショップ, 葉山, 1 月 (2001).

Research Subjects and Members of Genetic Dynamics Research Unit

1. Molecular Mechanism of Homologous Recombination Activation
2. Chromatin Remodeling and Recombination Regulation in Fission Yeast
3. Relationship between DNA Replication and Recombination
4. Mechanism of Allelic Exclusion of Gene Conversion at Chicken DT40 Immunoglobulin Locus

Head

Dr. Kunihiro OHTA

Members

Dr. Munenori FURUSE*

Dr. Ken-ichi MIZUNO*

* Special Postdoctoral Researcher

Visiting Members

Mr. Takatomi YAMADA (Fac. Sci., Univ. Tokyo)

Mr. Hidetada SEO (Fac. Sci., Univ. Tokyo)

Trainees

Mr. Hajime MURAKAMI (Fac. Sci., Saitama Univ.)

Ms. Noriko HASEMI (Fac. Sci., Saitama Univ.)

Ms. Shima OHSAKI (Fac. Human Sci., Ochanomizu Univ.)