



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	分裂酵母ヘテロクロマチンタンパク質HP1/Swi6によるmat領域の遺伝子再編成制御機構の研究
Author(s)	藤岡, 拓生
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第16540号
Issue Date	2025-06-30
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16540
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95720
Type	doctoral thesis
File Information	FUJI0KA_Takumi.pdf



分裂酵母ヘテロクロマチンタンパク質 HP1/Swi6 による
mat 領域の遺伝子再編成制御機構の研究

藤岡 拓生

北海道大学総合化学院 総合化学専攻

目次

アブストラクト	4
略語一覧	5
イントロダクション	6
1.プログラムされた DNA ニ本鎖切断	6
2.クロマチン構造.....	6
3.出芽酵母における接合型変換	6
4.分裂酵母の生活環	7
5.分裂酵母の接合型変換	8
6.接合型変換 cis element.....	11
7.接合型変換 trans element.....	11
8.homothallic strain と heterothallic strain.....	13
9.接合型変換とヘテロクロマチン	15
10.mat 領域特異的組換えタンパク質 Swi2	15
11.DSB 修復と接合型変換.....	16
12.本研究	17
リザルト	19
1.swi6 変異体の作成.....	19
2.生育阻害を示す swi6 CSD (H321Q,H321S)点変異体の単離	20
3.swi6 CSD(H321Q, H321S)点変異株においてヘテロクロマチンは維持される	26
4.生育阻害を示す細胞を再培養すると一部の細胞で生育阻害が回復する	29
5.h ⁺ N swi6H321Q 点変異体の細胞の一部は接合型変換を起こしている	29

6. <i>h90</i> , <i>h^S</i> では生育阻害は起きない	31
7. <i>PΔ17 (h+ SAS1Δ)</i> のバックグラウンドで <i>swi6H32/Q</i> 変異体は生育阻害を示さない	31
8. <i>swi2</i> を欠損させた <i>swi2Δ swi6H32/Q</i> は生育阻害を示さない	32
9.生育阻害は Swi2-AT-hook 依存的に起きる	33
10.Swi6 と相互作用できない Swi2 変異体を <i>h^N</i> に導入すると生育阻害を示す	35
11. <i>swi2-3A</i> 変異体では接合型変換は起きない	37
12. <i>h^N swi6H32/Q</i> 変異体における接合型変換は Swi2 に依存しない	39
13. <i>h^N swi6H32/Q</i> 変異体における接合型変換は Rad57 依存的に起きる	40
14. <i>h^N</i> のバックグラウンドにおいて <i>swi6H32/Q</i> 変異における接合型変換における組換え異常によって <i>h^N</i> 型の <i>mat</i> 構造から <i>h90</i> 型の <i>mat</i> 構造になる	42
DISCUSSION	45
1.生育阻害について	45
2.Swi6 から遊離した Swi2 がゲノムワイドに機能するわけではない	45
3. <i>h^N</i> でのみ生育阻害が起きる理由	45
4.colony variegation.....	46
5.遺伝子変換	47
6.Swi6 のパートナータンパク質の時空間制御	47
結言	48
材料と方法	50
分裂酵母リスト	50
プライマーリスト	51
プラスミドリスト	51
酵母培養	51

形質転換	52
Pombe strain construction.....	52
生育阻害の表現型観察	52
クロマチン免疫沈降法 (ChIP).....	52
RNA 抽出と RT	53
mat PCR.....	54
colony-directed mat PCR	54
Yeast Two Hybrid 法	55
ゲノム抽出	55
サザンブロッティング	55
Iodine stining	56
参考文献	57

アブストラクト

真核生物の DNA はヒストンタンパク質に巻きついたクロマチン構造をとり、核に収納される。ヘテロクロマチンは凝縮した構造をとり、転写に抑制的に機能する。HP1 は種を超えて広く保存されたヘテロクロマチンタンパク質であり、ヘテロクロマチン構成主因子として広く知られている。その一方で、HP1 のプロテオミクス解析からは転写抑制因子以外の様々なタンパク質と相互作用することが知られており、遺伝子発現抑制以外の機能を持つことが知られている。分裂酵母は 2 種類の接合型をもち、相同組換えによる遺伝子変換を介して、接合型が一定の頻度で切り替わる。接合型変換に関わる領域の一部はヘテロクロマチンを形成している。分裂酵母において HP1 は Swi6 の別名で古くから知られている遺伝子であり、接合型変換(mating-type switching)に関わる因子として同定された経緯がある。swi6+遺伝子破壊株ではヘテロクロマチン構造は崩壊するが、分裂酵母の生育そのものには影響を与えない。本研究では、多くのタンパク質と相互作用することが知られている HP1/Swi6 の二量体化ドメインに着目し、ヘテロクロマチン構造には影響を与えないが、生育阻害と接合型変換時に異常な組換えを起こす、非常に特徴的な swi6 点変異体を単離した。この変異により Swi6 と相互作用を介して接合型遺伝子座に局在し、接合型変換に重要な機能もつことが知られている組換え関連タンパク質の Swi2 との相互作用が無くなっていた。この Swi2 の Swi6 結合モチーフの変異体でも Swi6 変異体と同様の生育阻害がおこる。この生育阻害は Swi2-Swi6 相互作用がなくなったとき Swi2 の AT-hook motif 依存的に起きることが明らかになった。AT-hook motif は DNA 結合のためのモチーフであり Swi2 の接合型遺伝子座での局在に重要である。さらに、生育阻害は接合型遺伝子座の一部が重複した構造(h^{+N} 型)をもつ分裂酵母で特定的におこる。以上の結果は、生育阻害が重複した接合型遺伝子座での Swi2 の異常な局在による異常な組換え反応に起因することを示唆しており、Swi2-Swi6 の相互作用と AT-hook motif による DNA 認識を介した Swi2 のクロマチン局在機構に新しい視点を与えるものである。また、 h^{+N} 型の分裂酵母は接合型変換が起きず P 型の接合型を維持するが、上記の swi6 点変異により接合型変換がおきるようになった。遺伝学的解析から swi6 変異体でおきる接合型変換時の異常な組換えは DNA の相同組換え関連タンパク質 Rad57 に依存することが明らかになった。接合型遺伝子座におけるゲノム構造解析を行ったところ、接合型変換がおきない h^{+N} 型の遺伝子座のゲノム構造から接合型変換がおきる $h90$ 型への接合型遺伝子座のゲノム構造へと遺伝子の再配列が起きていた。相同組換えタンパク質 Rad57 が関わっていることを考えると、これは相同組換えの結果起きた遺伝子の再配列だと考えられる。以上のことから Swi6 が正常な相同組み換えを介した接合型遺伝子座の遺伝子変換において、相互作用するタンパク質の制御を通して統括的に重要な役割を果たしていることを示唆している。

略語一覽

ChIP	chromatin immunoprecipitation
RT	reverse transcription
qPCR	quantitative polymerase chain reaction
HP1	heterochromatin protein 1
Swi2/Swi6	switching 2/switching 6
Chp2	chromo domain containig protein 2
CD	chromo domain
CSD	chromo shadow domain
H3K9me	histone H3 lysine 9th metylation
Spt16	suppressor of Ty 16
DSB	double strand break
NHEJ	non-homologous-end-joinig
Mat	mating
HML/R	homothallism Left/Right
HO endonuclease	homing endonuclease
MPS1	mat1 pause site 1
SAS	switching activating site
SRE2/3	swi2 related site 2/3
HR	homologous recombination
Sfr1	<i>swi-5(five)</i> -related protein 1
Rad57	radiation sensitive protein 57
YES	yeast extract with supplements

イントロダクション

1. プログラムされた DNA 二本鎖切断

ゲノム DNA は紫外線や放射線による外的要因や DNA 複製などの生命活動に伴う内的要因によって、1 日に数万回以上も DNA 損傷を受ける。DNA 損傷の中でも、DNA の二本鎖切断 (DSB) は細胞にとって特に有害で、DNA 複製の停止や、転写の阻害、細胞死やがん化を引き起こす。そのため細胞は相同組換えや非相同末端修復など様々な DSB 修復経路をもつ。一方で、細胞にとって脅威であるはずの DSB を利用して、ゲノムは遺伝的多様性を生み出している。ほとんどの真核生物では減数分裂期には、Spo11 と呼ばれるよく保存されたエンドヌクレアーゼが発現し、染色体上に DSB が複数を生じさせる。この DSB は相同染色体同士で相同組換えをおこし、遺伝情報の交換を誘発する[1]。また、リンパ球では、RAG タンパク質による部位特異的な DSB の生成と、非相同末端結合 (NHEJ) 修復により抗体分子の遺伝情報の多様化が起こっている[2]。

このように、細胞はあらかじめプログラムされた DSB 生成経路を持つことがある。本研究ではその中の一つである酵母の接合型変換に焦点を当てていく。

2. クロマチン構造

真核生物の DNA はヒストン八量体に巻き付いてヌクレオソームを形成し、ヌクレオソームが集まってクロマチン構造となる。クロマチン構造は大きくヘテロクロマチンとユークロマチンに大別できる。ヘテロクロマチンはヌクレオソームが密に集まっており、転写抑制的である。ユークロマチンはヌクレオソームが疎な状態で、転写が活発な領域である。

ヘテロクロマチンはヒストン脱アセチル化酵素 HDAC によるヒストンの脱アセチル化とヒストンメチル化酵素 Survar3-9 によるヒストン H3 の 9 番目のリジンのメチル化 (H3K9me) によって形成、確立される。出芽酵母では H3K9me 化酵素が存在せず、HDAC のサーチュインタンパク質群によるヒストンの脱アセチル化によってヘテロクロマチンが形成、確立されている。分裂酵母やヒト、マウスなどでは、HDAC や Survar3-9 のほかにヘテロクロマチンタンパク質 HP1 が H3K9me を認識して、様々なサイレンシングエフェクターを呼び込むことでヘテロクロマチンを安定に維持している。

ヘテロクロマチン構造は単に遺伝子発現抑制だけでなく、正常な染色体分離[3], [4]やトランポゾンの転移抑制[5]や核内でのゲノムの空間配置制御など様々な機能をもつ。本研究で用いる分裂酵母においては、ヘテロクロマチンによる三次元的な構造と後述する接合型変換時における組換えが密接に関わることが報告されている[6]。

次の項からは出芽酵母の接合型変換、分裂酵母の接合型変換と歴史的に発見された順序で説明する。

3. 出芽酵母における接合型変換

酵母をモデル生物として用いた研究は、複製、組換え、エピジェネティクスなどの分野に大きな知見を与えてきた。酵母の接合型変換の研究もその一つである。接合型変換の研究は出芽酵母からはじまった。

出芽酵母は、単細胞生物であり、一倍体と二倍体のどちらの生活環をもつ。一倍体細胞の生活環では a、 α の二つの接合型を持つ。接合型の違いは、MAT 遺伝子座と呼ばれる染色体領域に含まれる遺伝子の違いに起因する。さらに驚くことに、天然の出芽酵母では、a 型細胞と α 型細胞は互いに栄養成長中に細胞型を切り替える[7], [8], [9]。高等真核生物では基本的に、一度細胞分化するとその後、分化前の細胞状態に戻る事はない。

このような興味深い細胞型の切り替えは、DNA のプログラムされた二本鎖切断 (DSB) から開始される。出芽酵母では、HO エンドヌクレアーゼによって部位特異的に MAT 近傍に DSB を生じさせる (図 1-1)。MAT 遺伝子座に生じた DSB を用いて同じ染色体上の HML α または HMRa 遺伝子カセットをドナーとして遺伝子変換を起こす。ドナーはランダムに選択されるわけではない。a 型細胞は HML α を、 α 型細胞は HMRa をドナーとして選択する頻度が高い。このため、高頻度で接合型変換が起こる。HML α と HMRa はヘテロクロマチンによるサイレンシングを受けているので接合型決定には関与しない。この遺伝子変換では、HML と HMR は変化せず、MAT の遺伝情報のみが変わる (図 1-1) [7], [8], [9]。

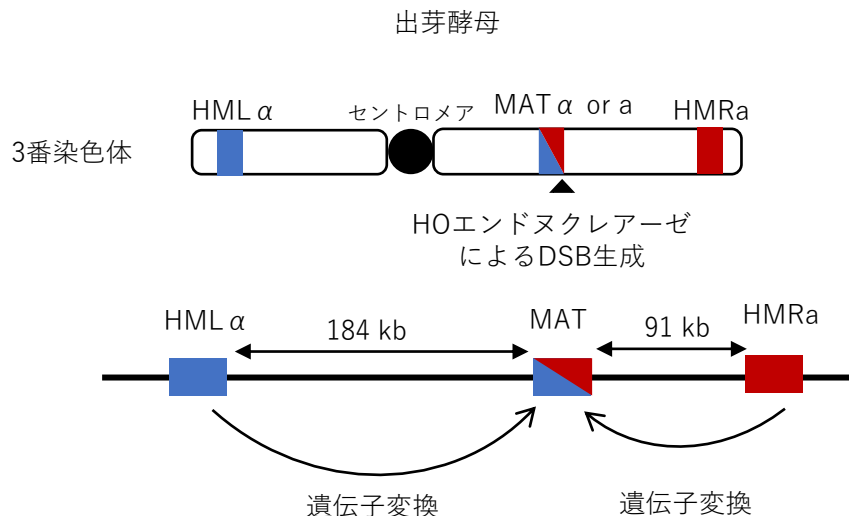


図 1-1 出芽酵母の接合型変換

出芽酵母は MAT α と MAT a の二つの接合型を持つ。MAT 遺伝子座上の遺伝子カセットによって接合型が変わる。また、出芽酵母は体細胞分裂を通じて接合型を切り替える。接合型の切り替えは、HO エンドヌクレアーゼによる MAT 遺伝子座の DSB から始まる。この時生じた DSB を修復する過程で、遺伝子カセット HML α または HMR a をドナーとして相同組換えを起こし接合型を切り替える。

出芽酵母の MAT の接合型変換の研究は、DNA 修復や遺伝子発現制御などの分野に大きく寄与した。分裂酵母でも、出芽酵母に続いて接合型変換について研究された。分裂酵母と出芽酵母は接合型変換のメカニズムが一部は似ているが、大きく異なる部分も多い。特に、分裂酵母は、HO エンドヌクレアーゼを持たず、DSB が生じるメカニズムが異なる。次に分裂酵母の接合型変換について述べる。

4. 分裂酵母の生活環

分裂酵母は基本的に一倍体の生活環である。分裂酵母の mating-type はプラス (P, $h+$) とマイナス (M, $h-$) が存在し、第二染色体上の *mat1* 領域に存在する DNA カセットによって決定される[10]。*mat1* はユークロマチン上に存在し、*mat1-P* 遺伝子カセットが入るとそれらの遺伝子が発現し P 型細胞に、*mat1-M* 遺伝子カセットが入るとそれらの遺伝子が発現し、M 型細胞になる。*mat1* と約 15 kb 離れた *mat2*、*mat1* と約 26 kb 離れた *mat3* と呼ばれる領域が同一染色体上に存在する (図 1-2)。*mat2* には、*mat1-P* と同一の遺伝情報が、*mat3* には *mat1-M* と同じ遺伝情報がある。*mat2-P*、*mat3-M* にまたがる領域はヘテロクロマチンを形成してお

り、それぞれの遺伝子発現は抑制されており、接合型決定には関与しない。*mat2-P*、*mat3-M* は約 11kb 離れており、それらを含むサイレンシングを受けている領域を K 領域という（図 1-2）。*mat1-P* と *mat2-P* には *Pc* と *Pi* の 2 つの遺伝子が、*mat1-M* と *mat3-M* には *Mc* と *Mi* の 2 つの遺伝子が含まれており、これらの遺伝子によって性分化は制御を受けている[11]。また *mat1*、*mat2*、*mat3* はそれぞれ H1 homology box (59 bp) と H2 homology box (135 bp) という共通配列に挟まれている（図 1-2）。

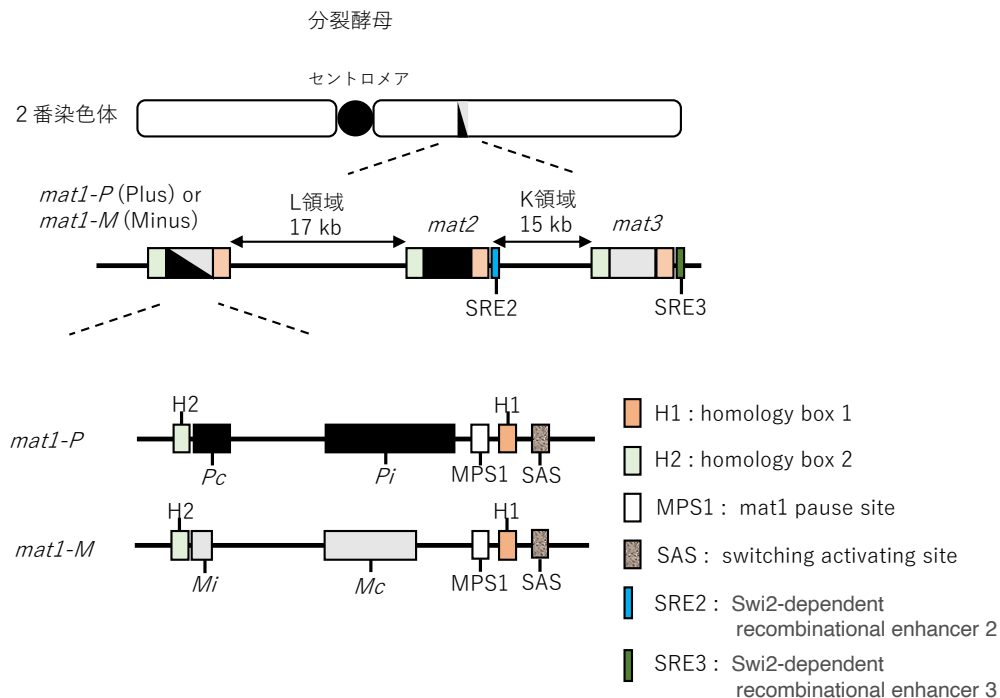


図 1-2 分裂酵母の接合型

分裂酵母は mating-type が *h+* の時は *mat1* に *Pc*、*Pi* 遺伝子を含む P 型 DNA カセットを持ち、mating-type が *h-* の時は *mat1* に *Mi*、*Mc* 遺伝子を含む M 型 DNA カセットを持つ。接合型変換の時の相同組換えに用いられる相同領域 H1、H2 は *mat1*、*mat2*、*mat3* の接合型遺伝子カセットの両端にある。また、SAS は接合型変換の cis element でインプリント形成に重要な領域である。MPS1 は複製フォークが停止する場所である。SRE2、SRE3 は接合型変換に特異的な組換え関連タンパク質 Swi2 の *mat* 局在に重要であり、接合型によってドナーを使い分けるための接合型変換の cis element だと考えられている。

分裂酵母は栄養豊富な条件では、P 型細胞と M 型細胞は接合しない。室素源枯渇状態において、P 型細胞と、M 型細胞は接合して二倍体となるが、接合直後に減数分裂に入り、四胞子を形成して、2 つの P 型細胞と、2 つの M 型細胞になる。

5. 分裂酵母の接合型変換

分裂酵母も体細胞分裂を通して、接合型を切り替えることが知られている（図 1-3）。その接合型の切り替えは S 期初期に始まる。S 期の初期に *mat1* 近傍の MPS1 で複製フォークが一時的に停止し[12]、*mat1* 近傍のインプリントが DSB になる。インプリントは 1,2 塩基の RNA[13]、[14]、またはニックであると言われている[15]。生じた DSB は H1、H2 homology box を利用し

て、相同組換えを介した遺伝子変換を起こし、*mat1-P* を *mat3-M* もしくは、*mat1-M* を *mat2-P* に置き換えることで修復され、P 型細胞と M 型細胞を切り替える (図 1-3) [16], [17], [18], [19]。 *mat1-P* は *mat3-M* よりも *mat1-P*、*mat1-M* は *mat2-P* よりも *mat1-M* の方が相同領域は大きい。それにも関わらず、*mat1-P* は *mat3-M* と、*mat1-M* は *mat2-P* と H1、H2 という短い相同配列を介して遺伝子変換を行うが、その選択性を決める詳しいメカニズムはまだわかっていない。

分裂酵母では、すべての細胞で接合型変換が起きるわけではない (図 1-4)。インプリントが刷り込まれた細胞のみが接合型変換できる。インプリントが刷り込まれていない場合は DSB が生じないので接合型変換は起きない。分裂酵母は出芽酵母とは異なり、接合型変換が上述のように複製とカップリングして起きる (図 1-3)。インプリントは DNA 複製時にラギング鎖に特異的に刷り込まれる。リーディング鎖は、インプリントが刷り込まれない[20]。例えば、インプリントが刷り込まれて switchable な P 型細胞は、switchable な P 型細胞と unswitchable な M 型細胞に分裂する。また、インプリントが刷り込まれていない unswitchable な P 細胞からは、switchable な P 細胞と、unswitchable な P 細胞が生まれる。分裂酵母では、細胞分裂の時に、インプリントが片方の細胞にのみ受け継がれ、非対称分裂をする (図 1-4)。

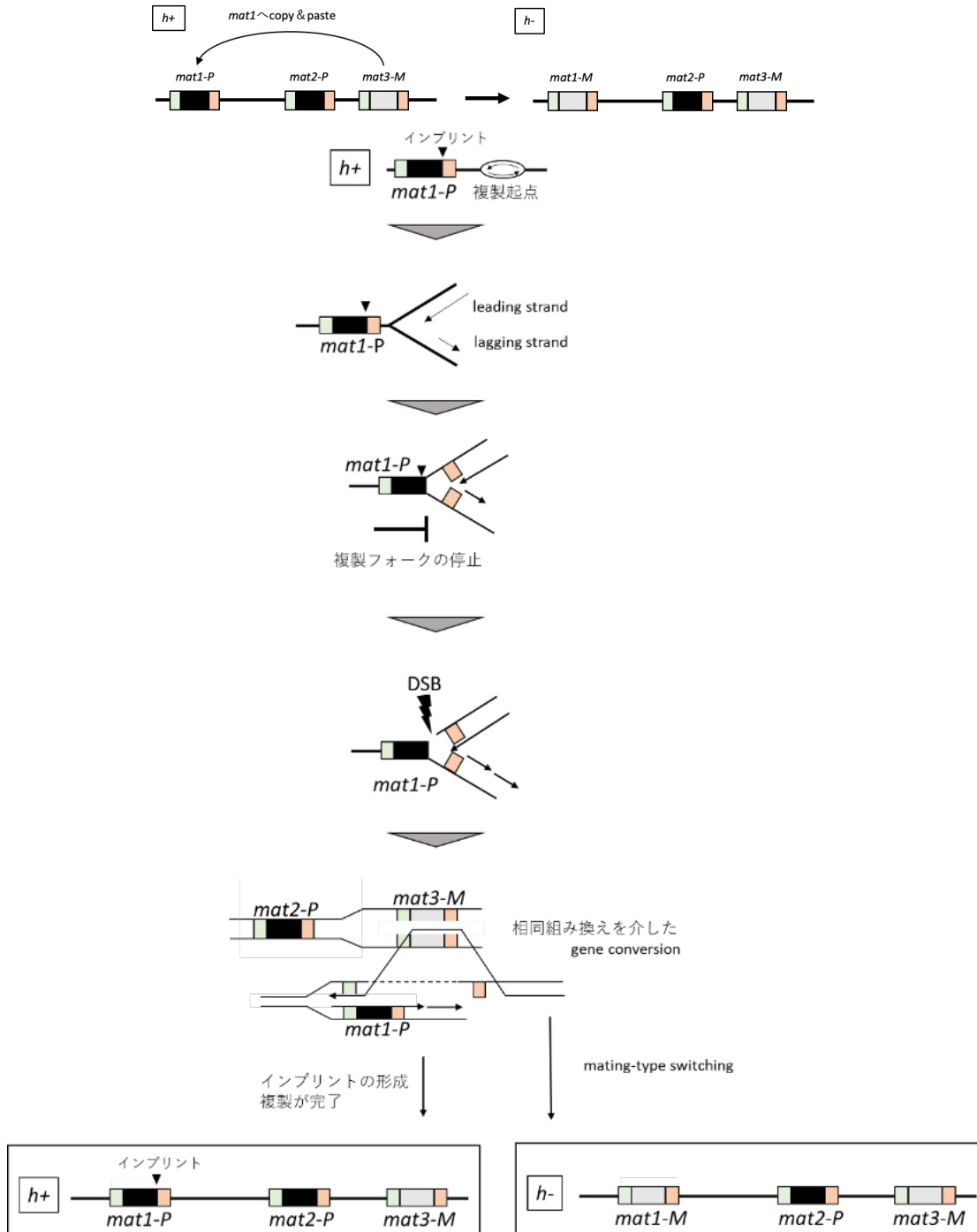


図 1-3 接合型変換の分子機構の概略

h^+ から、 h^- に接合型が切り替わる場合を示す。接合型変換はS期に始まり、複製フォークがMPS1で停止し、インプリントがDSBに変わる。leading strand側のDNAがH1、H2の相同配列を介し遺伝子変換を行う。lagging strand側のDNAにはインプリントが刷り込まれる。

