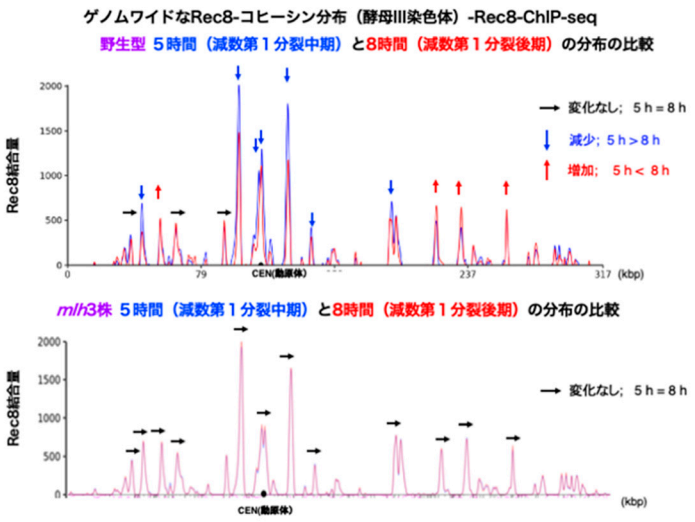
25　相同組換えによる減数分裂期コヒーシンの動態制御	篠原　彰

【目的】生殖幹細胞から配偶子を生み出す減数分裂は特異的な染色体構造を形成することで、相同組換えなどのDNA 反応を制御する。減数分裂期の組換えはゲノムの多様性を生み出すばかりでなく，相同染色体の交換を促し、染色体間に物理的な結合（キアズマ）を作ることで減数第 1 分裂期の相同染色体の分配に必須になる。減数分裂期組換えは、染色体構造を介して、姉妹染色体ではなく、空間的に離れた相同染色体を組換えのパートナーとして選択し、キアズマになる交叉型組換え体の形成経路を選ぶ。染色体構造の基盤となるコヒーシンとして、減数分裂期では体細胞分裂期と異なるコヒーシン複合体（Rec8 コヒーシン）が働くことで、減数分裂期の特異性が生まれる。減数分裂期の染色体軸構造の構成要素になる Rec8 コヒーシンは、組換えのパートナーとして姉妹染色分体ではなく、空間的に離れた相同染色体を選ぶ制御にも関わることが知られている。一方、どのような仕組みで Rec8 コヒーシンが染色体軸ーループ構造形成や組換え反応を制御するのか、と言った減数分裂期の Rec8 コヒーシンの機能に関しては、その動態を含めて、完全には理解されていない。減数分裂期の染色体分配を含めた多くの反応に必須であるために、これまでコヒーシンは動原体・腕部に結合後は、非常に安定に結合すると考えられて来た。実際にヒト卵子ではその結合は数十年に渡ると言われている。一方、我々の研究（Challa et al. PLoS Genetics,2019）から、酵母の減数第 1 分裂中期の後半に減数分裂期特異的 Rec8 コヒーシンの約半分がセパレースによる切断“非”依存的に染色体から解離することを明らかに出来た。この結果は、Rec8 コヒーシンが、減数分裂期中期ではより動的な挙動を取ることを示している。さらに、解離する Rec8 は約半分であることから、解離を保護する仕組みが局所的に存在することも示唆されている。

【方法】減数分裂中期の Rec8 コヒーシンの染色体上の領域特異的な動態解析のため、免疫沈降ーDNA シークエンス（ChIP-seq）によって、出芽酵母の減数分裂期細胞の Rec8 コヒーシンのゲノムワイドな結合分布を解析した。さらに、コヒーシンの切断非依存性の解離に対する減数分裂期の相同組換えの役割を知るために、減数分裂期組換えの開始反応に必要な SPO11 や組換え中間体の解離に必須の MLH3 の欠損株を用いて、ChIP-seq 方法で Rec8 の染色体上での分布も合わせて解析した。

【結果】染色体の領域毎に Rec8 の動態が異なることを見出した。Rec8 コヒーシンが解離する領域、保持される領域に加え、その結合が増加する領域が存在した（未発表）。この結果から Rec8 コヒーシンは減数分裂期では非常にダイナミックな動態変化を示し、領域特異的に解離や保護と言った制御を受けるばかりでなく、積極的にコヒーシンを再結合させると言う高度な制御を受けることが分かった。