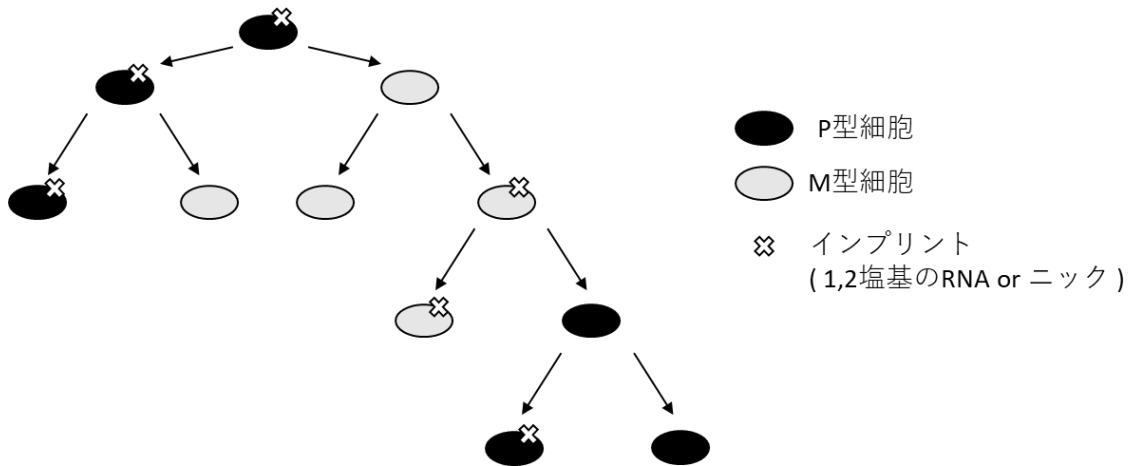


図 1-4 分裂酵母はインプリントを非対称に受け継いでいく

分裂酵母はインプリントが刷り込まれた細胞のみが接合型変換することができて、体細胞分裂をへて接合型が変わった細胞とインプリントを刷り込まれた接合型が変わっていない細胞に分かれる。インプリントを刷り込まれた P 型細胞は、M 型細胞と、インプリントが刷り込まれた P 型細胞に分裂する。インプリントが刷り込まれていない P 型細胞は、接合型変換しないので、インプリントが刷り込まれていない P 型細胞と、インプリントが刷り込まれた P 型細胞に分裂する。

6. 接合型変換 cis element

mat1 近傍に SAS1 と SAS2 の 2 つの接合型変換の cis element が見つかった。SAS1 は *mat1* のインプリントの位置から 60 bp で、SAS2 は 140 bp の位置に存在する (図 1-2)。SAS1Δ または SAS2Δ では、mating type switching の効率とインプリントの形成率の低下にとどまるが、SAS1 と SAS2 の両方の領域を欠損させると、接合型変換が完全に行われなくなり、インプリントも形成されなくなる。安定して P 型細胞を維持している *PD17* 株や M 型細胞を安定に維持している *Msm10* 株は SAS 領域を両方欠損している[21], [22]。

他に SRE2、SRE3 と呼ばれる組換えエンハンサーが存在する。SRE2 は *mat2* 近傍に、SRE3 は *mat3* 近傍にある (図 1-2) [6], [23]。SRE2、SRE3 は接合型変換時に効率的にドナーを選択するために必要である。P 細胞であれば、*mat2* 遺伝子カセットを、M 細胞であれば、*mat3* 遺伝子カセットを遺伝子変換のドナーとして効率的に選ぶために重要である。SRE2、SRE3 は接合型変換特異的な組換え関連因子の Swi2/Swi5 が結合することが知られている。SRE3 には接合型に関わらず、Swi2/Swi5 複合体が結合する。一方で、SRE2 は接合型によって Swi2/Swi5 複合体の局在量が異なる。M 細胞では、Swi2/Swi5 複合体が SRE2 に局在しており K 領域に渡って分布する。P 細胞では SRE3 では Swi2/Swi5 複合体が局在するが、その他の K 領域では M 細胞に比べて最大約 80% その局在が減少する[6]。この局在の差が接合型変換の選択性決定に重要と考えられている。

7. 接合型変換 trans element

初期に同定された接合型変換にかかわる遺伝子は、Class I a, Class I b, Class II の 3 つのクラスに分類されている[24], [25]。Class I a に分類された遺伝子は *swi1*, *swi3*, *swi7* で、これらの遺伝子に変異が入ると、インプリントの形成率が下がる。*swi2*, *swi5*, *swi6* の遺伝子は

Class I b に分類され、これらの遺伝子に変異が入ると、インプリントは正常に形成されるが、接合型変換の効率が下がる。最後に Class II に分類される *swi4*, *swi8*, *swi9*, *swi10*, *rad52* の遺伝子に変異が入ると、野生株並みのインプリント形成率を保つが、*mat* 領域において広範な DNA 再配列を形成する傾向がある。このクラスの変異体は、接合型変換中に形成された遺伝子変換中間体の分解にエラーを起こしやすいと言われている。表 1 に、すでに報告のある接合型変換関連タンパク質を示した。

表 1. mating-type switching 関連因子 ([26]より改)

gene	Product	ref
<i>swi1</i>	replication fork protection complex subunit Swi1	[24]
<i>swi2</i>	Swi5 complex subunit Swi2	[24]
<i>swi3</i>	replication fork protection complex subunit Swi3	[24]
<i>swi4/msh3</i>	MutS protein homolog 3	[24]
<i>swi5</i>	Swi5 protein	[24]
<i>swi6</i>	heterochromatin (HP1) family chromodomain protein Swi6	[24]
<i>swi7/pol1</i>	DNA polymerase alpha catalytic subunit	[24]
<i>swi8/msh2</i>	MutS protein homolog 2	[24]
<i>swi9/rad16</i>	DNA repair endonuclease XPF	[24]
<i>swi10</i>	DNA repair endonuclease non-catalytic subunit Swi10	[24]
<i>sap1</i>	switch-activating protein Sap1	[21]
<i>rad52</i>	DNA recombination protein, Rad51 mediator Rad52	[27]
<i>clr1</i>	SHREC complex intermodule linker subunit Clr1	[28]
<i>clr2</i>	chromatin silencing protein Clr2	[29]
<i>clr3</i>	histone deacetylase (class II) Clr3	[29]
<i>clr4</i>	histone lysine H3-K9 methyltransferase Clr4	[29]
<i>rik1</i>	CLRC ubiquitin ligase complex WD repeat protein Rik1	[29]
<i>rhp6</i>	Rad6 homolog, ubiquitin conjugating enzyme E2 Rhp6	[30]
<i>psc3</i>	mitotic cohesin complex, STAG protein subunit Psc3	[31]
<i>sir2</i>	histone deacetylase, Sirtuin family, NAD-dependent Sir2	[32]
<i>cul4/pcu4</i>	cullin 4	[33]
<i>clr7/raf2</i>	CLRC ubiquitin ligase complex subunit Raf2	[34]
<i>clr8/raf1</i>	CLRC ubiquitin ligase complex WD repeat subunit Raf1/Dos1	[34]
<i>rad55</i>	RecA family ATPase Rad55	[35]
<i>rad57</i>	RecA family ATPase Rad57	[36]
<i>rad51</i>	RecA family recombinase Rad51	[36]

<i>rad54</i>	DNA-dependent ATPase Rad54	[36]
<i>rad50</i>	DNA repair protein Rad50	[36]
<i>phf1</i>	PHD finger protein Phf1	[36]
<i>cbp1</i>	CENP-B homolog	[37]
<i>msc1</i>	Swr1 complex subunit Msc1	[38]
<i>mat1-mc</i>	M-specific transcription factor Mc	[39]
<i>cut4</i>	anaphase-promoting complex, platform subcomplex scaffold subunit Apc1	[40]
<i>cut9</i>	anaphase-promoting complex, TPR lobe subcomplex subunit Cut9/Apc6	[40]
<i>lsd1</i>	histone demethylase SWIRM1	[41]
<i>lsd2</i>	histone demethylase SWIRM2	[41]
<i>pxd1</i>	structure-specific DNA nuclease regulator Pxd1	[42]
<i>mrc1</i>	claspin, Mrc1	[43]
<i>elp6</i>	elongator complex subunit Elp6	[26]
<i>ckb1</i>	CK2 family regulatory subunit Ckb1	[26]
<i>pof3</i>	F-box protein Pof3	[26]
<i>swd1</i>	Set1C complex subunit Swd1	[26]
<i>swd2</i>	Set1C complex subunit Swd2	[26]
<i>spf1</i>	Set1C PHD finger subunit Spf1	[26]
<i>set1</i>	histone lysine H3-K4 methyltransferase Set1	[26]
<i>swd3</i>	Set1C complex WD repeat protein Swd3	[26]
<i>ash2</i>	Ash2-trithorax family protein	[26]

8. homothallic strain と heterothallic strain

分裂酵母では、*h90* という株がある。これは効率的に接合型変換を行う **homothallic strain** である。この株は、接合型に関わらず 1 つの細胞から、P 型細胞と M 型細胞の両方をほぼ同じ割合で含むコロニーを形成する。窒素源枯渇下においては接合して四孢子を形成することができる。一方で、安定に接合型を維持する **heterothallic strain** も存在する。P 型細胞を維持する h^{+N} と M 型細胞を維持する h^S は、実験上よく用いられる **heterothallic strain** である。

h^{+N} は、約 10^5 細胞分裂に 1 回、*h90* から自然発生的に生まれる **heterothallic strain** で[44], [45], [46]、*mat2-mat3* の領域が *mat1* の領域に重複したような株である (図 1-5,6) [45]。この株では *mat1* 領域に *mat2,mat3* の 2 つの DNA カセットが入っているが、それぞれを *mat1:2* と *mat3:1* と呼ぶ。*mat1:2* には P 型 DNA カセットが入っており、遺伝子発現している。一方で、*mat3:1* は転写が抑制されている。*mat3:1* 近傍にはインプリントが形成される。また、 h^{+N} から *h90* に約 3×10^4 細胞分裂に 1 回戻ることも知られている。接合型変換の Class II 変異体では *mat* 領域でゲノムの構造異常が観察されており、*h90* 型の *mat* 構造から h^{+N} 型の *mat* 構造に変化する細胞が多く見られる。

h^S も $h90$ から生じる heterothallic strain で[47]、 h^{+N} ができる 10 分の 1 の頻度で生まれる (図 1-6)。 $mat2$ - $mat3$ の領域において $mat3$ 以外の領域が欠損したような株である。 h^S では $mat1$ の近傍の領域に、インプリントが刷り込まれている (図 1-5)。

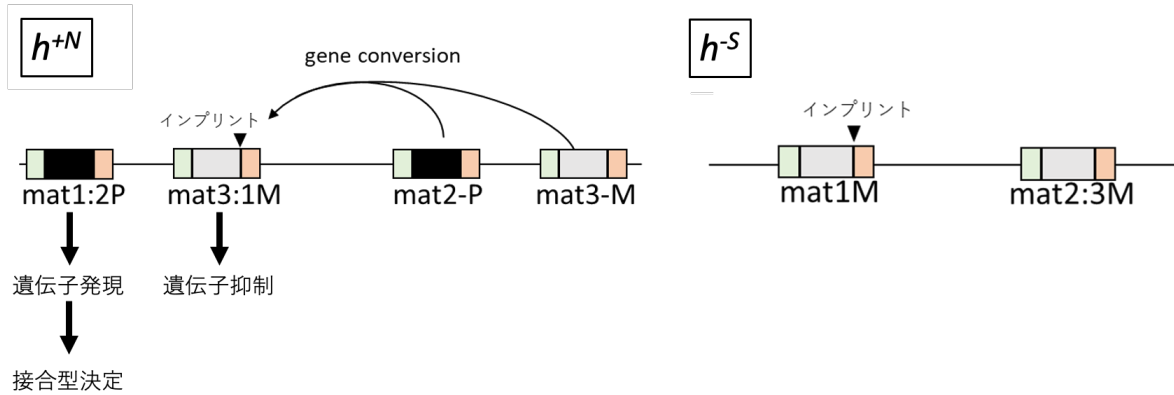


図 1-5 heterothallic strain h^{+N} と h^S の mat 構造

h^{+N} と h^S の mat 領域を示している。 h^{+N} の $mat1:2$ - P は遺伝子発現しており接合型を決めている。一方、 $mat3:1$ - M は転写が抑制されている。 h^S では M 型の DNA カセットしか持っておらず、接合型は h -になる。

$h90$ のような homothallic strain から h^{+N} 、 h^S のような heterothallic strain が自然発生的に生じる理由はよくわかっていない。homothallic strain では栄養飢餓状態では、接合し胞子を形成する。この過程では、減数分裂を経るので、進化の原動力となる。heterothallic strain のみの細胞集団内では、窒素源枯渇状態に陥っても、接合することができず、 $G0$ 期に入る。栄養豊富になると、胞子は発芽してその後元の生活環に戻るが、 $G0$ 期に入った細胞はより早く元の生活環に戻り増殖する。また、栄養源枯渇状態が続いた時には heterothallic strain は homothallic strain より生存率が高い。どちらの細胞も栄養飢餓状態に対し利点があり、より長く生存するために使い分けているのかもしれない[48]。

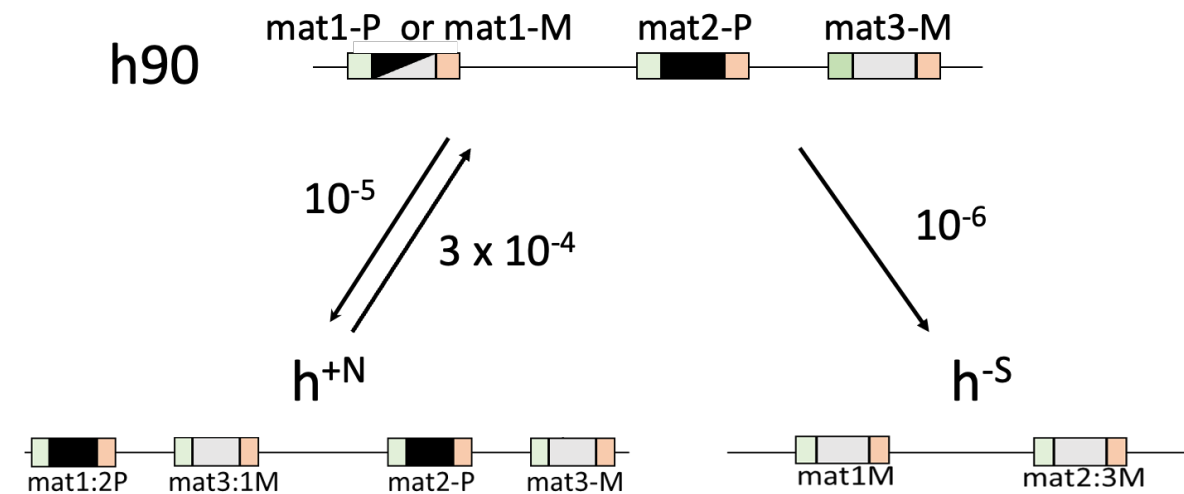


図 6 $h90$ から h^{+N} , h^S は自然発生的に生じる

$h90$ から h^{+N} は 10^{-5} 、 h^{+N} から $h90$ は 3×10^{-4} 、 $h90$ から h^S は 10^{-6} の割合で自然発生する

9. 接合型変換とヘテロクロマチン

mat1 領域は転写が活発なユークロマチン領域に存在し、*mat2-mat3* 領域はヘテロクロマチンが形成されている。接合型変換に関わる因子の中にはヘテロクロマチン関連因子が多く見つかっている（表1）。ヘテロクロマチンの崩壊は接合型変換の時のドナー選択に影響が出る。分裂酵母のヘテロクロマチンの主要なマークであるヒストン H3 の 9 番目のリジンのメチル化酵素である Clr4 は接合型変換関連因子として知られている。また、H3K9me を認識するヘテロクロマチンタンパク質 HP1 ホモログである HP1/Swi6 は高等真核生物にもよく保存されている[49] が、分裂酵母では HP1/Swi6 は接合型変換関連因子の最初のスクリーニングで同定されたタンパク質の一つである[24]。Swi6 はセントロメアなど他の領域のヘテロクロマチン形成、維持に関わっている。*mat* 領域では Swi6 は *mat* 領域特異的な組換え関連タンパク質 Swi2 と相互作用する[6], [50]。Swi6 は接合型変換とヘテロクロマチンをつなぐ交差点になっていると考えられる。しかし、接合型変換とヘテロクロマチンがどのように関連するか詳しい分子機構は不明な点が多い。

ヘテロクロマチンは、ふつう組換えが抑制されている[51], [52], [53]。分裂酵母では、ヘテロクロマチンは有糸分裂と減数分裂の両方で組換えを抑制する。一方で、*mat* 領域のヘテロクロマチンが崩壊すると接合型変換の効率が落ちる。つまり、*mat* 領域特異的な遺伝子変換をヘテロクロマチンが促進していると考えられる。

出芽酵母でも接合型変換のドナーとなる HML と HMR はともにヘテロクロマチン化され非転写領域として維持されている[7], [8], [9]。しかし、分裂酵母と異なって、ヘテロクロマチンが崩壊しても、ドナーの指向性は変わらない。出芽酵母には、H3K9 メチル化経路が存在せず、ヘテロクロマチンは主に、ヒストン脱アセチル化によって達成される。

10. *mat* 領域特異的な組換えタンパク質 Swi2

組換えが抑制されているヘテロクロマチンで接合型変換をどのように達成しているか、また、接合型変換の指向性を決定する分子機構について、近年少しずつ明らかになってきている。

Swi2 タンパク質は、接合型変換関連因子の最初のスクリーニングで同定されたタンパク質の一つである[24]。後述するように Swi2 は接合型変換で重要な働きをしている。また、Swi2 は 722 残基からなるタンパク質で、DNA との結合を仲介する AT-hook motif を有している[6], [54]。また、中間領域（211-391）で HP1/Swi6 と相互作用し、C 末端領域で Swi5 と組換えタンパク質 RecA ファミリータンパク質の Rad51 と相互作用する[50]。つまり、クロマチンと組換えタンパク質をつなぐ役割をしていることが考えられる。Swi2 は P 型細胞と M 型細胞どちらにおいても AT-hook motif を介して SRE3 に結合する（図 1-6）[54]。また、M 細胞では、はじめに AT-hook を介して SRE3 に局在し、その後 Swi6 に依存して *mat2-mat3* 全域に局在すると考えられている[6]。P 型細胞では、Swi6 の存在に関わらず、SRE3 近傍にのみ Swi2 局在が観察されている（図 1-6）。

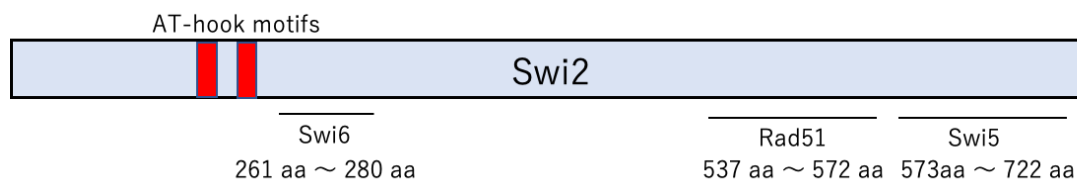


図 1-7 Swi2 の AT-hook motif と Swi6,Rad51,Swi5 の相互作用領域の模式図

Swi2 は二つの AT-hook motif をもち(217aa-223aa と 240aa-246aa)、ヘテロクロマチン関連因子の Swi6、組換え関連因子の Rad51、Swi5 と相互作用する。

Swi2 タンパク質は P 細胞よりも M 細胞で発現量が多い。*mat1-M* 遺伝子カセット内の Mc タンパク質が DNA 結合タンパク質 Abp1 に依存して Swi2 遺伝子領域に結合して Swi2 の発現量を調節しているためである[39]。

Swi2 などの相同組換え因子があると、ヘテロクロマチンでも組換えが起こり、Swi2 の *mat* 上での接合型ごと局在分布の違いが接合型変換の指向性を生じさせていると考えられている。

11. DSB 修復と接合型変換

DSB は、UV や DNA 損傷剤によって引き起こされるが、正常な DNA 複製の際にも発生する。DNA 損傷の中でも、DNA の二本鎖切断は細胞にとって特に有害で、DNA 複製の停止や、転写の阻害、細胞死やがん化を引き起こす。相同組換え (HR) は、DSB 修復のための最も重要な経路の一つである。DSB の修復のほかの経路として、非相同末端結合 (NHEJ) がある。HR において Rad51 が重要なタンパク質で、相同領域を検索し、組換え反応の初期反応を促進する。

分裂酵母では、人為的に *mat2-P* および *mat3-M* の両方を欠失させたドナーレスな株が存在し、生育可能である。ドナーレスな株は野生株並みのインプリントの刷り込みを受けている。インプリントを持たない *Msmt0* 株や *PΔ17* 株のバックグラウンドにおいては *rad51* または *rad52* 欠損しても生育可能である[36]。一方で、このドナーレス株は、*rad51* または *rad52* 欠損株で致死である[27], [36]。ドナーレスな株は mating-type switching を行うことができないが、インプリントを持つため、DSB が生じており、Rad51 や Rad52 が欠損するとこの DSB を修復することができず致死となる。*h90* 株でも Rad 51、Rad52 の欠損で致死になることから、通常の接合型変換の過程で *mat* 領域に生じた DSB は、接合型変換を介した修復機構以外の修復を受けている可能性がある。ドナーレスの株において、DSB の修復は *mat1* 遺伝子座との姉妹染色体組換えによって行われることがわかっている[36]。また、ドナーレスな細胞において、NHEJ 関連タンパク質 *pku70* 欠損株においても、生育に影響がない。*h90* 株においても、*pku70* 欠損は接合型変換の効率に影響を与えないことがわかっており[36]、接合型変換時の DSB 修復には、NHEJ はかかわっていない可能性が高い。