酵母第Ⅲ染色体上のRec8の分布



25. 相同組換えによる減数分裂期コヒーシンの動態制御

篠原　彰

大阪大学 蛋白質研究所 蛋白質高次機能研究部門

Key words：減数分裂，染色体，コヒーシン，相同組換え

緒　言

生き物のゲノム情報の記憶媒体である染色体は異なる階層に折り畳まれ、その折り畳み構造を変換させることで、転写、複製、組換え、修復、分配などの反応に対して制御の場を提供している。一方、染色体 DNA 上の種々の反応は染色体構造を局所的あるいはグローバルに変化させることで、反応後の細胞機能や運命を変更させるフィードバック応答も有している。染色体ではクロマチンがループを作ることで、Mb 単位のドメイン（Topological associated domain：TAD）や複数の TADs が集まるコンパートメントと言った高次染色体構造を形成する。TAD などの基盤になるのが、2 つの DNA 分子を束ね、クロマチンループの形成活性を有するコヒーシン複合体である。コヒーシンは G1 期に染色体に結合し、S 期の DNA 複製を介して、染色体へ結合が安定化し、姉妹染色体の接着を確立する。また、分解酵素セパレースによるコヒーシンの構成要素 SCC1 の切断により、M 期に染色体から解離することで、染色体の正確な分配が保証される。一方、TAD 形成に必要なコヒーシンは染色体内ループを形成する活性を有し、姉妹染色体接着に関わる複合体とは異なると近年考えられているが、それら 2 つの活性や局在、染色体上での動態の違いを生み出す仕組みについては解明されていない。

生殖幹細胞から配偶子を生み出す減数分裂は特異的な染色体構造を形成することで、相同組換えなどの DNA 反応を制御する。減数分裂期の組換えはゲノムの多様性を生み出すばかりでなく，相同染色体の交換を促し、染色体間に物理的な結合（キアズマ）を作ることで減数第 1 分裂期の相同染色体の分配に必須になる。減数分裂期組換えは、染色体構造を介して、姉妹染色体ではなく、空間的に離れた相同染色体を組換えのパートナーとして選択し、キアズマになる交叉型組換え体の形成経路を選ぶ。組換えの起きる減数分裂期の中期では染色体から TAD 構造が消失する一方、染色体の軸構造を基盤にした多数のクロマチンループからなる、染色体軸―ループ構造が生まれる。この減数分裂期特異的な染色体軸－ループ構造の形成はコヒーシンより担われ、組換え反応を制御し、減数分裂期の特異性を生み出す。一方、組換えは、2 つの相同染色体の軸構造が対合した、特異的な染色体構造（シナプトネマ複合体：SC）の形成を促進する。染色体構造の基盤となるコヒーシンとして、減数分裂期では体細胞分裂期と異なるコヒーシン複合体（Rec8 コヒーシン）が働くことで、減数分裂期の特異性が生まれる［1］。減数分裂期の染色体軸構造の構成要素になる Rec8 コヒーシンは、組換えのパートナーとして姉妹染色分体ではなく、空間的に離れた相同染色体を選ぶ制御にも関わることが知られている。一方、どのような仕組みで Rec8 コヒーシンが染色体軸－ループ構造形成や組換え反応を制御するのか、と言った減数分裂期の Rec8 コヒーシンの機能に関しては、その動態を含めて、完全には理解されていない。

減数分裂期の染色体分配を含めた多くの反応に必須であるために、これまでコヒーシンは動原体・腕部に結合後は、非常に安定に結合すると考えられて来た。実際にヒト卵子ではその結合は数十年に渡ると言われている［2］。一方、我々の研究［3］から、酵母の減数第 1 分裂中期の後半に減数分裂期特異的 Rec8 コヒーシンの約半分がセパレースによる切断“非”依存的に染色体から解離することを明らかに出来た。この結果は Rec8 コヒーシンが減数分裂期中期ではより動的な挙動を取ることが示している。本研究では減数分裂期組換え、相同検索反応による、コヒーシンによる動態制御と、その結果生じる減数分裂期染色体の構造変化を促す応答制御の分子メカニズムを解明することを目的とする。