Swi2-Swi5 複合体は、接合型変換を特異的に促進する[6]。Swi5 は Swi2 のほかに Sfr1 とも相互作用するところが知られている。Sfr1 の C 末端領域は Swi2 と相同性があり、Swi5 と Rad51 相互作用することができる。Sfr1-Swi5 複合体は *in vivo* で相同組換えに必要な Rad51 が形成するフィラメント構造を安定化し[55]、*in vitro* では Rad51 が媒介する DNA 鎖交換反応を促進する[56]。

分裂酵母では、Rad51 依存性の相同組換えは、Rad55-Rad57 依存性のものと Swi5-Sfr1 依存性のものの 2 つの平行なパスウェイをもつことが示されている(図 1-7)[50]。また、Rad51 は接合型変換にも関与しており、Swi2, Swi5, Rad52 とともに、H1 homology box で行われる初期段階の DNA の invasion のステップを促進していると考えられている[27]。

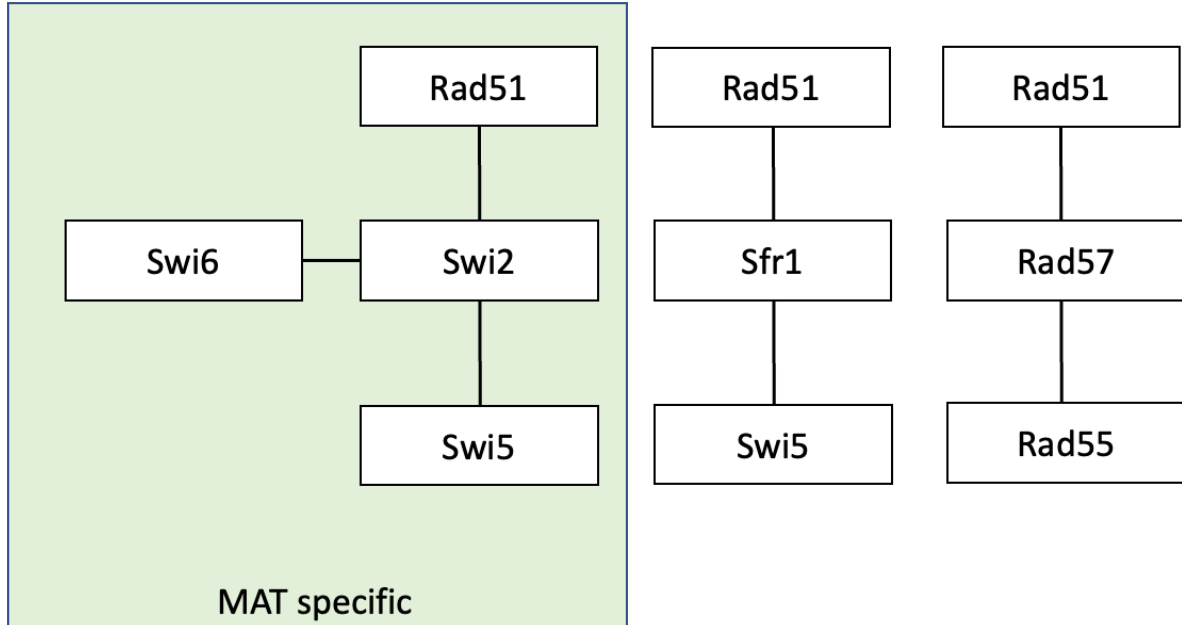


図 1-8 Rad51 による相同組換えを介した DNA 修復の異なる 3 つの経路 ([50]より改)

Swi5 は接合型変換とグローバルな DSB の修復の両方に関与している。Swi5/Sfr1 修復経路は Rad55/57 との経路は平行である。Sfr1 は DNA 修復に特異的に機能するのにに対し、Swi2 は接合型変換に特異的に機能する。

このように Swi2 や Swi5 は接合型変換の相同組換えに重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、これらの遺伝子を破壊しても、接合型変換の効率が落ちるだけで、まったく起きないわけではない。これは接合型変換による DSB の修復に Swi2-Swi5 以外の Rad55-Rad57 や Swi5-Sfr1 の修復経路が関与している可能性を示している。しかし、その詳細は明らかではない。

12. 本研究

接合型変換の時に生じる DSB のような、あらかじめプログラムされた DSB は哺乳類の生殖細胞での相同染色体間の組換えや、リンパ球での抗体遺伝子の再編成でもみられる現象である[57]。

出芽酵母と分裂酵母はともに接合型変換する[9]。しかしそのメカニズムは多くの異なる点を持つ。特に、分裂酵母では接合型変換にヘテロクロマチンに関わる点で興味深い。

mat 領域の再編成が行われて *h90* 株から *h⁺N* や *h^S* 株が自然発生的に生じるが、このメカニズムについてはほとんど調べられていない。本研究では、Swi6 の変異体スクリーニングを行った。その中の変異体にヘテロクロマチンの構造やサイレンシングに影響がないものの Swi2 との相互作用が弱くなり、接合型変換が起きない *h⁺N* 株において接合型変換が起きるものが見つかった。この組換え異常は Rad57 に依存したものであった。これは Swi6CSD 変異体において、Swi2-Swi5 経路による *mat* 領域に生じた DSB 修復を Rad57 による経路がバイパスしていることを示唆している。Swi2 に依存しない経路によって DSB が修復される時、*mat* 領域において通常とは異なる遺伝子変換が行われ、*mat* 領域の DNA の再編成が起こることが示唆された。この再編成から *h90* 型のゲノム構造を持つ細胞が出現していた。これらのことから、

$h90$ から、 h^{+N} や h^S が生じるとき、Rad57 の経路が使われる可能性があることが分かった。また、この異常な接合型変換は Swi2 が Swi6 に依存する *mat* 領域局在をほとんど示さない P 型細胞の h^{+N} 株で観察されることから、Swi6-Swi2 の相互作用が、*mat* 領域での Swi2 の局在以外にも接合型変換時に重要な機能を果たしていることを示唆している。

さらに、この変異体は h^{+N} 細胞特異的に一部の細胞で生育阻害をおこす。この阻害は Swi6 と相互作用できない Swi2 の点変異体でも観察され、Swi2 の AT-hook に依存する事がわかった。つまり、Swi6 と相互作用できない Swi2 のゲノム局在異常が関与していると考えられる。しかし、上述の異常な接合型変換とは独立した現象であった。生育阻害の分子機構は不明であるが、ゲノムの三次元構造と関連付けてその機構を推察する。

リザルト

1. *swi6* 変異体の作成

多くの因子と相互作用することが知られている Swi6 CSD ホモダイマーの構造は X 線結晶構造解析結果がすでに報告されている (図 2-2) [58]。また Swi6CSD ホモダイマーは構造体の頂点付近に生じる溝構造に PxVxL motif を持つタンパク質がはまり込んで結合することが報告されているが[59], [60]、HP1/Swi6 のプロテオミクス解析結果から結合タンパク質群を解析してみても全てのタンパク質が PxVxL motif を持つ訳ではなく、他の結合モードによってタンパク質間相互作用を維持することが予測される。この Swi6CSD ホモダイマー構造中において α -ヘリックスは dimerization surface となっており、ダイマーの内側から構造を維持していると考えられる。一方、複数の β シート構造がダイマーの外殻をなすように複数存在し構造の維持には関与せず、複数の因子との相互作用に関与している可能性が高い。そこで β シート構造上を中心として側鎖が構造体の外部表面を向いているアミノ酸、T278, E280, Y290, H300, H321 が未知因子と相互作用するのに重要であると推測した。そこで、これらのアミノ酸にランダムな点変異を導入し、Swi6 CSD の機能に重要なアミノ酸をスクリーニングによって探索した。

swi6 をコードする DNA 断片をクローニングしたプラスミドを用いて Kunkel 法に従った site-directed mutagenesis により、*swi6* の T278, E280, Y290, H300, H321 のそれぞれのアミノ酸に対応する塩基配列にランダム点変異を導入した (図 2-1)。それらのプラスミドを鋳型として PCR により増幅させた DNA cassette (変異を入れた *swi6* 遺伝子領域と薬剤耐性マーカーの領域の両方を含む DNA 領域) を *swi6* $\Delta::$ NatMX 株に電気穿孔法で導入し形質転換をおこなった (方法を参照)。得られた、形質転換体についてその後、薬剤耐性の入れ替わりを確認したものについて、以降の表現型解析を行なった。

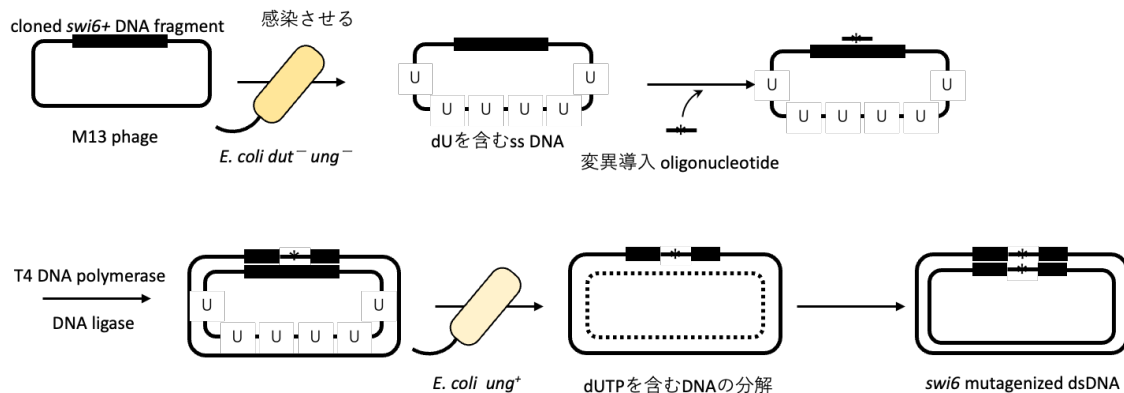
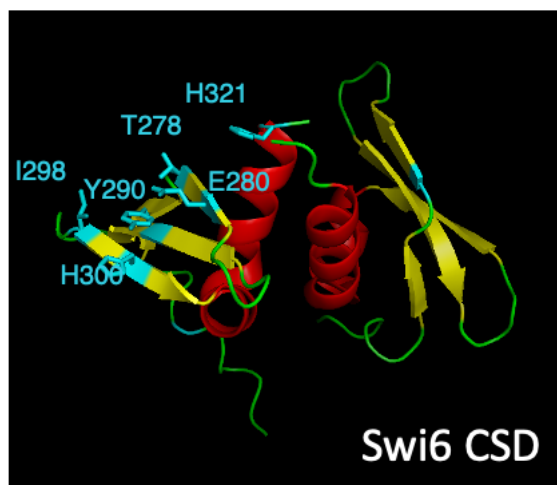


図 2-1 kunkel 法による *swi6* 遺伝子への部位特異的変異導入の方法

Kunkel 法の概要を示した。dUTPase (Dut) と Uracil-DNA glycosylase (Ung) を欠損している *E. coli dut⁻, ung⁻* に *swi6*⁺ をクローニングした M13 フェージを感染させ、DNA 中の Thymine (T) の一部が deoxyuracil (dU) におきかわった一本鎖 DNA を調製する。この DNA に変異導入用のオリゴヌクレオチドを相補させ、ポリメラーゼとリガーゼにより相補を合成する。この DNA を *ung⁺* に導入すると、dU 含有 DNA は Ung により分解される。一方 *in vitro* で合成された相補鎖は分解されずに複製される。このようにして *swi6* に変異が導入された dsDNA が得られた。



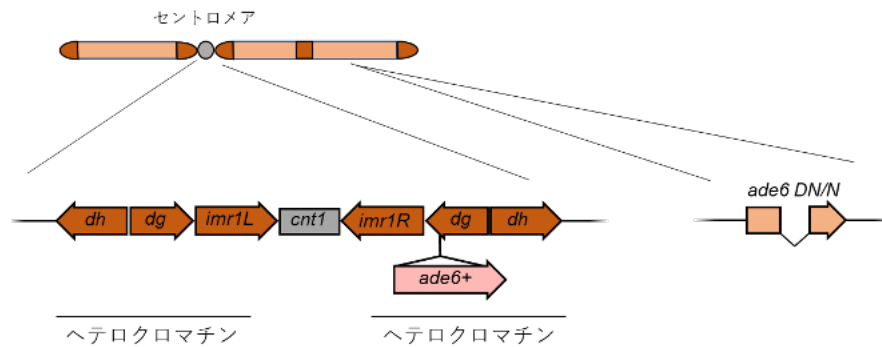
PDB ID:1E0B

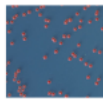
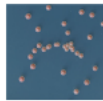
図 2-2 Swi6 CSD ホモダイマーの X 線結晶構造

Swi6 CSD ホモダイマーの X 線構造を示している。赤色で示された内部の α -ヘリックスが dimerization surface となっており構造維持に寄与している。また、 β -シートが外殻をなすように複数見受けられる。水色で示されたアミノ酸残が本研究でランダムな点変異を入れた場所である

2. 生育阻害を示す *swi6 CSD* (*H321Q*, *H321S*) 点変異体の単離

Swi6CSD の変異体のヘテロクロマチンによるサイレンシングへの影響を調べるために、分裂酵母の第一染色体セントロメアの *otr1R* 領域の *dg* 領域に *ade6+* 遺伝子が挿入されているレポーター株を用いた。なお、内在性の *ade6+* 遺伝子は制限酵素による欠失変異が導入され、機能を失っている (図 2-3A)。この株では挿入された *ade6+* 遺伝子領域においてヘテロクロマチンが形成されており、*ade6+* 遺伝子発現が抑制され、アデニンが少ない培地では、赤色のコロニーを形成する。一方、*swi6* 欠損株では挿入された *ade6+* 遺伝子領域においてヘテロクロマチンが崩壊しており、*ade6+* 遺伝子を発現し、アデニンが少ない培地でも白色のコロニーを形成する。変異体の中にもアデニンの少ない培地で白色のコロニーを形成するものがあり、ヘテロクロマチンによるサイレンシングに影響がでていることがわかる。また、*swi6* 欠損株は増殖には影響がなく野生型と同等のばらつきのない均一のコロニーを形成するが、変異体の中には野生型と同様の大きさのコロニーと小さなコロニーが混在するものが存在し、細胞増殖に影響をでていることが示唆された (図 2-3B)。



	heterochromatin	<i>dg::ade6+</i> expression	colony color	
Wild type	normal	OFF	赤色	
<i>swi6Δ</i>	disorder	ON	白色	

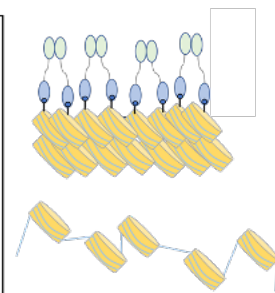


図 2-3A 本研究で *swi6* 変異体作製した分裂酵母株のマーカ遺伝子挿入場所の模式図
 本研究で用いた分裂酵母株の模式図。第一染色体セントロメア領域にマーカ遺伝子 *ade6+* が挿入されている。なお内在性の *ade6+* 遺伝子は制限酵素による欠失変異が導入されて、機能が消失している。これによりヘテロクロマチン領域における転写の程度を簡易的にモニターすることができる。Low adenine 培地で生育させた時 *swi6Δ* などのヘテロクロマチン崩壊株は脱サイレンシングにより *dg::ade6+* が発現して Low adenine 培地上で白いコロニーを形成する。一方ヘテロクロマチンが維持されていると *dg::ade6+* が発現せず赤色の色素が蓄積して赤色のコロニーを形成する。

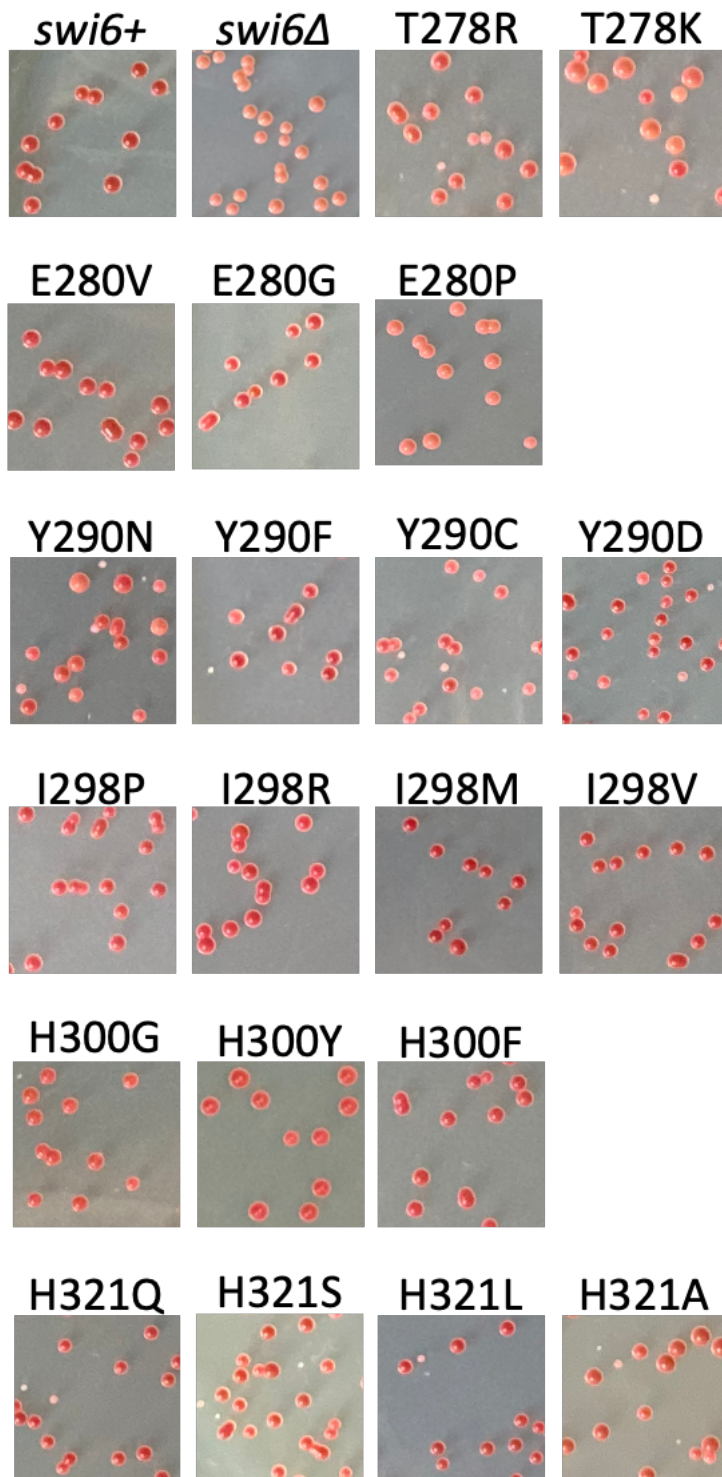


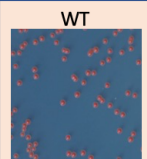
図 2-3B 得られた *swi6* 変異体の写真

今回 Swi6 CSD のスクリーニングにより得られた変異体を示した。*E280*, *I298*, *H300* の変異体は WT と同様の表現型を示した。*T278*, *Y290* 変異体はコロニーの色とコロニーサイズの

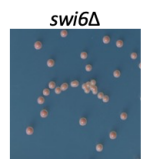
variegation を示す。H321 変異体はコロニーサイズの variegation を示す。

得られた点変異体のサイレンシングと増殖の表現型を表にまとめ図 2-3C に示した。また、図 2-3D に各変異体の赤色のコロニーと白色のコロニーの割合、大きいコロニーと小さいコロニーの割合を示した。点変異体の表現型は Wild Type (WT) と同様のもの、WT と色とコロニーサイズに違いが見られるもの、コロニーサイズに違いが見られるものの大きく 3 つに分けることができた。

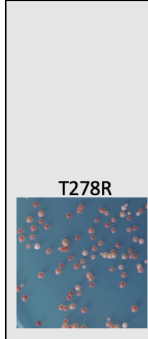
	color variegation	size variegation	
WT	Red	large	WTと同様の表現型
swi6Δ	Pink	large	
E280V	Red	large	
I298P	Red	large	
H300G	Red	large	ヘテロクロマチンのサイレンシング異常と生育阻害の両方を示す表現型
T278R	Red/Pink mix	large/small mix	
Y290D	Red/Pink mix	large/small mix	生育阻害のみを示す表現型
H321Q	Red	large/small mix	
H321S	Red	large/small mix	



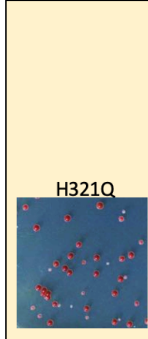
WT



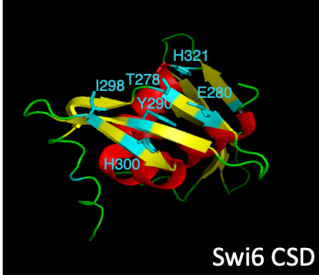
swi6Δ



T278R



H321Q



Swi6 CSD
PDB ID:1E0B

図 2-3C 得られた *swi6* 変異体の表現型のまとめ

今回得られた Swi6CSD 変異体の中で代表的なものを表にまとめた。E280, I298, H300 の変異体は WT と同様の表現型を示した。T278, Y290 変異体はコロニーの色とコロニーサイズの variegation を示す。H321 変異体はコロニーサイズの variegation を示す。

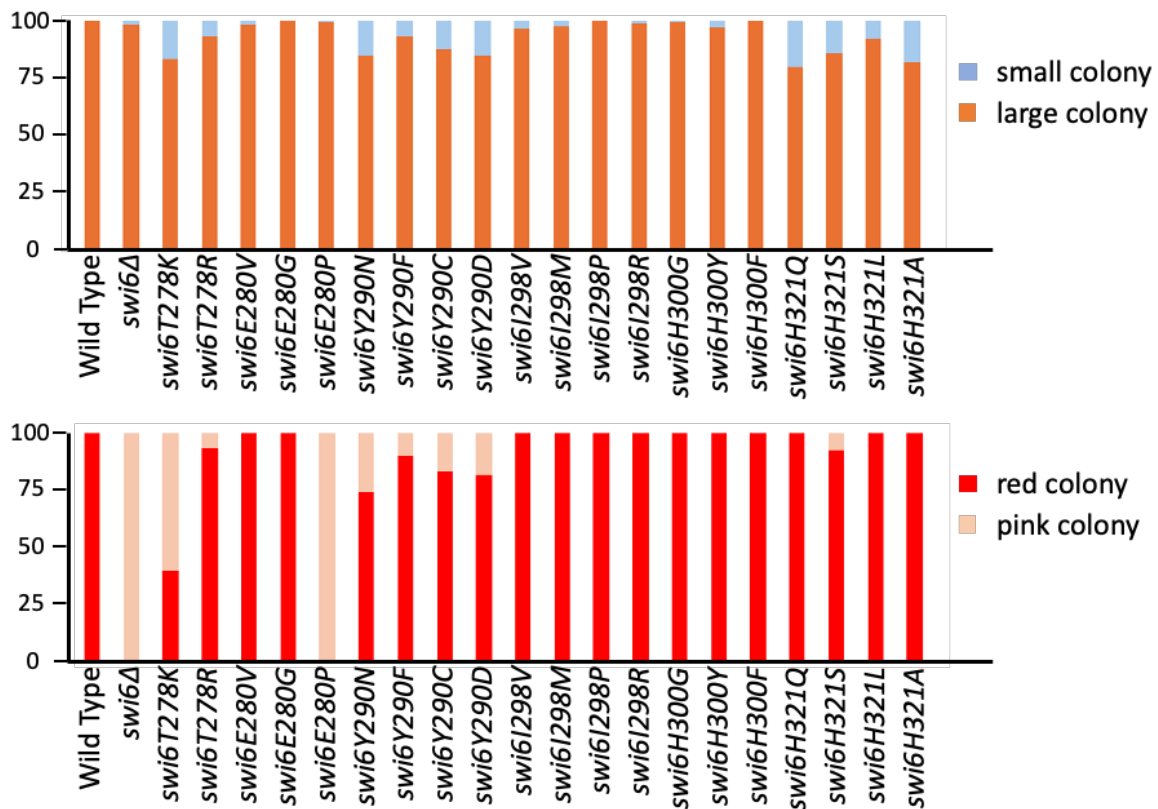


図 2-3D 得られた *swi6* 変異体の大きいコロニー、小さいコロニーの割合と赤色のコロニー、白色のコロニーの割合

(上段) 得られた変異体における大きいコロニーと小さいコロニーの割合を示している。*T278K*, *Y290C*, *Y290D*, *H321Q*, *H321S*, *H321A* で colony size variegation が確認できる。(下段) 得られた変異体の赤色のコロニーと白色のコロニーの割合を示している。*T278K*, *E280P*, *Y290N*, *Y290D* で color variegation が確認できる。