方法および結果

1. 出芽酵母の減数分裂期における Rec8 コヒーシンの局在解析

これまでの解析から、出芽酵母の減数第 1 分裂期の前期（prophase I）では Rec8 コヒーシンの非切断性の解離が起きることが知られている。興味深いことに、解離する Rec8 と解離しない Rec8 の 2 つの集団があることが分かっている。染色体の領域ごとに Rec8 の結合の制御が異なる可能性が考えられてきた［2，3］。減数分裂中期の Rec8 コヒーシンの領域特異的な動態を詳細に解析するため、免疫沈降－DNA シークエンス（クロマチン免疫沈降法、ChIP-seq）を実施した。Rec8 コヒーシンは切断依存性（セパレースによる切断）により、染色体より解離することが知られているため、非切断型のコヒーシンの局在を解析するためには、減数分裂期の進行を切断が起きる前の段階つまり、減数第 1 分裂の前で止める必要がある。そのために、セパレースの活性化に必要な Cdc20（Anaphase Promoting complex/cyclosome の活性化因子）を減数分裂期特異的に欠失させる *CDC20mn*（meiotic null）株を用いた。*CDC20mn* 株の 2 倍体細胞を窒素源の枯渇により同調的に減数分裂に 導入し、5、8 時間で細胞を回収し、タンパク質と DNA をホルムアルデヒドで架橋した後に、Rec8 抗体を用いた免疫沈降を実施した。回収した画分を脱架橋した後に、DNA を回収して、次世代 DNA シークエンサによる 解析を行い、回収できた DNA 配列を酵母のゲノムに割り当てることで、染色体の各領域についての Rec8 の結合量を 5、8 時間で比較した（図 1）［4］。酵母は 16 本の染色体を持つが、図 1 では解析結果の代表として 第Ⅲ番染色体の Rec8 の分布を示している。

Rec8 コヒーシンは染色体上では動原体部と腕部に局在することが知られている［5］。出芽酵母の減数分裂期細胞の Rec8 コヒーシンのゲノムワイドな結合分布を解析すると、減数第 1 分裂中期（5 時間）と後期（8 時間）ではその分布に大きな違いはなかった（図 1）。一方、5 時間目と 8 時間目の Rec8 の結合量を比較すると、領域ごとに異なる挙動を示すことが分かった。図 1 に示したように、Rec8 コヒーシンの結合が減少する領域（青矢印）、増加する領域（赤矢印）、保持される領域（黒矢印）があった。この結果から Rec8 コヒーシンはこれまで知られているように単純にその一部が染色体から解離するばかりでなく、減数分裂期では非常にダイナミックな動態変化を示し、領域特異的に解離する領域と、その解離からの保護を受ける領域に加え、積極的にコヒーシンを再結合させると言う高度な制御を受けることが分かった。

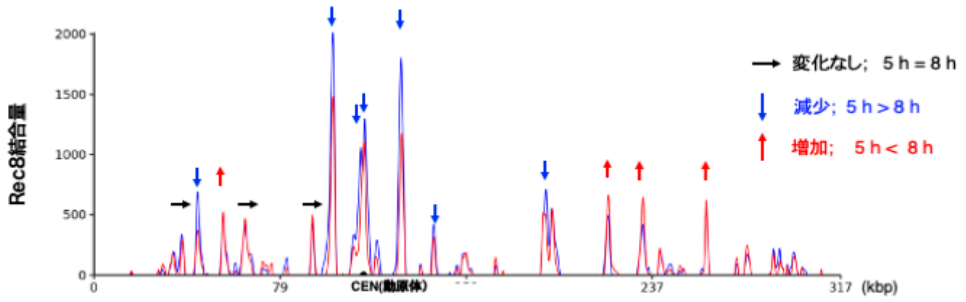


図 1. 野生型酵母における Rec8 の酵母第Ⅲ染色体上の分布

減数分裂第 1 分裂後期で停止する（*CDC20mn* 株）酵母細胞を減数分裂期に導入後、5 時間（青）と 8 時間（赤）で Rec8 に対するクロマチン免疫沈降を行った。Rec8 の結合量を比較している。5、8 時間を比較すると、結合量が増加する Rec8（赤矢印）、減少する Rec8（青矢印）、その結合に変化がない Rec8（黒矢印）に分けられる。