表現型が WT と同様の点変異体は *swi6 E280G*, *I298P*, *H300G* 株などが挙げられる。これらの変異体はコロニーの色と大きさともに WT とほとんど変わらなかった。なお、*Swi6E280P* で見られる *dg::ade6+* のサイレンシング異常は *Swi6E280P* のタンパク質量が *swi6 Δ* 株並に減少しており、ヘテロクロマチンの形成維持不全に起因すると考えられる (図 2-3E)。

表現型が WT と色とコロニーサイズに違いが見られる点変異体は *swi6 T278R*, *Y290D* 株などが挙げられる。これらの変異体は、WT に比べて *swi6 Δ* 株と同様の白色のような色のコロニーの割合が増加していた。これは一部の細胞でセントロメア近傍のヘテロクロマチンが崩壊していると予想される。またサイズの小さいコロニーの数の割合も増加しており、一部の細胞で増殖に影響が出ていることがわかる。

表現型が WT とコロニーサイズにのみ違いが見られる点変異体は *swi6 H321Q*, *H321S* 株などが挙げられる。コロニーの色は WT とほぼ同様であった。これはセントロメア近傍のヘテロクロマチンが維持されていることを示唆している。一方、サイズの小さいコロニーの割合が WT に対して増加しており、サイレンシングには影響がなく一部の細胞で増殖が阻害されていることが予想できる。

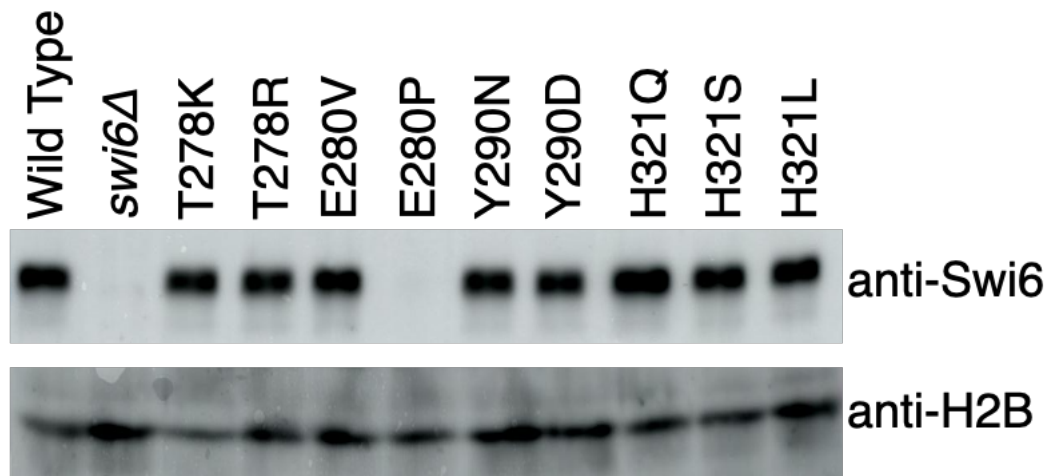


図 2-3E *swi6* 変異体のタンパク質の発現量比較
 示された各株の全細胞抽出液を SDS-PAGE を行い分離したのち、western blotting を行った。
 E280P では Swi6 タンパク質はなくなっていた。一方、スクリーニングで得られた他の変異体
 は Wild Type 並に Swi6 は存在していることが確認できた。

swi6 は接合型変換関連因子として同定された経緯がある[24]。そこで接合型変換への影響を調べるため、窒素源枯渇させた固体培地に生育させた分裂酵母の細胞をヨウ素で染めた。この方法は、分裂酵母の接合型変換の表現型解析でよく用いられる。分裂酵母は窒素源枯渇状態で、細胞集団内に異なる接合型の細胞が存在するとき、接合して孢子形成をする。この状態でヨウ素によって染めると、孢子内のデンプンにより黒く染まる。一方で、孢子形成していない細胞は、黄色く染まる。*swi6CSD* 変異体の代表的な変異体を用いて、この表現型解析を行った。変異体作製に用いた h^{+N} のバックグラウンドでは、細胞集団に P 型細胞のみで占められ、窒素源枯渇下においても黒く染まることはない。しかし、*swi6T278K*, *swi6Y290D*, *swi6H321Q* の変異体で黒く染まる細胞が存在した (図 2-3F)。これは一部の細胞の接合型が h^{+} から h^{-} に変わったことを示唆している。

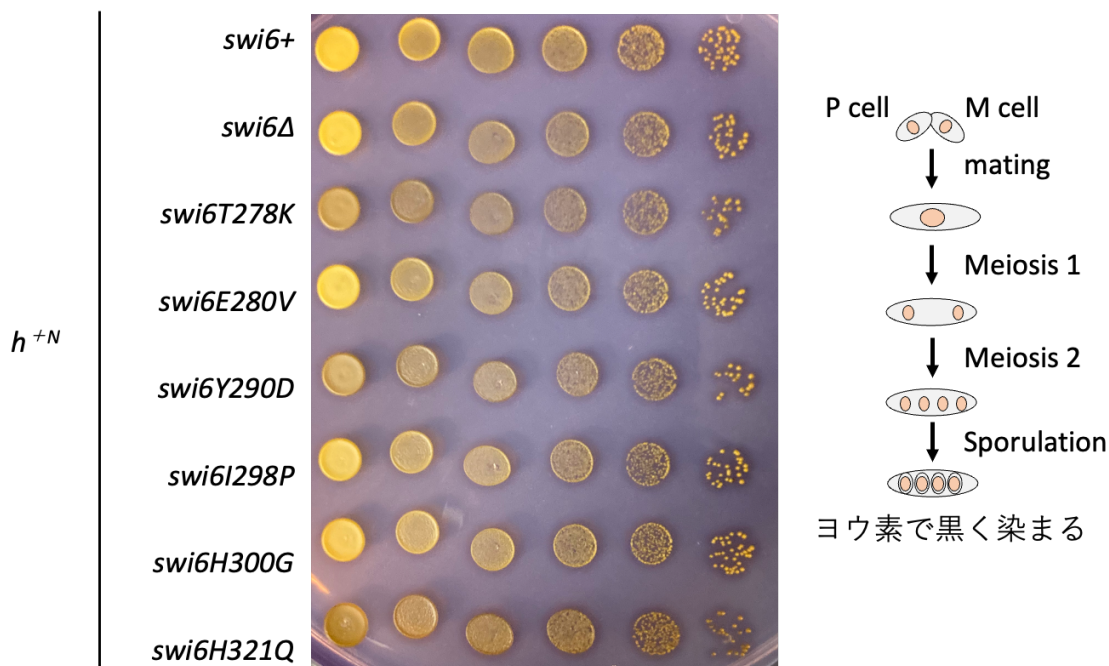


図 2-3F 得られた *swi6* 変異体の iodine staining による接合型変換の表現型解析
得られた *swi6CSD* 変異体を SPAS 固体培地に 25°C で 5 日間培養したのちヨウ素で細胞をそめた。*swi6T278K*, *swi6Y290D*, *swi6H321Q* には黒く染まったコロニーが混じっているが、その他の株は黄色く染まっている。

Swi6 の点変異体スクリーニングで得られた変異体の中で、*swi6H321* 点変異体のみが、ヘテロクロマチンでのサイレンシングが維持され、生育阻害を示し、接合型変換が観察された。そこで以降では生育阻害を示す *swi6 CSD H321* の点変異体に焦点を当ててヘテロクロマチン形成には関わらないものの、分裂酵母株の生育阻害と *mat* 構造の不安定化機構の解析を進めた。

3. *swi6 CSD(H321Q, H321S)* 点変異株においてヘテロクロマチンは維持される

swi6 H321Q, H321S 株ではセントロメアヘテロクロマチンに挿入された *dg::ade6+* 遺伝子はサイレンシングされたままであるが、これらの株が表現型から予想される通りにヘテロクロマチンを維持しているか調べるため、ペリセントロメア上の *ade6+* 遺伝子の転写量を RT-qPCR で調べた (図 2-4A)。*swi6 H321Q, H321S* 株は WT に比べて、約 2 倍の転写量があったものの、*swi6Δ* に比べると、15 分の 1 程度にとどまっていた。これは、*swi6 H321Q, H321S* 株はセントロメア近傍のヘテロクロマチンを維持していることを示唆する。さらにペリセントロメア上の *dg::ade6+* 遺伝子領域とユークロマチン上の *adh1+* 遺伝子領域における H3K9me と *Swi6* の局在をクロマチン免疫沈降法および定量的 PCR (ChIP-qPCR) で確かめクロマチンの状態を調べた (図 2-4B)。どの株においても H3K9me はユークロマチン上の *adh1+* 領域においてほとんど局在は見られない。一方、ペリセントロメア上の *ade6+* 領域では WT と同レベルの局在が *swi6 H321Q, H321S* 変異体において見られた。また、*swi6 H321Q, H321S* 変異体は *adh1+* 領域において WT と同様低いレベルで存在しており、ペリセントロメア上の *dg::ade6+* 領域では WT に比べて同じかやや高いレベルで存在していることがわかった (図 2-4A)。

また、*h90* 株において、*mat* 領域のヘテロクロマチンが維持されているか調べた。まず、ヘテロクロマチン化されている K 領域に *ura4+* が挿入された *h90* 株を用いて、*h90 swi6H321Q*

株において *Kint2::ura4+* がサイレンシングされているか表現型に基づいて観察した。*Kint2::ura4* が遺伝子発現抑制されていると 5-FOA プレート上でも正常に生育できる一方で、*swi6* Δ 株のようにヘテロクロマチンが崩壊していると *Kint2::ura4+* が発現し 5-FOA プレート上で生育阻害を示す。*h90 swi6H321Q* は 5-FOA プレート上においても WT 並みに生育しており、*Kint2::ura4+* がサイレンシングされていることが示唆された (図 2-4C)。次に K 領域の *cenH* 領域とユークロマチン上の *adh1+* 遺伝子領域における H3K9me と Swi6 の局在を ChIP-qPCR で確かめクロマチンの状態を調べた。どの株においても H3K9me はユークロマチン上の *adh1+* 遺伝子領域においてほとんど局在は見られない。一方、K 領域の *cenH* 領域では WT と同レベルの局在が *swi6 H321Q* 変異体において見られた (図 2-4C)。以上のことから *swi6 H321Q*, *H321S* 株はセントロメア近傍と *mat* 領域においてヘテロクロマチンを維持していることが確認できた。

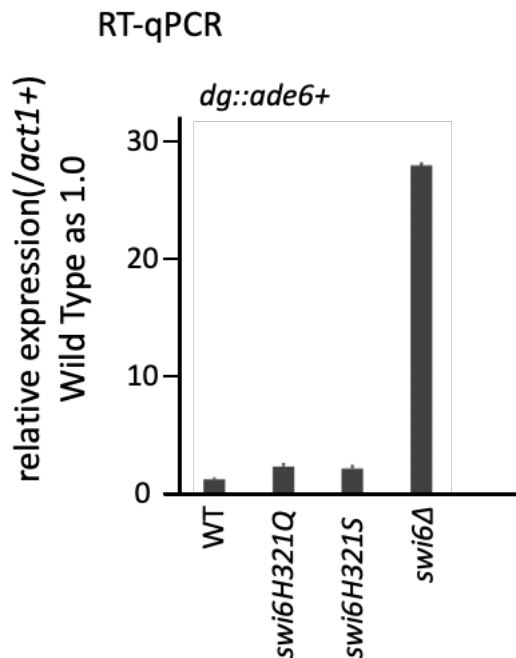


図 2-4A *swi6* CSD *H321Q*, *H321S* 変異体における *dg::ade6+* の発現量
dg::ade6+ の転写量を RT-qPCR で調べた。ユークロマチン上の遺伝子 *act1* を internal control として標準化を行い、WT(野生型株)を 1 として転写産物量を計算比較した。

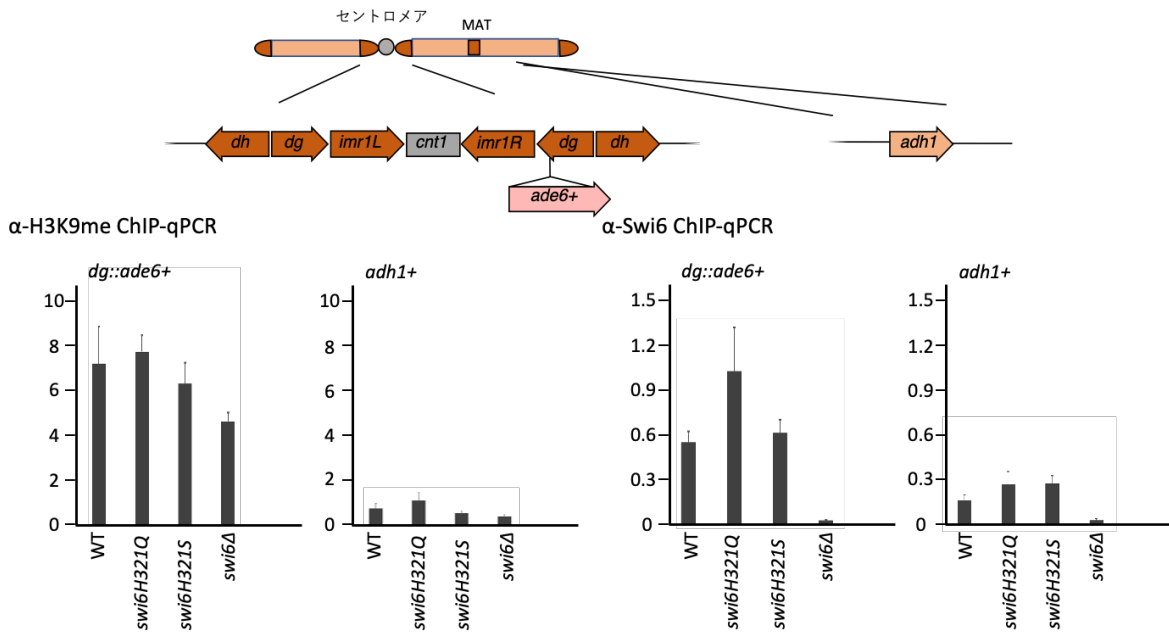


図 2-4B *swi6* CSD H321Q, H321S 変異体における *dg::ade6+* の H3K9me と Swi6 の局在 *swi6H321Q*, S 株について *dg::ade6+* と *adh1+* における H3K9me と Swi6 局在を ChIP-qPCR によって定量した。

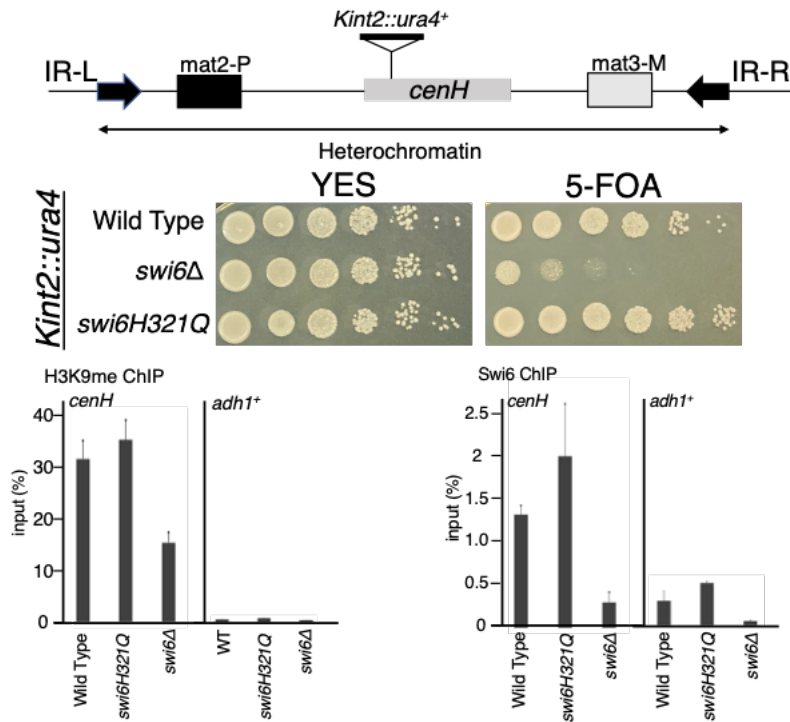


図 2-4C *swi6* CSD H321Q, H321S 変異体における *dg::ade6+* の H3K9me と Swi6 の局在 *swi6H321Q* 株について *cenH* と *adh1+* における H3K9me と Swi6 の局在を ChIP-qPCR によ

って定量した。

4. 生育阻害を示す細胞を再培養すると一部の細胞で生育阻害が回復する

生育阻害が DNA 配列変化に依存するものかを調べるために、*swi6 H321Q*, *H321S* 株において生育阻害を示したコロニーを選択して、再び個体培地に培養し直した。すると約 7 割のコロニーが WT 同い大きさのコロニーであった (図 2-5)。これは生育阻害から回復した細胞があることを示す。このことから生育阻害が DNA 配列変化によるものではない現象だと分かった。

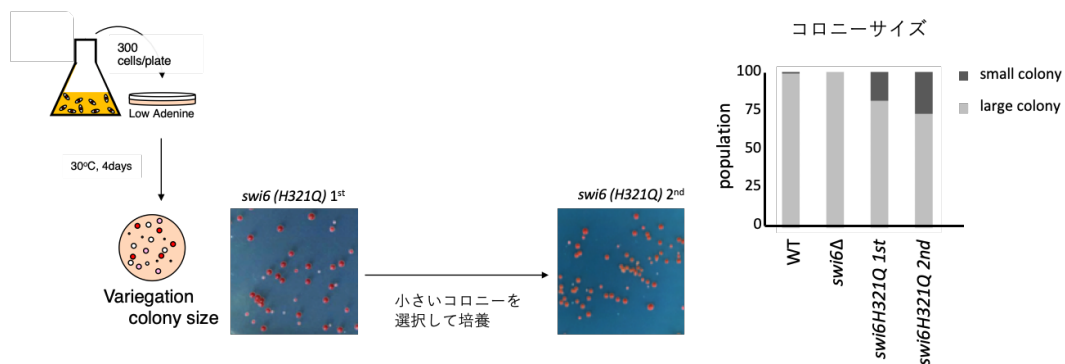


図 2-5 生育阻害を示す細胞を再度培養すると一部の細胞で生育阻害が回復する

swi6 H321Q からコロニーサイズの小さいものを選択して新たに表現型確認した方法を示している。また、大きいコロニーと小さいコロニーの割合をグラフに示している。一部の細胞で生育阻害が回復したのが見られた。

5. h^{+N} *swi6H321Q* 点変異体の細胞の一部は接合型変換を起こしている

ヨウ素による表現型解析の結果から *swi6 H321Q* 株では h^{+N} であるにもかかわらず接合し、胞子を形成している。言い換えると一部の細胞で接合型が P から M に変わっていることが予想される。このことを確かめるために *mat1* の状態を調べた。PCR によって *mat1* に P 型 DNA が入っているか、M 型 DNA が入っているかを調べることができる。*mat1-P*, *mat1-M* に共通する F primer と *mat1-P* 特異的な R primer、*mat1-M* 特異的な R primer で multiplex PCR した。この時、寒天培地から colony-directed PCR を行った。すると、WT, *swi6Δ* では、 h^{+} を維持していた。一方で、*swi6 H321Q* では、一部の細胞で接合型が切り替わっていた (図 2-6A)。なお、この株ではコロニーサイズに関係無く、接合型の切り替えが起きている。

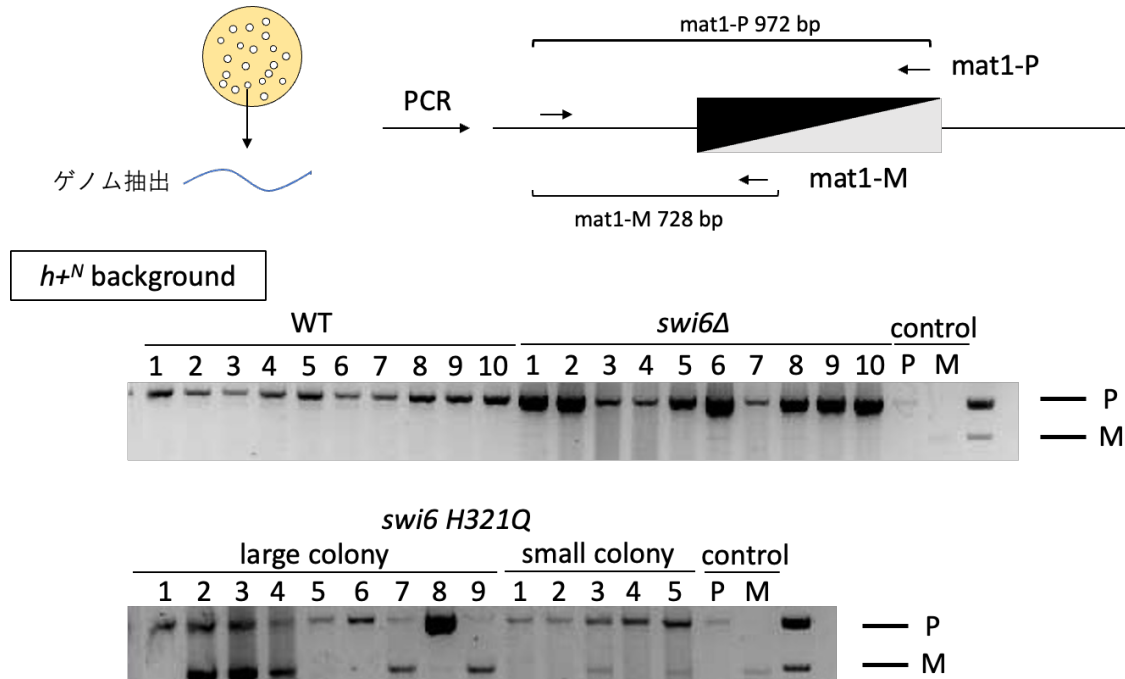


図 2-6A h^{+N} *swi6H321Q* 変異体の細胞の一部は接合型変換を起こしている
 (上段) コロニーダイレクト *mat* PCR のスキームを示している。コロニーから直接ゲノムを抽出した。そのゲノムを鋳型として、P 型と M 型 DNA に共通する配列に相補的な F primer と P 型 DNA カセット特異的 R primer、M 型 DNA カセット特異的 R primer を用いて multiplex PCR を行った。*mat1* に P 型 DNA カセットがあれば 972 bp の PCR 産物が得られ、*mat1* に M 型 DNA カセットがあれば 728 bp の PCR 産物が得られる。(下段) WT (h^{+N}) と *swi6* Δ (h^{+N}) は、 h^{+} を維持していたが、*swi6 H321Q* (h^{+N}) では、一部の細胞で mating-type が切り替わっている。