2. 出芽酵母の減数分裂期における Rec8 コヒーシンの局在への相同組換えの影響

Rec8 コヒーシンの非切断性の解離は減数第 1 分裂期の前期（prophase I）の中盤から後半にかけて起きる［3］。減数第 1 分裂期の前期では Rec8 コヒーシンが染色体の足場となりループ－軸構造を形成することで、相同組換えを制御することが知られている。減数分裂期組換えは染色体のホットスポットと呼ばれる特異的な部位に DNA の 2 重鎖切断（DNA double-strand break : DSB）が生じることにより誘発される。DSB はその後様々なプロセッシングを受けて、double-Holliday 構造を持つ組換え中間体を経て、最終的に交叉型組換え体になることが知られている。減数第 1 分裂期の前期（prophase I）の後半では、double-Holliday 構造を持つ組換え中間体の解離が起きる事が知られている。そこで、今回見出した切断非依存性の Rec8 コヒーシンの動態と減数分裂期組換えの関係を解析した。最初に、DSB 形成に欠損を持つ *spo11 CDC20mn* の 2 重変異株を用いて、抗 Rec8 抗体による間接蛍光抗体法で Rec8 の局在を解析した。報告されているように、コントロールの *CDC20mn* 変異株では 5 時間目で、Rec8 は線状の染色像として観察できた。一方、8 時間目では線状というよりはドット上の局在を示し、その結合量（蛍光強度）は約半分に減少していて、先行研究の結果［3］と一致した。一方、*spo11 CDC20mn* の 2 重変異株では、線状からドット状への局在パターンの変化は見られたが、その蛍光強度の減少は観察出来なかった。このことは Rec8 コヒーシンの非切断性の解離には DSB 形成、つまり、相同組換えを必要とすることを意味する。ただ、DSB 形成は減数第 1 分裂期の前期（prophase I）の中盤ではなく、その前半で起きることから、DSB 形成に依存した、下流の事象がコヒーシンの動態を制御すると考えられた。

DSB 形成後の過程で、減数第 1 分裂期の前期の後半に起きる double-Holliday 構造を持つ組換え中間体の解離に着目した。この解離には特異的な DNA 切断酵素 MutLγ 複合体（Mlh1-Mlh3 のヘテロ 2 量体）が必要であることが知られている。そこで、Rec8 の結合を *mlh3 CDC20mn* の 2 重変異株で解析すると、Rec8 の結合の低下（減少）が見られないことが分かった。次に、染色体領域ごとの Rec8 の結合をクロマチン免疫沈降法で解析した（図 2）。すると、野生型で見られたような Rec8 の結合量の増加や減少は全く見られなかった。この結果は、減数第 1 分裂前期の後半に起きる Rec8 コヒーシンの動態は Mlh3 に依存していることを示唆していた。つまり、double-Holliday 構造の解離から、交叉型組換え体の形成と連携している可能性が高い。一方、Rec8 コヒーシンの動態は領域特異的であり、染色体ループに位置する組換え部位とコヒーシン結合部位（軸）は空間的に離れていることから、染色体の領域毎にコヒーシンの解離・再結合（・保護）を核内でグローバルに制御するシグナル伝達機構が存在することを、これらの結果は示している。