体細胞分裂のたびに接合型変換が起きる *h90* 株において、*swi6H321Q* 変異体が接合型変換に与える影響を調べるために *h90 swi6H321Q* 株において *mat* PCR を行った。その結果、*swi6H321Q* 株では、*swi6* Δ と同様に M 型細胞の割合が増加しており、P 型細胞から M 型細胞への変換効率が落ちていることを示している。(図 2-6B)。*swi6* Δ において、接合型変換効率が下がることは報告されていた[6]が、これはヘテロクロマチンの崩壊が原因か、Swi6-Swi2 相互作用がなくなったことが原因かはわかっていなかった。近年の報告で、Sw2-Swi6 の相互作用がなくなる *swi2* 変異体において、*swi6* Δ 並みまで接合型変換効率が落ちていることがあきらかになった[54]。このことから、Swi6-Swi2 相互作用が正常な接合型変換には重要であると示唆された。図 2-6B の結果と *h90 swi6H321Q* が *mat* 領域のヘテロクロマチンを維持していること (図 2-4C) はこのことは支持している。

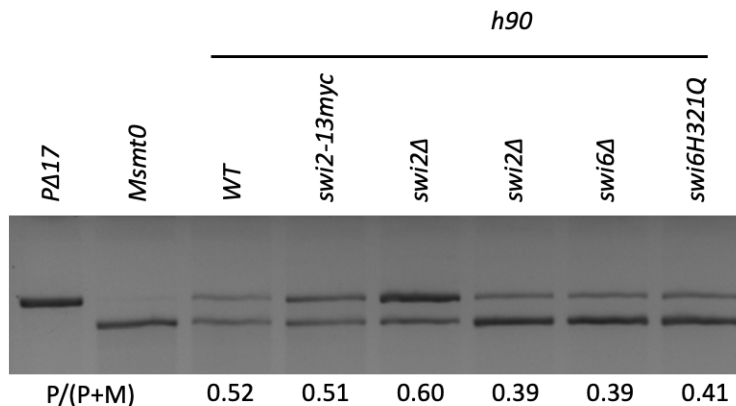


図 2-6B *h90* *swi6H321Q* 変異体における接合型変換の効率の *mat* PCR による解析

h90 のバックグラウンドにおける *swi6H321Q* 変異体の影響を *mat* PCR で調べた。*PΔ17* 株と *Msmt0* 株はどちらも接合型変換に重要な SAS 部位を欠損しており、それぞれ P 型、M 型を維持することが知られている。各レーンの下にバンド強度から P 細胞の割合を計算し、示している。

6. *h90*, *h^S* では生育阻害は起きない

swi6H321Q 変異体作製に用いた *h^N* のバックグラウンド以外でも生育阻害を示すか、調べるために、*h90*, *h^S* のバックグラウンドで *swi6H321Q* 変異体を作製した。すると、*h90*, *h^S* のどちらも生育阻害を示さなかった (図 2-7A)。このことから、*swi6H321Q* の変異導入における生育阻害は *h^N* のバックグラウンド特有のものだと考えられる。

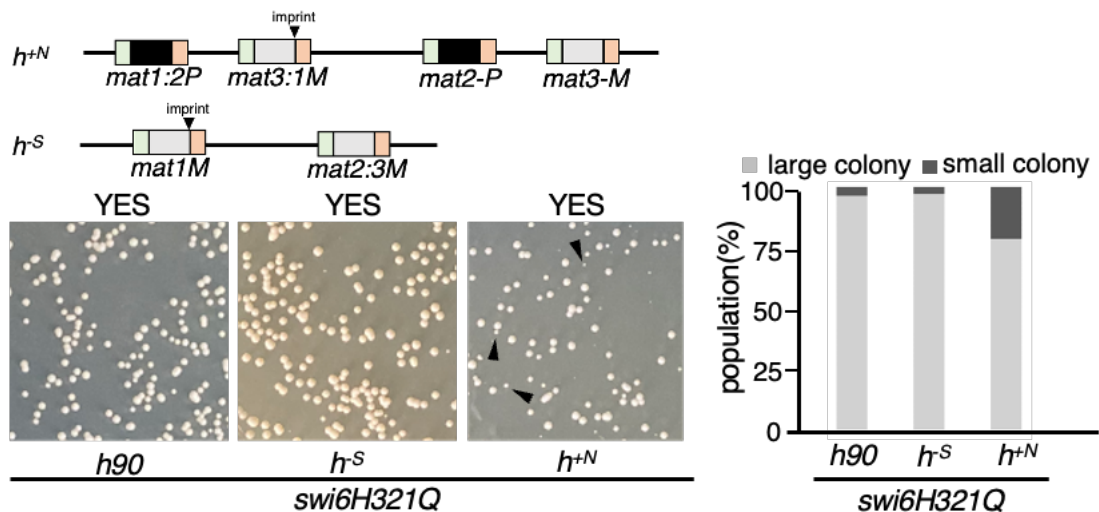


図 2-7A *mat* 構造の違いが生育阻害に与える影響の解析

h90, *h^S*, *h^N* の各バックグラウンドにおける *swi6H321Q* 変異体を YES 培地で培養して生育阻害を示すか観察した。さらに、大きいコロニーと小さいコロニーの割合をグラフに示した。

7. *PΔ17* (*h⁺* SAS1Δ) のバックグラウンドで *swi6H321Q* 変異体は生育阻害を示さない

h⁺ *swi6 H321Q* 変異体では接合型変換のときに一部の細胞で異常な遺伝子変換が起き、そ

の結果、生育阻害を示したのではないかと考えた。そこで、*mat1* 近傍の DSB が生じるインプリト形成に重要な SAS 部位を欠損しており *mat* において遺伝子変換が起きず P 型細胞を維持している、*PΔ17* のバックグラウンドにおいて、*swi6 H321Q* の変異を導入し、生育阻害を示すかを確認した。すると、生育阻害がほとんど見られなくなった (図 2-7B)。このことから、接合型変換の際に起きる異常な遺伝子変換が生育に影響を与えている可能性がある。

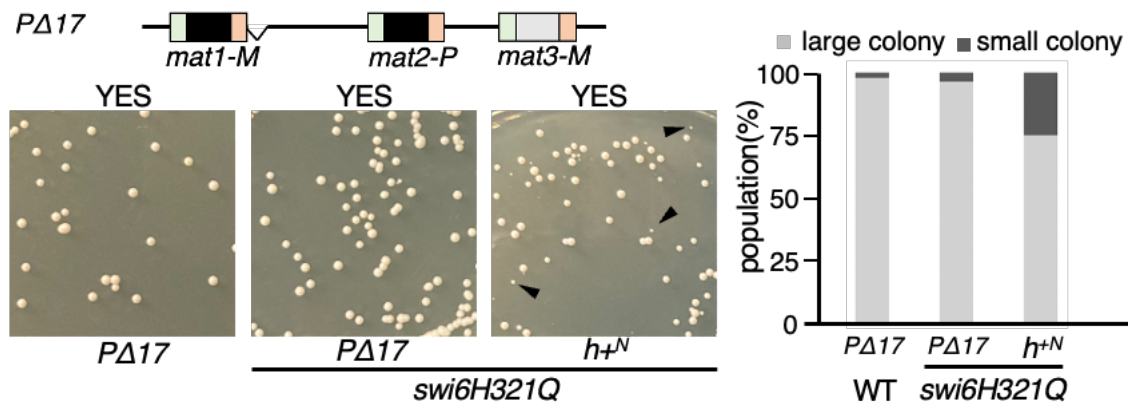


図 2-7B 接合型変換が生育阻害に与える影響の解析

PΔ17 swi6H321Q 変異体が YES 培地で培養して生育阻害を示すか観察した。さらに、大きいコロニーと小さいコロニーの割合をグラフに示した。

生育阻害

8. *swi2* を欠損させた *swi2Δswi6H321Q* は生育阻害を示さない

Swi2 は接合型変換における Rad51 による組換え経路の重要なファクターの一つあり、Swi6 と相互作用することが知られている[6], [50], [54]。

h⁺N swi6H321Q において生育阻害が起こるのは Swi2 と Swi6 の相互作用に変化が起きたからではないかと考え Swi2 と Swi6 の相互作用を Yeast Two Hybrid 法で調べた。Swi6H321Q 変異体は Swi2 との相互作用が弱くなっていた (図 2-8A)。生育阻害が起きるのは Swi2-Swi6 相互作用が弱くなり Swi6 から遊離した Swi2 が原因ではないかと考え、*swi6H321Q* 変異体から *swi2* を欠損した時に生育阻害を示すか調べた。*swi2Δswi6 H321Q* 株は、*swi6 H321Q* 株と比べて生育阻害を示す細胞が顕著に減少した (図 2-8B)。このことから、生育阻害は Swi2 に依存して起きていることがわかった。Swi6 から遊離した Swi2 が生育阻害を引き起こしている可能性がある。

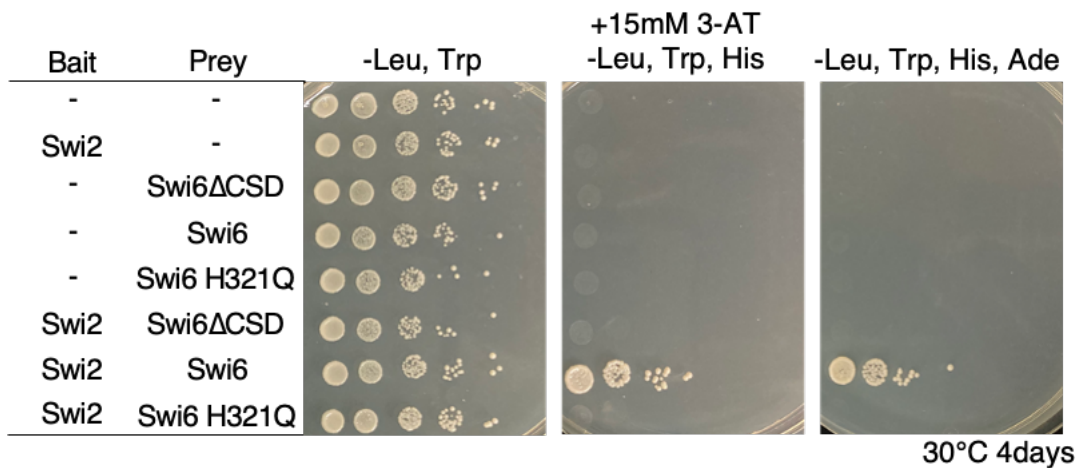


図 2-8A Yeast Two Hybrid 法による Swi2 と Swi6H321Q の相互作用解析

Swi2 と Swi6 H321Q の相互作用を Yeast Two Hybrid 法で調べた。Swi2 と Swi6 は相互作用することが知られているので、SD -Leu, -Trp, -His +15mM 3-amino -1,2,4-triazole (3-AT) プレート、SD -Leu, -Trp, -His, -Ade プレート上でも酵母は生育可能である。

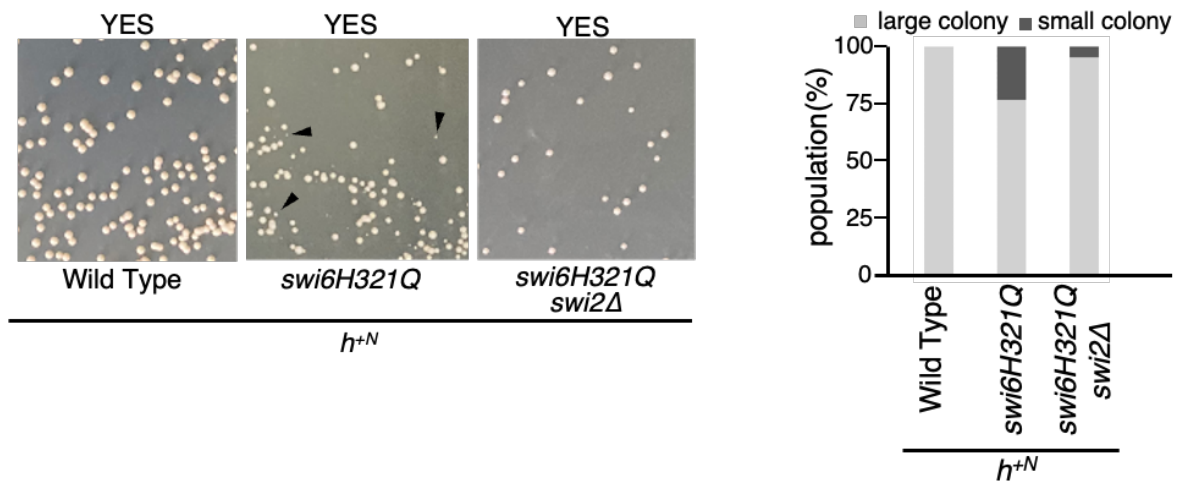


図 2-8B Swi2 が生育阻害に与える影響の解析

h^{+N} *swi2Δswi6H321Q* 変異体が YES 培地で培養して生育阻害を示すか観察した。さらに、大きいコロニーと小さいコロニーの割合をグラフに示した。

9. 生育阻害は Swi2-AT-hook 依存的に起きる

Swi2 は *mat* 領域に局在することが知られている[6], [23], [54]。また、P 型細胞と M 型細胞で *mat* 領域での局在が異なる。Swi2 は AT-hook motif をもち、P 型細胞では AT-hook motif に依存して *SRE3* 領域近傍にのみ局在する[54]。M 型細胞では、AT-hook motif に依存してはじめに *SRE3* に局在し、その後 Swi6 に依存して *mat* 領域全体に局在が広がると考えられている(図 2-9) [6], [54]。

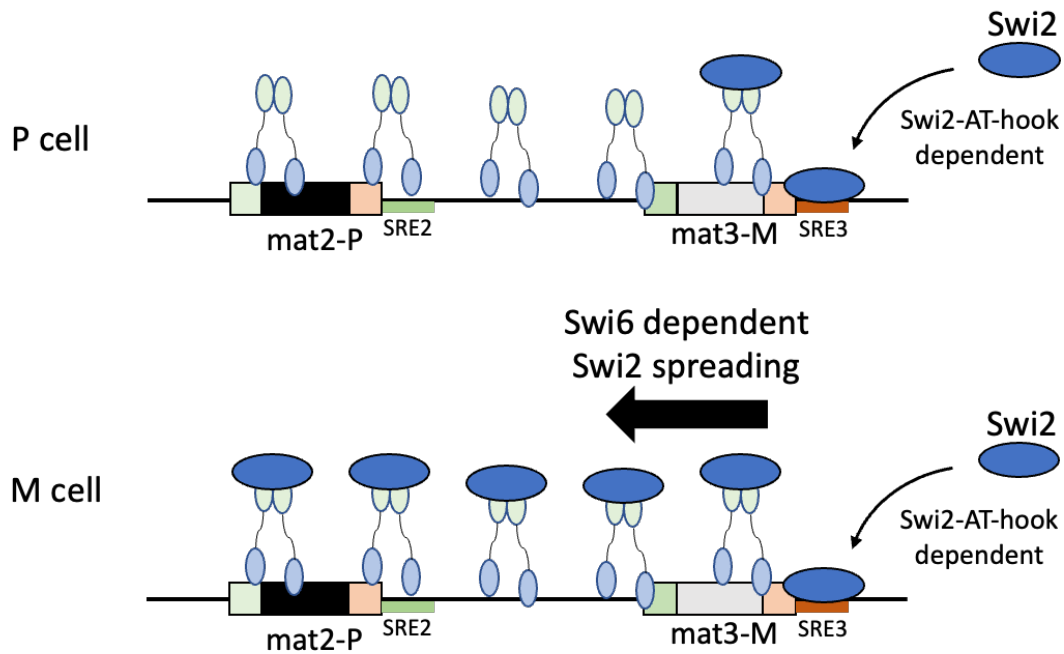


図 2-9 Swi2 の接合型による *mat* 局在の違い

Swi2 の *mat* 局在を模式的に表した。P 細胞では Swi2 は自身の AT-hook motif を介して *SRE3* 近傍に局在が見られる。一方、M 細胞では Swi2 は AT-hook motif を介して *SRE3* に結合し、Swi6 との相互作用を介して *mat* 領域全体に局在を示すと考えられている。

h^{+N} swi6H321Q 変異体では Swi6 と相互作用が弱くなった状態で、Swi2 の AT-hook 依存的な *mat* 領域への結合が生育阻害に関わる可能性が考えられる。

すでに報告のある Swi2 の AT-hook 変異体[54]を用いて、表現型解析を行った。この解析で用いた swi2-AT-12-AA 変異体は、Swi2 に二つある AT-hook にどちらも変異が入っており、*SRE3* に結合できないことが観察されている。 h^{+N} に swi2-AT-12-AA 変異を導入しても生育阻害はみとめられない。また、 h^{+N} swi6H321Q swi2-AT-12-AA 二重変異体では swi6H321Q 変異体に比べて小さいコロニーの割合が減ったことから、生育阻害は Swi2 の AT-hook 依存的に起きていることがわかった (図 2-8C)。

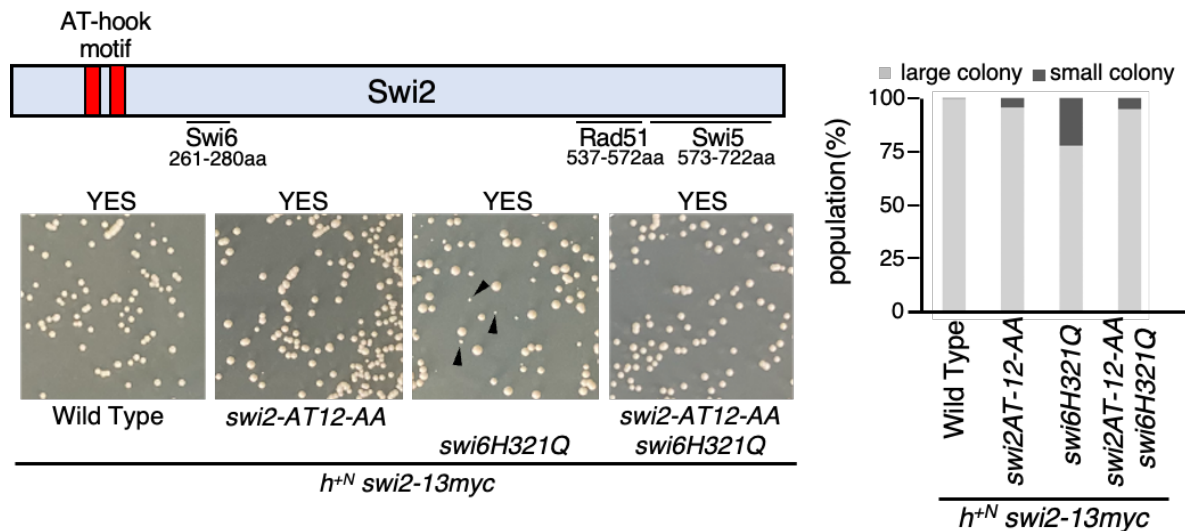


図 2-8C Swi2-AT-hook motif が生育阻害に与える影響の解析

生育阻害における Swi2-AT-hook の影響を調べるために、 h^{+N} swi2AT-12-AA swi6H321Q 二重変異体が YES 培地で培養して生育阻害を示すか観察した。さらに、大きいコロニーと小さいコロニーの割合をグラフに示した。

Swi2 の AT-hook は *in vitro* の実験では SRE2 と SRE3 のどちらにも同等の結合能があることが報告されている[54]。一方、*in vivo* の実験結果からは、Swi2 は SRE2 局在するためには、まず AT-hook 依存的な SRE3 局在が必要で、その後 Swi6 との相互作用によって *mat* 領域に広がり SRE2 に局在する。SRE3 には AT-hook 依存的、Swi6 非依存的な結合能を持つことが報告されている[6], [54]。近年の報告では、SRE2 には Swi6 非依存的な経路でも Swi2 は結合できることが示唆されている[54]。今回の生育阻害は、Swi2 の AT-hook を介した Swi6 非依存的な SRE2,3 結合によるものである可能性がある。

10. Swi6 と相互作用できない Swi2 変異体を h^{+N} に導入すると生育阻害を示す

今までの結果から、 h^{+N} swi6H321Q 変異体で観察される生育阻害は、Swi6 との相互作用を失った Swi2 が関与している事を示している。しかし、Swi6 は様々な因子と相互作用する[61]ので、Swi6 に変異を入れたとき、その変異が Swi2 以外のタンパク質との相互作用にも影響を与える可能性がある。そこで Swi6 と相互作用するタンパク質で共通に見られるモチーフ[59], [62]にアミノ酸置換を導入した swi2-3A 変異体を作成した。予想通り swi2-3A 変異体は Swi6 と Swi2 の相互作用が弱くなった (図 2-10A)。さらに、 h^{+N} swi2-3A 変異体の表現型を調べたところ、swi6H321Q 変異体と同様、生育阻害を示す表現型が観察された (図 2-10B)。

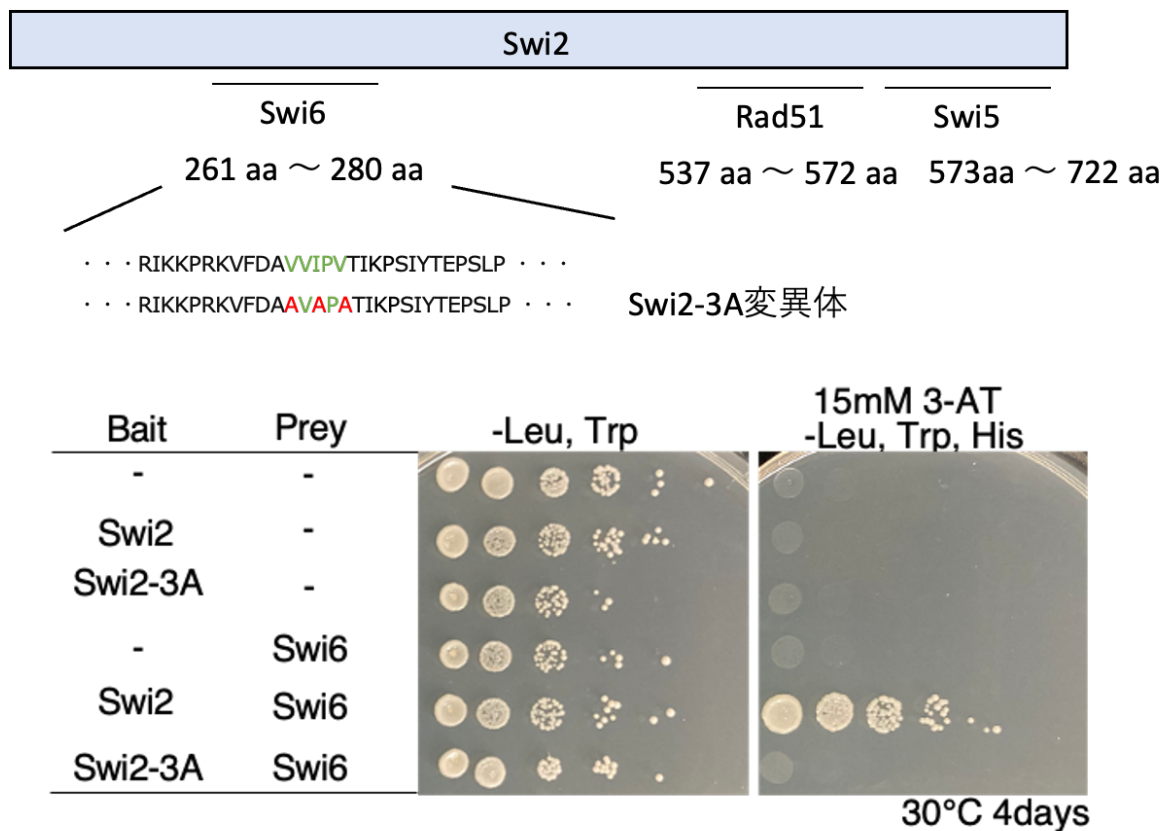


図 2-10A Yeast Two Hybrid 法による Swi2-3A と Swi6 の相互作用解析

Swi6 と相互作用しない Swi2 変異体を作製するために、Swi6CSD と相互作用するタンパク質によく見られる PxVxL モチーフ配列に似た配列に変異を導入した Swi2-3A と Swi6 が相互作用するか Yeast Two Hybrid 法で調べた。