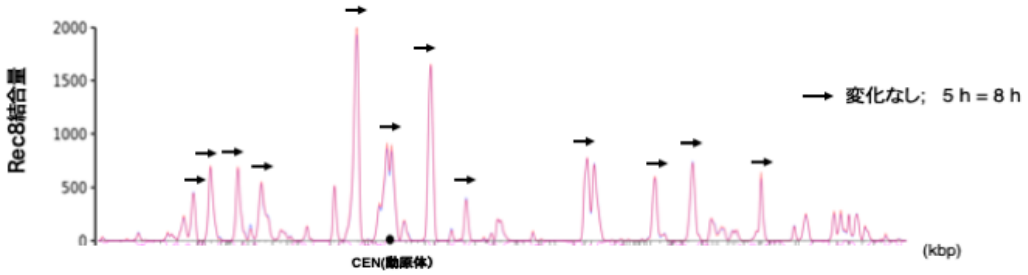


図 2. *mlh3* 欠失株における Rec8 の酵母第Ⅲ染色体上の分布

減数分裂第 1 分裂後期で停止する（*mlh3 CDC20mn* 株）酵母細胞を減数分裂期に導入後、5 時間（青）と 8 時間（赤）で Rec8 に対するクロマチン免疫沈降を行った。Rec8 の結合量を比較している。5、8 時間を比較すると、結合量が増加する Rec8（赤矢印）、減少する Rec8（青矢印）、その結合に変化がない Rec8（黒矢印）に分けられる。

考　察

これらの結果は、減数分裂期の組換え、特に交叉型組換えに依存して、コヒーシンの解離・結合を制御するシグナル伝達機構が存在し、コヒーシンの結合変化により染色体の構造全体を変換させることで、染色体分配に必要な形態形成を促す仕組みがあることを示している。哺乳類の減数分裂期でもコヒーシンの結合は動的変化することが知られているが、今回観察された減数分裂期特異的なコヒーシンの動態が染色体の領域ごとに制御されている可能性は高い。ヒトの卵子では Rec8-コヒーシンの結合は数 10 年にも及び、その結合が女性の年齢とともに減少し、卵子の染色体分配の異常、つまり流産や不妊の原因になっていることが知られている［6］。今後、ヒトなどでの減数分裂期特異的なコヒーシンの結合・解離の制御の理解が進むことで、卵子の老化などの問題の解決の糸口になるかもしれない。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、インド Indian Institute of Science, Education and Research, Thiruvananthapuram 校の Nishant KT である。

文　献

1） Klein F, Mahr P, Galova M, Buonomo SB, Michaelis C, Nairz K, Nasmyth K. A central role for cohesins in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis. Cell. 1999 Jul 9;98(1):91-103. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80609-1. PMID: 10412984

2） Challa K, Shinohara M, Shinohara A. Meiotic prophase-like pathway for cleavage-independent removal of cohesin for chromosome morphogenesis. Curr Genet. 2019 Aug;65(4):817-827. doi: 10.1007/s00294-019-00959-x. Epub 2019 Mar 28. PMID: 30923890

3） Challa K, Fajish V G, Shinohara M, Klein F, Gasser SM, Shinohara A. Meiosis-specific prophase-like pathway controls cleavage-independent release of cohesin by Wapl phosphorylation. PLoS Genet. 2019 Jan 3;15(1):e1007851. doi: 10.1371/journal.pgen.1007851. eCollection 2019 Jan. PMID: 30605471

4） Fajish G 5th, Challa K, Salim S, Vp A, Mwaniki S, Zhang R, Fujita Y, Ito M, Nishant KT, Shinohara A. DNA double-strand breaks regulate the cleavage-independent release of Rec8-cohesin during yeast meiosis. Genes Cells. 2024 Jan;29(1):86-98. doi: 10.1111/gtc.13081. Epub 2023 Nov 15. PMID: 37968127

5） Sun X, Huang L, Markowitz TE, Blitzblau HG, Chen D, Klein F, Hochwagen A. Transcription dynamically patterns the meiotic chromosome-axis interface. Elife. 2015 Aug 10;4:e07424. doi: 10.7554/eLife.07424. PMID: 26258962

6） Gruhn JR, Zielinska AP, Shukla V, Blanshard R, Capalbo A, Cimadomo D, Nikiforov D, Chan AC, Newnham LJ, Vogel I, Scarica C, Krapchev M, Taylor D, Kristensen SG, Cheng J, Ernst E, Bjørn AB, Colmorn LB, Blayney M, Elder K, Liss J, Hartshorne G, Grøndahl ML, Rienzi L, Ubaldi F, McCoy R, Lukaszuk K, Andersen CY, Schuh M, Hoffmann ER. Chromosome errors in human eggs shape natural fertility over reproductive life span. Science. 2019 Sep 27;365(6460):1466-1469. doi: 10.1126/science.aav7321. PMID: 31604276