Swi2 は *mat* 領域に局在している。Swi6 と相互作用できない *swi2-3A* 変異体において、*mat* 領域の Swi2 局在を ChIP-qPCR によって調べた (図 2-10C)。Swi2 は AT-hook 依存的に *mat3* 近傍の *SRE3* に局在し[54]、M 細胞において、Swi6 に依存して、*mat* 全域に局在することが知られる (図 2-9) [6]。実際に M 型を維持する *Msm10* 株において Swi2-3A 変異体は、*mat2* 近傍の *SRE2* の局在は減少し、*mat3* 近傍の *SRE3* は野生型 Swi2 と変わらず局在していた (図 2-10C)。

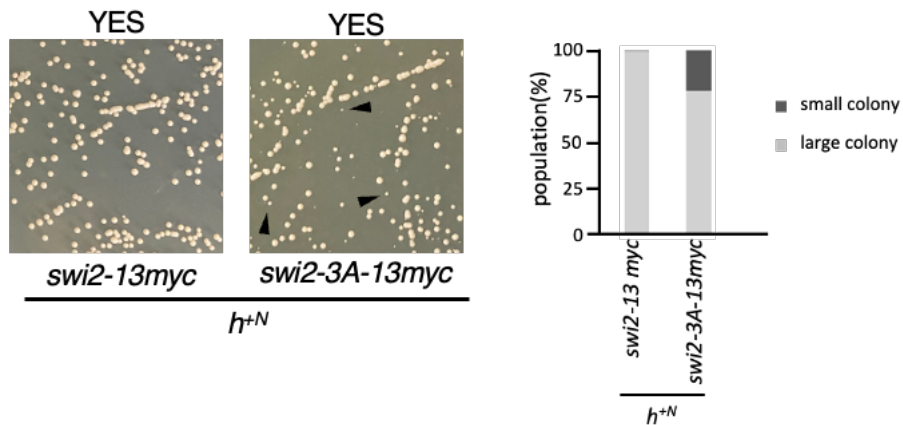


図 2-10B Swi2-Swi6 相互作用が生育阻害に与える影響の解析
生育阻害における Swi2-Swi6 相互作用の影響を調べるために、 h^{+N} *swi2-3A* 変異体が YES 培地で培養して生育阻害を示すか観察した。さらに、大きいコロニーと小さいコロニーの割合をグラフに示した。

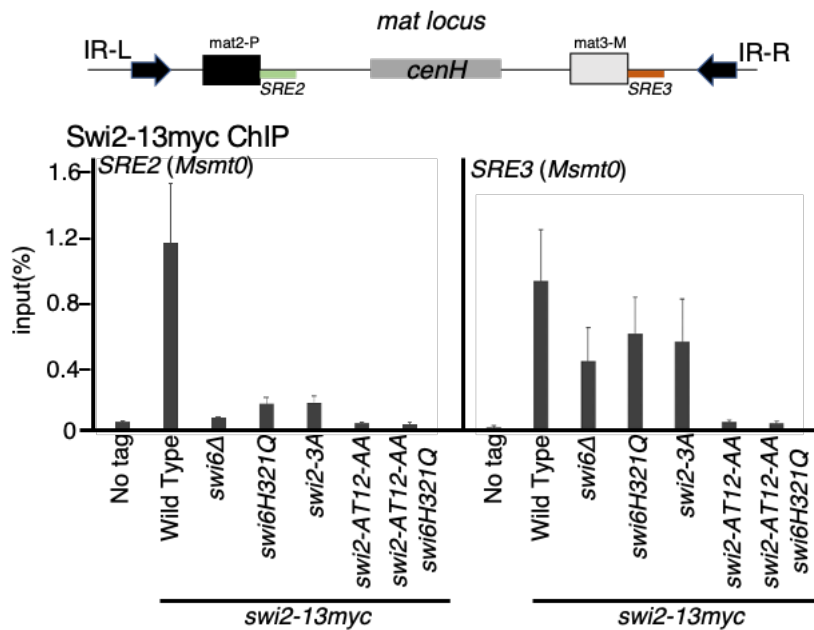


図 2-10C 各変異体における Swi2-13myc 局在の ChIP-qPCR による解析
M 細胞を維持する *Msmt0* のバックグラウンドにおいて、*swi6H321Q* 変異体、*swi2-3A* 変異体、*swi2-AT12-AA* 変異体、*swi2-AT12-AA swi6H321Q* 二重変異体の *mat* 領域における Swi2 局在を ChIP-qPCR で調べた。

接合型変換

1. *swi2-3A* 変異体では接合型変換は起きない

h^{+N} のバックグラウンドの野生株は P 型細胞を安定に維持している。しかし、*swi6H321Q* 変異体では一部の細胞で M 型細胞に接合型が変わっていることが観察できた。*swi6H321Q* 変

異体は Swi6-Swi2 相互作用が弱くなっている。同様に、*swi2-3A* 変異体においても Swi2-Swi6 相互作用は弱くなっている。そこで、*swi2-3A* 変異体においても *swi6H321Q* 変異体と同様に接合型変換が起きているか調べた。分裂酵母をヨウ素で染めることで、接合型変換が起きているかを表現型解析で調べることができる。接合により孢子が形成されるが、孢子はヨウ素処理により黒く染色される。この方法を用いたところ、 h^{+N} *swi2-3A* 変異体では、黒く染まったコロニーは観察されず、全て黄色く染まっていた (図 2-10D)。このことから *swi2-3A* 変異体では接合型変換が起きていないことが示唆された。*mat* PCR によってこれを確かめたところ、 h^{+N} *swi2-3A* 変異体では、接合型変換が起きていないことが確認できた (図 2-10E)。以上のことから、 h^{+N} のバックグラウンドでは、接合型変換は Swi2-Swi6 相互作用に依存せず、*swi6H321Q* 変異体に特有のものであることがわかる。また生育障害が接合型変換のおきない *swi2-3A* 変異体でも観察できることから、生育障害は Swi6 から遊離した Swi2 に引き起こされるが、接合型変換には関与しないことが示唆された。

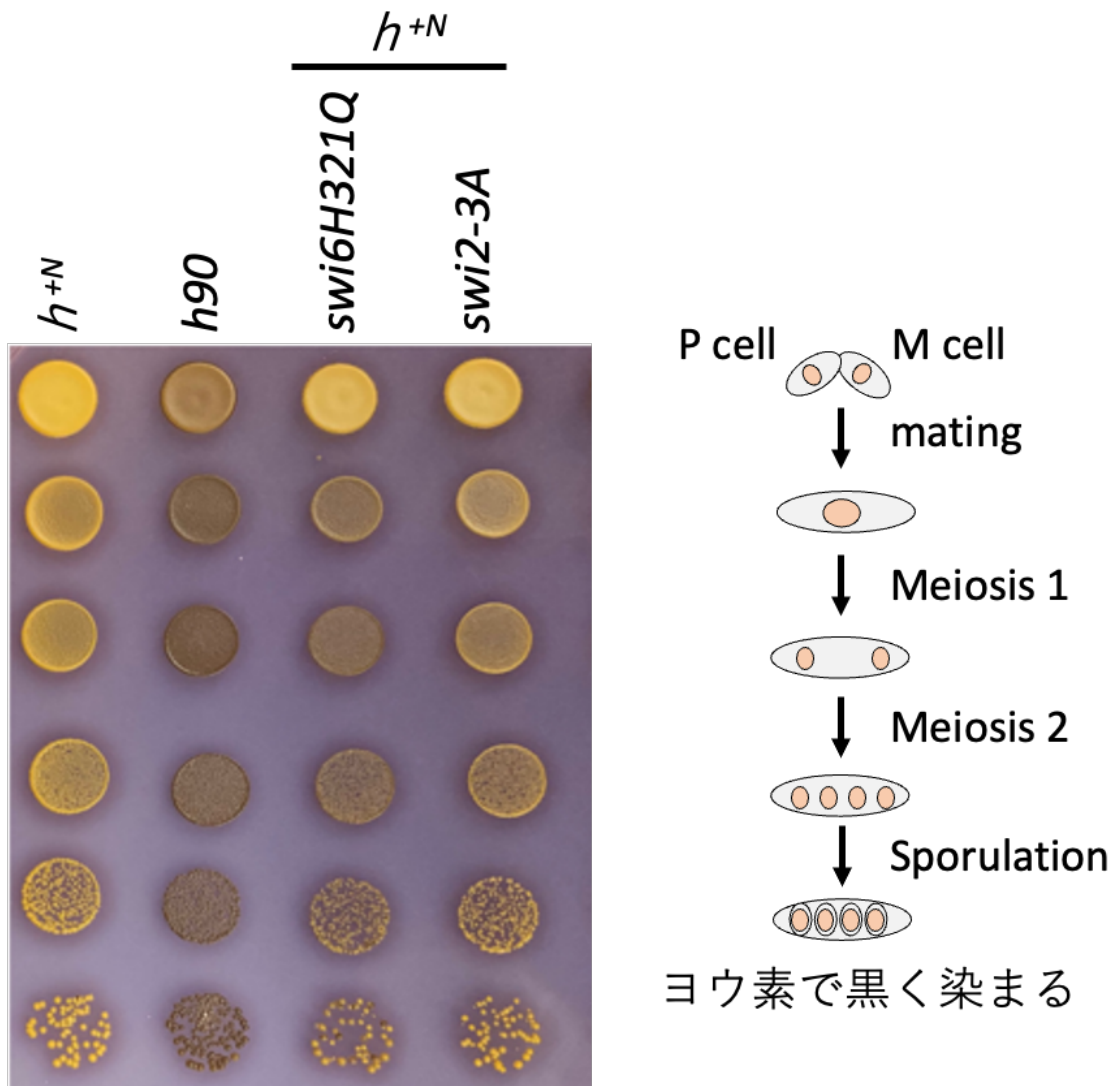


図 2-10D *swi2-3A* 変異体の iodine staining による接合型変換の表現型解析

swi2-3A 変異体が *swi6H321Q* 変異体で見られるような接合型変換が起きているか調べるために、SPAS 固体培地に 25°C で 5 日間培養したのちヨウ素で細胞をそめた。*h90* 株と *h⁺N* 株はコントロールとして同様に培養した。*h90* 株は細胞集団内にほぼ同じ割合で P 型細胞と M 型細胞が存在し、SPAS 培地のような窒素源枯渇下では胞子を形成し、ヨウ素によって均一に黒く染まる。*h⁺N* は P 型細胞のみで細胞集団を構成しているので、窒素源枯渇下でも胞子形成できず、ヨウ素で黄色く染まる。

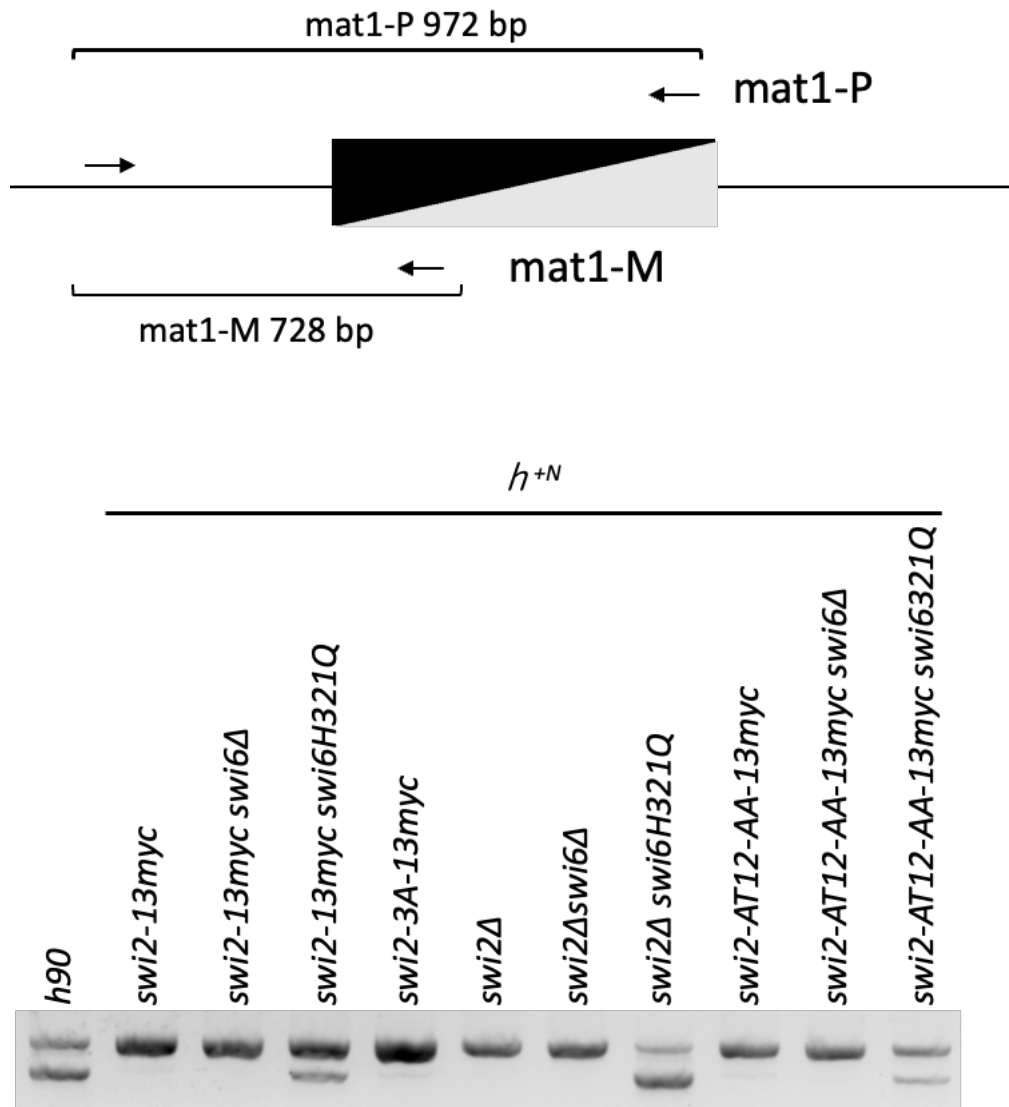


図 2-10E 各変異体における接合型変換の *mat* PCR による解析
h⁺N のバックグラウンドにおいて *swi2* の各変異体と *swi6H321Q* 変異体が接合型変換しているか調べるために *mat* PCR を行った。

12. *h⁺N swi6H321Q* 変異体における接合型変換は Swi2 に依存しない

h⁺N のバックグラウンドにおいて、接合型変換が Swi2-Swi6 相互作用に非依存的に起きるの

で、接合型変換は Swi2 非依存的に起きるのではないかと考えた。そこで h^{+N} swi2 Δ swi6H321Q 二重変異体において、ヨウ素で染めると、一部黒く染まったコロニーが観察できた (図 2-10F)。これは、 h^{+N} swi2 Δ swi6H321Q 株では接合型変換が起きていることを示唆している。mat PCR によってこれを確かめたところ、 h^{+N} swi2 Δ swi6H321Q 株で実際に接合型変換が起きていることが確認でき、この接合型変換には Swi2 が関与しないことが確認できた (図 2-10E)。

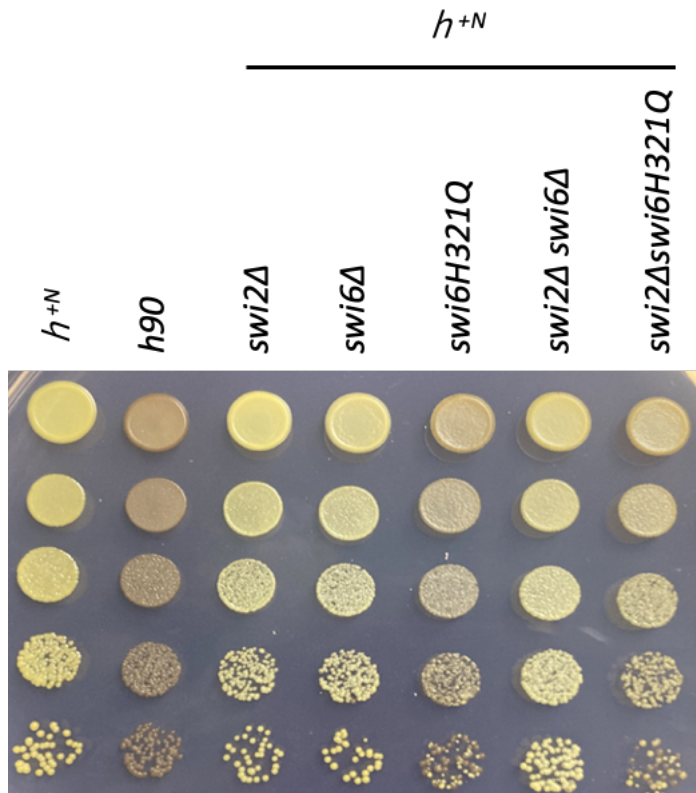


図 2-10F Swi2 が接合型変換にかかわっているか iodine staining による表現型解析
 h^{+N} swi6H321Q 変異体における接合型変換が Swi2 に依存するのか調べるために、swi2 Δ swi6H321Q 二重変異体を SPAS 固体培地に 25°C で 5 日間培養したのちヨウ素で細胞をそめた。 $h90$ 株と h^{+N} 株はコントロールとして同様に培養した。

生育阻害は Swi2 依存的に起きている一方で、接合型変換は Swi2 に非依存的に起きることが確認でき、接合型変換が生育阻害の直接の原因ではないことがわかる。 $P\Delta 17$ swi6H321Q 変異体で生育阻害が起きないことから、生育阻害は遺伝子変換に付随するものであると考えていたが、以上のことから生育阻害と接合型変換が独立に起きていることが示唆された。 $h90$ swi6H321Q 株で生育阻害が見られないこともこれを支持している。

13. h^{+N} swi6H321Q 変異体における接合型変換は Rad57 依存的に起きる

頻繁に接合型変換が起きる $h90$ 株において swi2 を欠損させると、接合型変換の効率は落ちるが[6]、依然として一部の細胞で接合型変換は行われている。これは Swi2 に依存しない接合

型変換の組換えが行われていることを示している。Rad51 による相同組換えの系は Swi2-Swi5、Sfr1-Swi5、Rad57-Rad55 の三つの系が知られている[50]。h90 のバックグラウンドで *swi5* Δ や *rad57* Δ は生育可能であるが、*swi5* Δ *rad57* Δ 二重変異体は致死である[36]。また、接合型変換が起きない、*P* Δ 17 や *Msm10* 株では、*swi5* Δ *rad57* Δ は生育可能である[36]。これは *mat1* 近傍に生じた DSB の修復を介した接合型変換に *rad57* が関わっていることを示唆している。実際 *h90 rad57* Δ は接合型変換の効率が低下している[26]。

Swi6H321Q は Swi2 との相互作用が弱くなっているため、別の組換え酵素が代わりに接合型変換時にリクルートされ、本来 P 型細胞を維持するはずの *h*⁺*N* 株において接合型変換が起きているのではないかと考えた。そこで、*sfr1* 欠損株と、*rad57* 欠損株を作成した。*sfr1* Δ *swi6H321Q* 株では *swi6H321Q* 株と同様に接合型変換が起きていた。一方で *rad57* Δ *swi6H321Q* 株では接合型変換が起こらなくなった (図 2-11A, B)。このことから、*h*⁺*N* *swi6H321Q* 株での接合型変換は Rad57 に依存することが明らかになった。

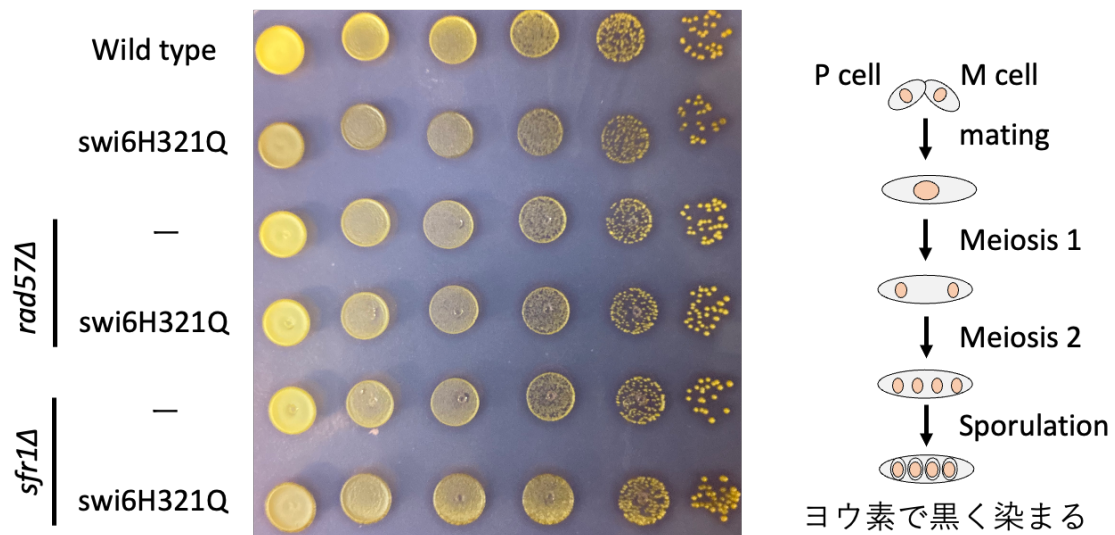


図 2-11A Sfr1 と Rad57 が接合型変換にかかわるか iodine staining による表現型解析
h⁺*N* のバックグラウンドにおいて *sfr1* Δ *swi6H321Q* 二重変異体と *rad57* Δ *swi6H321Q* 二重変異体が接合型変換しているか調べるために、*sfr1* Δ *swi6H321Q* 二重変異体と *rad57* Δ *swi6H321Q* 二重変異体を SPAS 固体培地に 25°C で 5 日間培養したのちヨウ素で細胞をそめた。

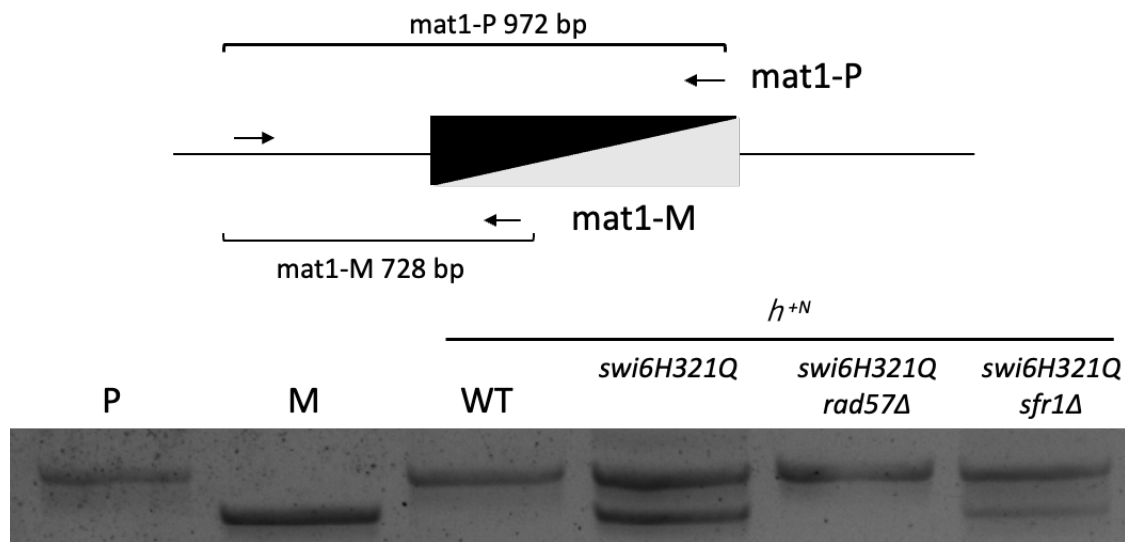


図 2-11B Sfr1 と Rad57 が接合型変換にかかわるか *mat* PCR による解析
 h^{+M} のバックグラウンドにおいて *sfr1* Δ *swi6H321Q* 変異体と *rad57* Δ *swi6H321Q* 変異体が接合型変換しているか調べるために *mat* PCR を行った。P は *P* Δ 17 株、M は *Msm10* 株である。

14. h^{+M} のバックグラウンドにおいて *swi6H321Q* 変異における接合型変換における組換え異常によって h^{+M} 型の *mat* 構造から *h90* 型の *mat* 構造になる

h^{+M} *swi6H321Q* 株において接合型変換が起きているが、その組換えの結果どのような *mat* の構造になっているかを調べるためにサザンブロッティングを行った。サザンブロットにより *mat1* におけるインプリントの検出と *mat* 領域の構造を確かめることができる[24]。分裂酵母のゲノムを HindIII で切断し、*mat1-P/M* を含む 10.4 kb の領域を probe として用いた。その結果、*swi2* Δ , *swi2-AT12-AA*, *sfr1* Δ 株は WT と同じ *mat* 構造をしていることが分かった。一方で、*swi2* Δ *swi6H321Q*, *swi2-AT-AA swi6H321Q*, *sfr1* Δ *swi6H321Q* 株では、多くの細胞で h^{+M} 型の *mat* 構造から *h90* 型の *mat* 構造へと変わっていることが観察できた (図 2-11D)。これは *swi2* Δ *swi6H321Q*, *swi2-AT-AA swi6H321Q*, *sfr1* Δ *swi6H321Q* 株における *mat* PCR や、ヨウ素による表現型の解析の結果と一致している (図 2-23,24,25,27,28,)。また、*rad57* Δ , *rad57* Δ *swi6H321Q* 株ではどちらも h^{+M} WT と同じ *mat* 構造をしていることが分かった (図 2-11E)。このことから、*rad57* Δ *swi6H321Q* 株では、*mat* 領域の異常な組換えが起きておらず、接合型変換も起きないことがわかり、 h^{+M} *swi6H321Q* 株では Rad57 に依存した接合型変換が起きることがさらに確認できた。

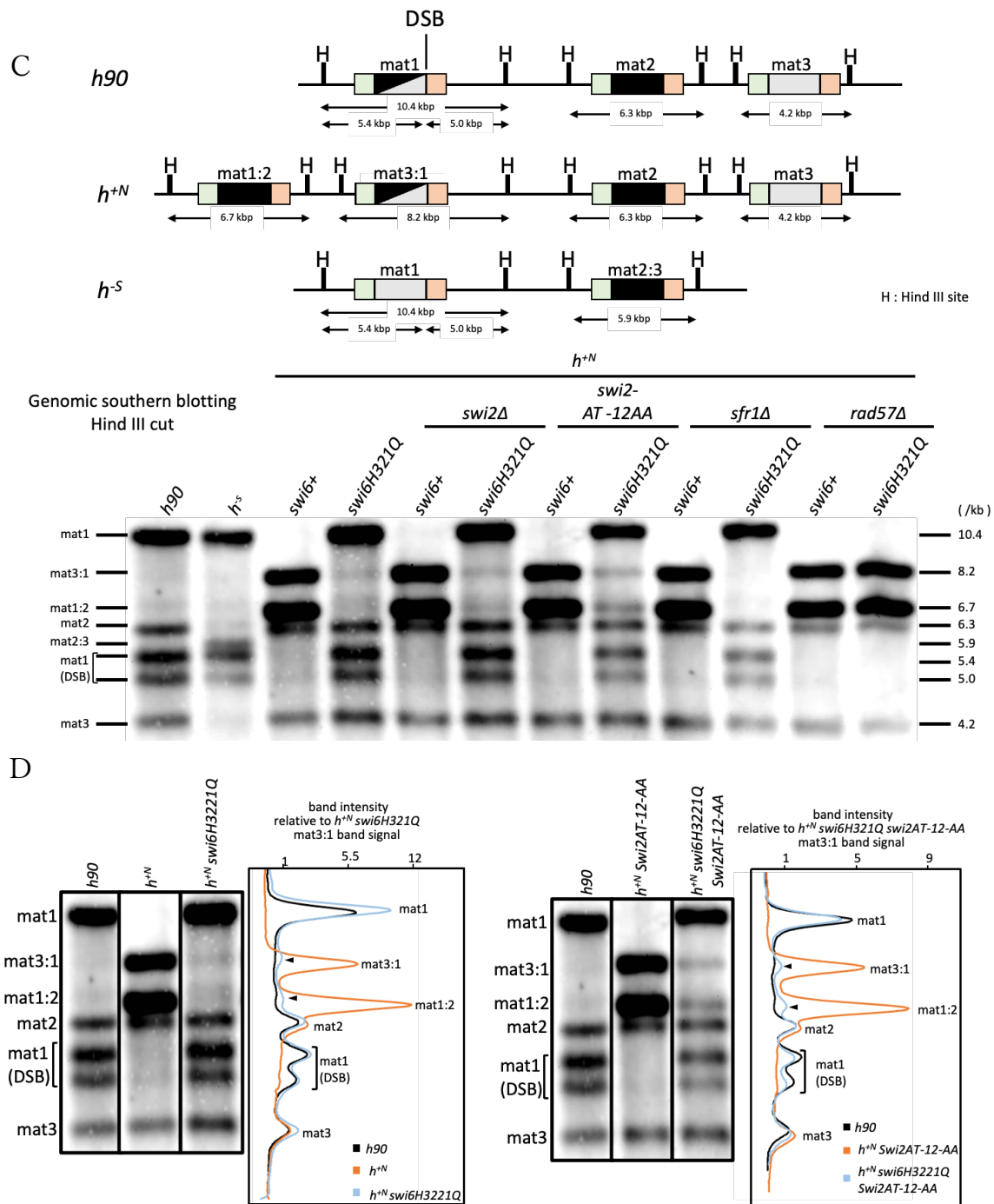


図 2-11D,E 各変異体の *mat* 構造のサザンブロットングによる解析

(C) h^{+N} のバックグラウンドで接合型変換が起きる変異体において、組換えの結果どのような *mat* 構造になっているか調べるためにサザンブロットングを行った。各株のゲノムを Hind III で切断した。プローブとして *mat1* を含む 10.4 kbp 領域を用いた。(C 上段) h^{90} , h^{+N} , h^{-S} の *mat* 構造を模式的に示した。また、Hind III 切断箇所を H で示している。DSB は接合型変換の過程で生じる DNA 二本鎖切断が起きる箇所を示している。(C 下段) 各バンドに対応す

るゲノム領域を泳動写真の左側に示している。*mat1* 領域にインプリントがあると DNA 回収の過程で DNA の二本鎖切断が生じ、10.4 kbp *mat1* 領域が DSB によって 5.4 kbp と 5.0 kbp の二つのフラグメントになる。*mat1*(DSB)はこれを示している。右側には、各バンドに対応する DNA の長さを示している。

(D) *swi6H321Q* 変異体と、*swi2-AT-12-AA swi6H321Q* 変異体の (C) の結果を定量化したものである。各変異体の *mat3:1* を 1 として各バンドの強度をグラフで示した。黒の旗は各変異体において h^{+N} 由来だと考えられるシグナルの箇所を示している。

discussion

1. 生育阻害について

本研究では h^{+N} のバックグラウンドで *swi6H321Q* 変異体や *swi2-3A* 変異体において生育阻害が観察できた。これは Swi2 の AT-hook に依存した現象であることがわかった。しかし Swi2 がどのように AT-hook 依存的に生育阻害を引き起こしているのかは本研究では明確にはできなかった。P 細胞では Swi2 は AT-hook 依存的に *SRE3* に結合し、接合型変換の際にドナーとして *mat3-M* の遺伝子カセットを効率的に用いる。M 細胞では、Swi2 は AT-hook 依存的に *SRE3* に結合する他に、Swi6 との相互作用と Swi2 AT-hook によって *mat* 領域全体と *SRE2* に結合することが示唆されている。*swi6H321Q* 変異体と、正常な AT-hook motif を持つ *swi2-3A* 変異体は、どちらも Swi2-Swi6 相互作用モチーフにアミノ酸置換変異を持つ *swi2-3A* 変異体は、どちらも Swi2-Swi6 相互作用が弱くなっている。ChIP-qPCR の結果から、M 細胞では *SRE2* の Swi2 局在は減っているが、*SRE3* の Swi2 局在はほとんど変わらず、*SRE2* への結合は主として Swi6 との相互作用に依存していることがわかる。生育阻害が起きた h^{+N} のバックグラウンドでは、Swi2 局在はわかっていないが、同じ接合型の *PΔ17* 細胞の過去の報告[54]から、Swi2 は AT-hook 依存的な *SRE3* 局在を示し Swi6 依存的局在はほとんどないと考えられる。*swi6H321Q* 変異体や *swi2-3A* 変異体も Swi2 AT-hook の機能は失われていないので、 h^{+N} 野生型とこれらの変異体では Swi2 局在は変わらないと考えられる。ところが、*swi6H321Q* 変異体や *swi2-3A* 変異体では生育阻害が起きるが、 h^{+N} 野生型では生育阻害が起きない。このことから、*swi6H321Q* 変異株と *swi2-3A* 変異株では、Swi2 が Swi6 と相互作用できなくなり、Swi2-AT-hook 依存的な *SRE3* 局在化によって成長阻害を引き起こしていることを示している。このことは、P 細胞において Swi2-Swi6 相互作用が、Swi2 局在以外にも接合型変換の過程において重要な機能を持つことを示唆している。Swi2 は接合型変換の際に Rad51 をドナーまで誘導する機能を持つことが提案されている[9]。P 細胞では Swi6 が Swi2 の拡散を防いでいるのかもしれない。*swi6H321Q* 変異体や *swi2-3A* 変異体において、Swi6 と相互作用できなくなると Swi2 が拡散し、Swi2-AT-hook 依存的な *SRE3* 局在することで正常な位置に Ras51 をリクルートできなくなり、生育阻害を起こすのかもしれない。

2. Swi6 から遊離した Swi2 がゲノムワイドに機能するわけではない

Swi2-Swi5 複合体は相同組換えに関わっている[50], [54]。そのため、 h^{+N} のバックグラウンドで *swi6H321Q* 変異体や *swi2-3A* 変異体において、生育阻害が生じるのは Swi6 と相互作用できなくなった Swi2 が *mat* 領域以外で機能した結果と考えることもできる。しかし、*PΔ17* や *h90* のバックグラウンドでは生育阻害が起きないことを考えると、そうではないことがわかる。*PΔ17 swi6H321Q* や *h90 swi6H321Q* でも Swi2 と Swi6 の相互作用が弱くなっていると考えられるが、もしゲノムワイドで Swi2 が機能して生育阻害を示すなら、*PΔ17* や *h90* では生育阻害でも生育阻害を示すはずであるが、それは観察できなかった。また、Swi2 は *mat* 領域特異的に機能することが報告されており[50], [55]、このことから、生育阻害が *mat* 領域での接合型変換に関連していることを示している。

3. h^{+N} でのみ生育阻害が起きる理由

swi6H321Q 変異体は株のバックグラウンドによって表現型が異なった。生育阻害の表現型を示したのは、 h^{+N} のバックグラウンドのみであった。接合型変換が頻繁に起きる *h90* 株、接合型を *h*-で維持する h^S 株、 h^{+N} と同じ接合型 *h*+であるが、*mat1* 近傍に DSB ができない *PΔ17* 株では生育阻害が起きなかった。 h^{+N} *swi6H321Q* で観察された生育阻害は Swi2 に依存したものであった。Swi2 は接合型によって *mat* 領域における局在が異なる。 h^{+N} と *PΔ17* は同じ接

合型であるので、Swi2 の *mat* 局在は基本的に変わらないと考えられる。ただし、*mat* 構造が大きく異なるので、*mat* 構造の違いが h^{+N} のバックグラウンドだけで生育阻害が観察される要因かもしれない。そこでこの点について以下さらに考察していく。

h^{+N} は遺伝子重複が起きた結果 *mat* 領域が *h90* や h^S よりも大きい。 h^{+N} では *mat1:2* から *mat3* まで約 40 kbp あるが、*h90* では *mat1* から *mat3* まで約 30 kbp、 h^S では *mat1* から *mat2:3* まで約 17kbp しかない (図 1-6)。接合型変換ではドナー選択の際にドナーとレシピエントのゲノムの 3 次元的な近さが重要であることが示唆されている[6]。 h^{+N} のバックグラウンドでは *mat* 領域が大きいことで、ゲノムの 3 次元的な構造が *h90* や h^S とは大きく異なるのかもしれない。Swi2-Swi5 は *in vitro* で液滴を形成することが知られている[54]。また、Swi6 も液滴を形成することが知られている[63]。*mat* の 3 次元的構造がこれらの液滴形成に影響を与えているかもしれない。これにより局所的な Swi2-Swi5 の濃縮もしくは拡散を促し、Rad51 の Swi2 によるリクルートメント異常が *swi6H321Q* 変異体や *swi2-3A* 変異体で生育阻害がおこしているかもしれない。Swi2 や Swi6 の変異体における Swi2-Swi5-Swi6 の液滴形成能と Hi-C などによってゲノムの立体構造を調べることでこの問題を解決できる可能性がある。

また、 h^{+N} では、*mat1* の領域に *mat2-mat3* の領域が重複してできたようなゲノム構造なので、Swi2 が AT-hook に依存して結合する *SRE2* や *SRE3* が複数存在するはずである。*swi6H321Q* 変異体でみられる生育阻害は Swi2 の AT-hook に依存して起きていた。一方、Swi6 と相互作用できない状態の Swi2 が複数ある *SRE2* や *SRE3* に結合したことによるのかもしれない。これも *swi6H321Q* 変異体や *swi2-3A* 変異体が h^{+N} のバックグラウンドでのみ生育阻害を起こした原因かもしれない。*SRE2* や *SRE3* の欠損株は *h90* のバックグラウンドでは作製されているものの h^{+N} では作製されていない。 h^{+N} のバックグラウンドでも *SRE2,3* 欠損株を作製することでこのことを検証することができると考えられる。

4. colony variegation

本研究から、*swi6H321Q* 変異体において、一部のコロニーで small colony が観察できた。さらに、その small colony を再び培養して、寒天培地に撒くと、small colony と large colony が両方観察できた (図 2-5)。*mat1* 近傍に DSB が生じるのは、ゲノムにインプリントが入っている細胞だけである。インプリントをもつ細胞は複製の過程で DSB が生じる。*swi6H321Q* 変異体で大きいコロニーと小さいコロニーが混合していたが、Swi2 の AT hook 依存的 *SRE3* 結合とインプリントを持つ細胞に生育阻害がおきたかもしれない。

接合型変換関連因子は機能ごとにクラス分けされている。その中で、インプリント形成に重要な因子群は class1a に属している。class1a 因子群の変異体はインプリント形成が全く起きず DSB も形成されない。この中には複製に関連する因子が含まれている。*swi6* は class 1b に該当し、これは、*mat1* のインプリント形成には必要ないが、効率的な接合型変換に重要な因子群である。しかし、Swi6 も複製に関わることがわかっている[64], [65]。もしかすると、Swi6 もインプリント形成に関わっているかもしれない。Swi7(pol α)は岡崎フラグメントの RNA プライマー合成を行うが、インプリント形成にも関与している。Swi6 は Swi7 と相互作用すること報告されている[66]。このことも、Swi6 がインプリント形成に関与する可能性を高めている。もしかすると、*swi6H321Q* 変異体では、インプリント形成異常が生じ、インプリント形成部位が細胞に DNA 損傷として認識され、その時、AT-hook に依存して Swi2 が重複してゲノム上に存在することで、損傷修復に影響が出て生育阻害が生じているのかもしれない。

5. 遺伝子変換

本研究から h^{+N} *swi6H321Q* 変異体で異常な接合型変換が起きたのは Rad57 によるものであることがわかった。さらに、 h^{+N} *swi6H321Q* 変異体において Rad57 が遺伝子変換にかかわると h^{+N} 型の *mat* 構造から *h90* 型の *mat* 構造に変わりやすくなることが分かった (図 3)。*h90 rad57 Δ* では接合型変換の効率が落ちるだけではなく、*h90* から h^{+N} 型の *mat* 構造に変わりやすくなるという報告があり[26]、Rad57 も接合型変換に関わることが示唆されている。接合型変換において Rad57 は Rad51、Rad55、ミスマッチ修復タンパク質 Swi8 とともに機能していると考えられている。これはそれらの変異体においても *mat* 構造が h^{+N} 型に変わりやすいからである[1], [36], [67]。Rad51 はドナーとレシピエントの H1 ホモロジー領域のアニーリングを助け、DNA 鎖の invasion を促進し、D-loop 中間体を形成する。この初期に形成された d-loop 中間体を Rad57-Rad55、Swi8 が安定化しているのではないかと考えられている[36], [67]。本研究の結果を踏まえると、Rad57 や Rad57 とともに機能するタンパク質がかかわる組換えでは、その組換え産物が *h90* 型の *mat* 構造なのかもしれない。本研究では h^{+N} *swi6H321Q* 変異体で異常な接合型変換は Swi2 非依存的であった。また、*h90 swi2 Δ* においても *h90 rad57 Δ* で見られるような DNA の再配列は報告されていない。接合型変換における Rad57-Rad55-Rad51 と Swi2-Swi5-Rad51 との機能の違いや使い分けは依然として分かっていないが、本研究はこの点に新しい視点を与えるものである。

Swi6 は HP1 ホモログである。哺乳類の HP1 アイソフォームの HP1 β や HP1 γ は DNA 損傷修復に対し積極的な機能を持つことが示唆されている[68], [69], [70], [71], [72], [73]。例えば、HP1 γ は BARD1 と相互作用することが知られる[71], [72]。BRAD1 はがん抑制因子である BRCA1 と複合体を形成し、DSB 修復に重要な役割を果たしている[74]。Swi6 の DSB 修復に関わる機能はほとんど報告されていないが、分裂酵母においても HP1 ホモログ Swi6 は DSB 修復に関わる機能を持つかもしれない。

Swi6 は複製開始因子である Sld3 をペリセントロメア領域と *mat* 領域の複製開始点ヘリクルートし、S 期初期に複製を開始するのに重要であることがわかっている[64], [65]。分裂酵母で保存されている Dfp1/Dfp4 依存性キナーゼ Cdc7 の Hsk1 と Dfp1 は Swi6 と相互作用して、Sld3 をリクルートする。接合型変換は、複製を伴うプロセスであることを考えると *swi6H321Q* 変異体で遺伝子変換に異常が生じるのは、この Swi6 による複製過程に異常が生じていることに起因している可能性もある。

6. Swi6 のパートナータンパク質の時空間制御

HP1 タンパク質はホモ二量体を形成し、その二量体界面上の窪みで、PxVxL コンセンサス配列を持つ様々なタンパク質と相互作用し[59], [60]、プラットフォームとして機能する。分裂酵母では、Chp2 と Swi6 の二つの HP1 ホモログがある。Chp2 は Clr3、Mit1 のような PxVxL like motif を持つサイレンシングエフェクターと相互作用する[75], [76]。Swi6 は Epe1 などのサイレンシングエフェクター[61], [77], [78], [79], [80], [81]の他に Sgo1[82]や Swi2[50], [54]などの非サイレンシングエフェクターとも相互作用する。

Swi6 には様々なタンパク質が相互作用できるが、その時空間的な制御機構についてはわかっていないことも多い。Swi6 はヘテロクロマチンが形成されているペリセントロメア、*mat* 領域、サブテロメアに局在する。一方、Swi2 は Swi6 と相互作用できるが、*mat* 領域にのみに局在は観察されている[55]。どのように、Swi2 の局在が *mat* 領域のみに限られているのかはわかっていない。おそらく、Swi2 のゲノム局在には Swi6 との PxVxL like motif を介した相互作用[54]のほかに Swi2 の持つ AT-hook motif が重要で、これによって、*mat* 領域にのみに局在が限られているのかもしれない。

Swi6 はまた、Spt16 と CSD を介して相互作用することが報告されている[83]。しかし、Spt16 は PxVxL like motif を持たず、Swi6 の二量体界面上の窪みではなく、CSD の β 1 シートと β 2 シートを繋ぐ荷電ループと相互作用することが報告されている[83]。

Swi6CSD の外殻を囲う β -sheet は PxVxL motif との相互作用部位に次ぐ、第二の相互作用部位でエフェクタータンパク質の結合特異性を切り替える部位である可能性が指摘された[84]。本研究で変異を導入した Swi6E280, T278K, Y290, I298, H300 のアミノ酸残基はこの β -sheet 上にある。しかし、swi6E280, I298, H300 変異体は遺伝子サイレンシングや生育に影響を与えなかった。これらの残基はエフェクタータンパク質との結合特異性に影響を与えないかもしれない。一方、swi6T278K, Y290 変異体はどちらも、遺伝子サイレンシングと生育の両方に影響があった。Swi6T278 はすでにサイレンシング因子 Epe1 や RNA プロセッシングや RNA 分解に関わるリクソソーム系のタンパク質との相互作用に重要であることが報告されている[84]。Swi6Y290 もこれらのタンパク質との相互作用に重要かもしれない。

swi6CSD 変異体において、swi6H321Q 変異体はヘテロクロマチンに影響は与えないが Swi2 との相互作用が弱くなる CSD 変異体であった。これは、Swi6H321Q が Swi2 との相互作用のみが弱くなり、サイレンシングエフェクター分子との相互作用は変わっていない可能性を示している。また、Swi6H321Q は β -sheet ではなく PxVxL motif 認識部位にあるアミノ酸残基である。このことから、PxVxL motif 結合部位にもエフェクタータンパク質の選択性が存在している可能性があり、特に H321 は接合型変換に関わる因子との相互作用に重要かもしれない。例えば、Swi6 のプロテオミクス解析から、接合型変換に必須の因子である Rad54 と Swi6 は相互作用することが報告されている[61]。また、Rad54 は Rad51 と相互作用することが知られており[85]、*in vitro* では Swi2-Swi5 とは独立に Rad51 の DNA の鎖交換反応を促進することが報告されている[54]。Swi2 と相互作用しなくなった代わりに Rad54 との相互作用が強まり、相同組換え時に Rad51 による DNA の鎖交換反応に影響を与え、正常な D-loop 形成がうまくいかず、異常な相同組換えを起こすようになったかもしれない。翻訳後修飾、細胞周期や結合パートナータンパク質の量に応じて、HP1/Swi6 は結合するタンパク質を変え、細胞が環境に応答するのを助けている可能性を示している。

結言

細胞集団に異なる接合型の細胞がほぼ同数存在する *h90* 株から、細胞集団内にどちらか一方の接合型しか存在しない h^{+N} や h^S 株が生じるメカニズムはよくわかっていない。*h90* のような homothallic strain は栄養枯渇化において異なる接合型の細胞と接合し胞子を形成する。その後、減数分裂を経るので、*h90* 株は遺伝子組合せの多様化を介して進化の原動力となりうる。一方、 h^{+N} 株や h^S 株のような heterothallic strain は栄養飢餓状態において、細胞集団内に異なる接合型の細胞が存在しないことから、接合できず、G0 期に入る。胞子は栄養豊富な状態になると、発芽したのちに元の生活環に戻るが、G0 期に入った細胞は胞子を形成した細胞より早く元の生活環に戻り増殖する。また、栄養源枯渇状態が続いた時には heterothallic strain は homothallic strain より生存率が高い[48]。どちらの細胞も進化・増殖において利点があり、環境適応や長期生存のために使い分けられているのかもしれない。

もしかすると偶発的に、*h90* 株から h^{+N} 株や h^S 株が生じるのではなく、分裂酵母には heterothallic strain から homothallic strain をうむメカニズムが備わっているのかもしれない。本研究では、 h^{+N} swi6H321Q 変異体において接合型変換に異常を示すメカニズムに Rad57 が関わっていることがわかった。*h90* では接合型変換において主に Swi2-Swi5-Rad57 による経路を用いて行われている。しかし、Rad55-Rad57-Rad51 による経路による *mat1* 近傍の DSB 修復が行われることもあり、この時稀に *h90* から h^{+N} や h^S が生じるのかもしれない。これ

は、 $h90$ から h^{+N} 株や h^S 株が生じるメカニズムに新たな視点を与えるものだと考える。

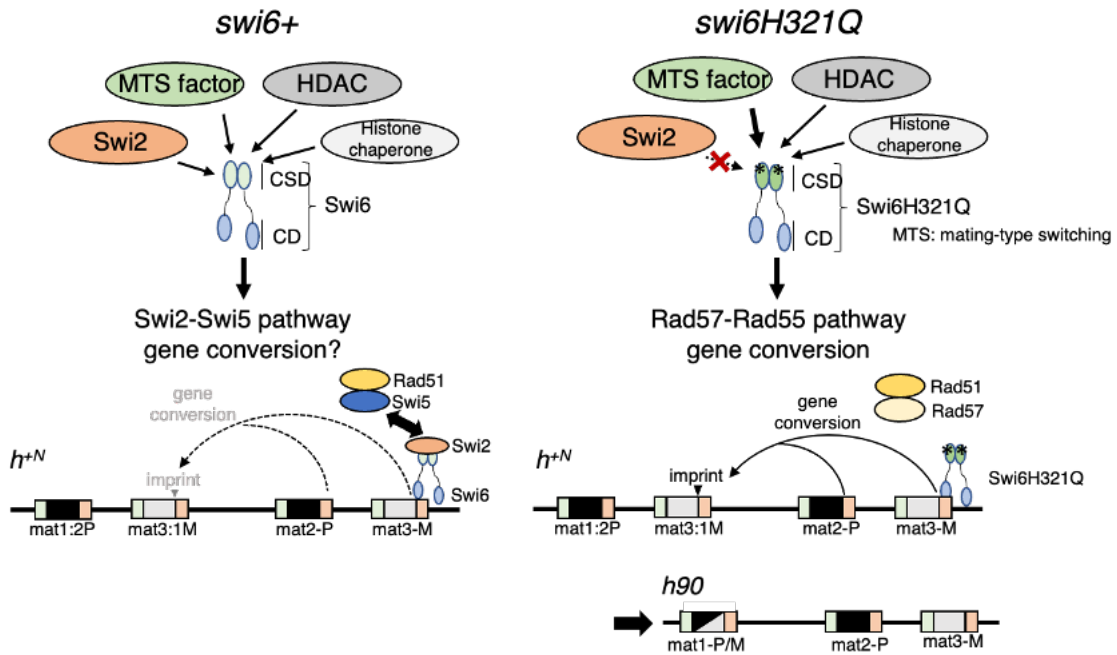


図 3. Rad57 を介した遺伝子再編成のモデル図

材料と方法

分裂酵母リスト

FY2002	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺</i>
TFY2	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi6Δ::NatMX</i>
TFY4	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi6 (H321A)::KanMX6</i>
TFY5	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi6 (T278R)::KanMX6</i>
TFY6	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi6 (E280V)::KanMX6</i>
TFY7	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi6 (E280G)::KanMX6</i>
TFY8	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi6 (E280P)::KanMX6</i>
TFY9	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi6 (Y290N)::KanMX6</i>
TFY10	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi6 (Y290F)::KanMX6</i>
TFY11	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi6 (Y290C)::KanMX6</i>
TFY12	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi6 (Y290D)::KanMX6</i>
TFY13	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi6 (I298V)::KanMX6</i>
TFY15	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi6 (H300G)::KanMX6</i>
TFY16	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi6 (H300Y)::KanMX6</i>
TFY17	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi6 (H300F)::KanMX6</i>
TFY18	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi6 (H321Q)::KanMX6</i>
TFY19	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi6 (H321S)::KanMX6</i>
TFY20	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi6 (H321L)::KanMX6</i>
TFY21	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi6 (I298P)::KanMX6</i>
TFY22	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi6 (I298R)::KanMX6</i>
TFY23	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi6 (I298M)::KanMX6</i>
TFY43	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi6 (T278K)::KanMX6</i>
TFY24	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi2Δ::HphMX6</i>
TFY25	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi2Δ::HphMX6 swi6Δ::NatMX6</i>
TFY26	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi6 (H321Q)::KanMX6 swi2Δ::HphMX6</i>
TFY41	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi2-13myc::HphMX6</i>
TFY42	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi2-13myc::HphMX6 swi6Δ::NatMX6</i>
TFY28	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi2-13myc::HphMX6 swi6 (H321Q)::KanMX6</i>
TFY29	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi2-3A-13myc::HphMX6</i>
TFY30	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi2-AT-12-AA-13myc::HphMX6</i>
TFY32	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi2-AT-12-AA-13myc::HphMX6 swi6H321Q::KanMX6</i>
TFY33	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ rad57Δ::NatMX6</i>
TFY35	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ rad57Δ::NatMX6 swi6H321Q::KanMX6</i>
TFY37	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ sfr1Δ::NatMX6</i>
TFY39	<i>h⁺N ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ sfr1Δ::NatMX6 swi6H321Q::KanMX6</i>
PB09	<i>h⁺ mat1P Δ17::Leu2 ura4-D18, leu1-32</i>
TFY65	<i>h⁺ mat1P Δ17::Leu2 ura4-D18, leu1-32 swi6 (H321Q)::KanMX6</i>
TFY68	<i>h^S ade6-DN/N leu1-32 ura-4-DS/E imr 1L::ura4⁺ otr1R::ade6⁺ swi6H321Q::KanMX6</i>
SS-771	<i>h90 Kint2::ura4 ade6-M210 his2 leu1-32 ura4DS/E</i>
KS386	<i>h90 Kint2::ura4 ade6-M210 his2 leu1-32 ura4DS/E swi6Δ::HphMX6</i>
TFY81	<i>h90 Kint2::ura4 ade6-M210 his2 leu1-32 ura4DS/E swi6 (H321Q)::KanMX6</i>
HKV106	<i>h90 ade6-m210 leu1-32 ura4-D18</i>
TFY125	<i>h90 ade6-m210 leu1-32 ura4-D18 swi2-13myc::HphMX6</i>
TFY126	<i>h90 ade6-m210 leu1-32 ura4-D18 swi2Δ::kanMX6 (P bias)</i>
TFY127	<i>h90 ade6-m210 leu1-32 ura4-D18 swi2Δ::kanMX6 (M bias)</i>
TFY128	<i>h90 ade6-m210 leu1-32 ura4-D18 swi6Δ::NatMX</i>
TFY129	<i>h90 ade6-m210 leu1-32 ura4-D18 swi6H321Q::KanMX6</i>
TM100	<i>h⁻ mat1Msm10 leu1-32 ade6M216 ura4⁻ leu2⁺</i>
TFY153	<i>h⁻ mat1Msm10 leu1-32 ade6M216 ura4⁻ leu2⁺ swi2-13myc::HphMX6</i>
TFY154	<i>h⁻ mat1Msm10 leu1-32 ade6M216 ura4⁻ leu2⁺ swi2-13myc::HphMX6 swi6Δ::NatMX6</i>
TFY155	<i>h⁻ mat1Msm10 leu1-32 ade6M216 ura4⁻ leu2⁺ swi2-13myc::HphMX6 swi6H321Q::KanMX6</i>
TFY188	<i>h⁻ mat1Msm10 leu1-32 ade6M216 ura4⁻ leu2⁺ swi2-3A-13myc::HphMX6</i>
TFY213	<i>h⁻ mat1Msm10 leu1-32 ade6M216 ura4⁻ leu2⁺ swi2-AT-12-AA-13myc::HphMX6</i>
TFY215	<i>h⁻ mat1Msm10 leu1-32 ade6M216 ura4⁻ leu2⁺ swi2-AT-12-AA-13myc::HphMX6 swi6H321Q::KanMX6</i>

プライマーリスト

21	TCAGCAGTCCTTGGGAAATG	<i>dg</i>	ChIP
22	GATGCCCATGTTTCATTCCAC	<i>dg</i>	ChIP
25	TTAGTATATGCCCCTGCTCG	<i>ade6⁺</i>	ChIP, RT
26	AAATGGTCTCACCATCTTGC	<i>ade6⁺</i>	ChIP, RT
27	CTACTGCATTGCCAATGCC	<i>adh1⁺</i>	ChIP
28	CCGACCTTGGATTCTTC	<i>adh1⁺</i>	ChIP
31	TGCCGATCGTATGCAAAAGG	<i>act1⁺</i>	RT
32	AAATGGTCTCACCATCTTGC	<i>act1⁺</i>	RT
MT1	AGAAGAGAGAGTAGTTGAAG	<i>mat1</i>	matPCR
MP1	ACGGTAGTCATCGGTCTTCC	<i>mat1-P</i>	matPCR
MM1	TACGTTTCAGTAGACGTAGTG	<i>mat1-M</i>	matPCR
95	CGCAGACATTGGAAATACCGTC	<i>ura4⁺</i>	ChIP
96	TCTTGGCTTCGACAACAGGATTA	<i>ura4⁺</i>	ChIP
258	TACCTTGTGGTTGATTCACG	<i>sre2</i>	ChIP
259	CCAATTTGGGGATAGCAGTAC	<i>sre2</i>	ChIP
260	CAATCGTTTGGCCAACATAACG	<i>sre3</i>	ChIP
261	GCCTAGCGATTGATGTCAGT	<i>sre3</i>	ChIP
262	CATGCAAACGTATAAAGAAGAC	<i>cenH</i>	ChIP
263	CTTGTGAAAGAAACCAACCGAG	<i>cenH</i>	ChIP
313	CCGAAAAGCTTTGCAACTTTG	<i>mat1</i>	probe
314	CGTCTGAAAGCTTCTGTGATG	<i>mat1</i>	probe
315	GGAATTGGGAGGTTGAGTGTG	<i>mat1</i>	probe
316	CACACTCAACCTCCCAATTCC	<i>mat1</i>	probe
317	CGCCAATAACCATGACCCTT	<i>mat1</i>	probe
318	AAGGGTCATGGTTATTGGCG	<i>mat1</i>	probe

プラスミドリスト

SP177	pGBKT7	KanR, TRP1
SP178	pGADT7	AmpR, LEU2
TP2	pGBKT7-Swi2	KanR, TRP1
TP6	pGBKT7-Swi2-3A	KanR, TRP1
SP181	pGADT7-Swi6	AmpR, LEU2
pM106	pGADT7-Swi6ΔCSD	AmpR, LEU2
TP5	pGADT7-Swi6 H321Q	AmpR, LEU2

酵母培養

以降に述べる実験方法において、YES 培地(Yeast Extract Supplements; 0.5% (w/v), 3.0% (w/v)glucose, 200 mg/l adenine, histidine, uracil, leucine and lysine hydrochloride) によって、30℃で振盪培養し、対数増殖期にあたる $5.0 \times 10^6 \sim 1.0 \times 10^7$ cells/ml の濃度のものを使用した。ただし、サイレンシングの表現型観察に用いた low adenine plate は YES 培地から adenine を抜き、agar を 2% (w/v)となるように加えたものを使用した。また、同様にサイレンシング解析で用いた 5-FOA 培地は YES プレートに 5-Fluoroorotic Acid Monohydrate (5-FOA)を終濃度 0.1%(w/v)になるように加えたものを使用した。接合型変換の表現型解析には SPAS 培地 (1.0% (w/v)glucose, 7.3 mM KH₂PO₄, 1000 x vitamins, 45 mg/l adenine, histidine, uracil, leucine and lysine hydrochloride) に agar を 2% (w/v)となるように加えたものを使用し

た。UV 感受性解析では、各株を YES プレートにスポットしたのち、120J/m² UV(268 nm)照射し、3 日間培養した。

また、集菌する際は培養した酵母を 4°C, 3500 rpm で 3 分間遠心して回収した。

形質転換

液体培養した細胞を集菌し氷冷した 1xPBS (137 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄) で wash した。氷冷した 1M ソルビトール溶液に懸濁した。遠心して上清を捨てたのち、再度、氷冷した 1M ソルビトールを加え vortex でよく懸濁し 20 分間静置した。懸濁液に DNA 5 μ l を加えて、よく混ぜ、電気穿孔キュベット (2mm Gene Pulser Cuvette, Bio Rad)に移し、GENE PULSER II (Bio Rad) にて 2.25 kV、200 Ω 、25 μ F の条件でパルスをかけた。キュベット内の細胞を YES 液体培地に加え、30°C で 3 時間培養した後、導入した DNA の薬剤選択マーカーに応じた薬剤を加えた寒天培地に塗布して目的の形質転換体を得た。

Pombe strain construction

形質転換によって単離したクローンは、2 回のシングルコロニー分離によって得た。遺伝子欠失またはタグ付けのための DNA 断片は、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に基づく方法を用いた。遺伝子欠失については、標的遺伝子を、それぞれ G418、ハイグロマイシン B およびノルセオトリシンに対する耐性を付与する薬剤耐性カセット KanMX6、HphMX6 および NatMX6 で置換した。13myc タグは Swi2C 末端に付加した。すべての形質転換体は PCR で確認した。変異導入はシークエンスによって確認した。

生育阻害の表現型観察

液体培養した酵母の細胞濃度をセルカウンター CDA-1000 (Sysmex) で測定して、300~400 cells を low adenine plate または rich media に塗布して、30 °C で 4 日間培養したのち、コロニーの状態を観察した。

クロマチン免疫沈降法 (ChIP)

細胞培養後、培養液にホルムアルデヒド (Nacali tesque) を終濃度 1% となるように加え、4°C で 30 分間振盪培養しクロスリンク処理を行なった。その後、グリシンを終濃度 125mM となるように加えて 4°C で 1 時間振盪培養した。遠心で細胞を回収し、氷冷した 1xPBS で 2 回 wash しスクリーキャップチューブに回収し、一度 -80°C で凍結保存した。

IP 用の Dynabeads を平衡化するために 100 mg/ml BSA 5 μ l/sample, 1xPBS 1 ml/sample, Dynabeads Pan Mouse IgG (or Dynabeads anti-Rabbit IgG) (Invitrogen) 25 μ l/sample を混ぜて、4°C オーバーナイトでローテーターにて攪拌した。

平衡化した Dynabeads Pan Mouse に一次抗体の α -H3K9me (浦野抗体)を、1 μ l/sample を加えて 4°C オーバーナイトでローテーターを回して反応させた。Dynabeads anti-Rabbit を用いた時は一次抗体の α -Swi6(高畑抗体) 1 μ l/sample を加えて 4°C オーバーナイトでローテーターを回して反応させた。

細胞を融解させた後、-20°C で冷却された 0.5 mm Zirconia Beads (Bio Spec Products) をチューブの 8~9 割まで充填し、500 μ l の ChIP lysis buffer (50 mM HEPES/KOH (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% triton X-100, 0.1% Na-Deoxycholate) を加える。マルチビーズヨッカー (安井機器) が 0°C まで冷却されていることを確認して細胞破碎した (2700 rpm, 1 cycle 60 sec ON, 60 sec OFF, 20 cycle)。ガスバーナーで熱した 21G の針でスクリーキャ

チップチューブの底に穴を開けて、5 ml チューブにセットして、1500 rpm で3 分間遠心して回収した。スクリュキャップチューブに ChIP lysis buffer 200 μ l 加えて zirconia beads を洗浄して再び 1500 rpm で3 分間遠心して回収した。細胞懸濁液を全量 1.5 ml チューブに移して、15,000 rpm 4°Cで 60 分間遠心して上清をアスピレーターで吸い取りクロマチンペレットを回収した。回収したクロマチンペレットを ChIP lysis buffer 1 ml で洗浄し 15,000 rpm 4°Cで 5 分間遠心して、再びアスピレーターで上清をすてた。新たに ChIP lysis buffer 500 μ l 加えてペレットをピペティングにより徹底的に懸濁した。

水槽がよく冷えたことと水の量を確認して BIORUPTOR (コスモバイオ) のソニケーターでクロマチンを超音波処理で断片化した (Level H, 30 sec ON, 30 sec OFF, 15 cycle を 3 set)。断片化処理後、15,000 rpm で 5 分間遠心して細胞デブリをペレット化して除去し、可溶性になったクロマチン断片を免疫沈降用の試料として用いた。

抗体結合したビーズを回収し、そこに上清を 125 μ l を加えて 4°C オーバーナイトでローテーターを回して IP を行なった。また、input 用に 25 μ l を取っておいた。

ビーズを回収し ChIP lysis buffer, High salt buffer (50 mM HEPES/KOH (pH 7.5), 500 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% triton X-100, 0.1% Na-Deoxycholate), LiCl buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.25 M LiCl, 0.5% NP-40, 0.5% Na-Deoxycholate, 1 mM EDTA (pH8.0))の順で 2 回洗浄した。

Reverse Crosslinking Buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 1 mM EDTA, 0.8% SDS)をビーズと input 用にとっておいた WCE に 200 μ l 加えて、よく混合した。その後 95°Cで正確に 12 分間作用させて立つクロスリンクを行なった。

脱クロスリンク後の溶液に DDW を加えて 400 μ l にし、フェノール 400 μ l, クロロホルム 400 μ l 入れて vortex で懸濁し、15,000 rpm で 5 分間遠心したのち、上清を別のチューブに移した。

上清に 3M NaOAc (pH 5.2) 40 μ l と 99.5 % EtOH 1 ml, 20 mg/ml グリコーゲン 1 μ l 加えて 30 分間静置したのち、15,000 rpm で 15 分間遠心した。上清をすて、80%エタノールを 1 ml 加えて wash し 5 分間 15,000 rpm で遠心して上清をアスピレーターで除いた。エタノールが乾いたのを確認してから MilliQ 水 100 μ l 加えて沈殿を溶かした。

input ごとに、10 倍希釈系列を 6 段階作り、サンプルと希釈系列を LightCycle[®]96(Roche)で Real Time PCR をかけた。希釈系列から検量線を作成した。PCR の反応系とプログラムは以下のとおりである。

Template	6.0 μ l	<u>95°C 3min</u>
1 μ M Primer set	10.0 μ l	98°C 10sec
10 $\times$ PCR buffer	2.5 μ l	58°C 10sec 38 cycle
25 mM MgSO ₄	2.5 μ l	<u>72°C 15sec</u>
2mM dNTP mix	2.5 μ l	4°C ∞
100 $\times$ SYB	0.25 μ l	
Taq polymerase	1.25 μ l	
Total	25 μ l	

RNA 抽出と RT

回収した細胞を 1xPBS で wash し、つぎに DEPC 水で wash して-80°Cで保存した。

融解した細胞に lysis buffer 400 μ l を加えて vortex でよく混ぜ、酸性 phenol を 400 μ l 加えてよく懸濁させた。懸濁液を 65°Cで 1 時間インキュベートした。15 分ごとに一回 vortex して混ぜた。その後 10 分間氷上で静置して 4°C 15,000 rpm で 5 分間遠心した。上清を別のチュ

ーブに移し、酸性 phenol 400 μ l, クロロホルムを 400 μ l を加えて、vortex で懸濁し、15,000 rpm で 5 分間遠心したのち、上清を別のチューブに移した。
 上清に 3M NaOAc (pH 5.2) 40 μ l と 99.5 % EtOH 1 ml を加えて 15,000 rpm で 15 分間遠心した。上清をすて、80%エタノールを 1 ml 加えて wash し 5 分間 15,000 rpm で遠心して上清をアスピレーターで除いた。DEPC 水を 50 μ l 加えて沈殿を溶かした。RNA 溶液 43 μ l, DNase buffer (TaKaRa) 5 μ l, Recombinant DNase I (TaKaRa) を 37°C で 30 分間作用させゲノム DNA を除いた。
 その後 DEPC 水 150 μ l, 酸性 phenol 400 μ l, クロロホルムを 400 μ l を加えて、vortex で懸濁し、15,000 rpm で 5 分間遠心したのち、上清を別のチューブに移した。
 上清に 3M NaOAc (pH 5.2) 40 μ l と 99.5 % EtOH 1 ml を加えて 15,000 rpm で 15 分間遠心した。上清をすて、80%エタノールを 1 ml 加えて wash し 5 分間 15,000 rpm で遠心して上清をアスピレーターで除いた。DEPC 水を 50 μ l 加えて沈殿を溶かした。
 RNA 1 μ l と 2 mM dNTP mix を 10 μ l と終濃度 1 μ M となるようにプライマーを加えて 20 μ l まで DEPC 水でメスアップした。65°C で 5 分間インキュベートする。その後、氷上において。

PrimeScript™ Reverse Transcriptase (TaKaRa) を用いて 42°C で 30 分間、その後 70°C で 15 分間インキュベートして、RT 反応を行った。1 つのプライマーにつき、*swi6* Δ 株の RNA から合成した cDNA で希釈系列を作り、サンプルと希釈系列を LightCycle®96(Roche) で Real Time PCR をかけた。希釈系列から検量線を作成した (原液を 100% として 10 倍ずつ薄めて 6 段階希釈系列を作った)。PCR の反応系とプログラムは以下のとおりである。

反応系		PCR program	RT 反応
Template	6.0 μ l	<u>95°C 3 min</u>	42°C 30 min
1 μ M Primer set	10.0 μ l	98°C 10 sec	70°C 15 min
10 $\times$ PCR buffer	2.5 μ l	58°C 10 sec 38 cycle	on ice
25 mM MgSO ₄	2.5 μ l	<u>72°C 15 sec</u>	
2mM dNTP mix	2.5 μ l	4°C ∞	
100 $\times$ SYB	0.25 μ l		
Taq polymerase	1.25 μ l		
total	25.0 μ l		

mat PCR

分裂酵母のゲノムをテンプレートとして PCR をかけた。PCR の反応系とプログラムは以下のとおりである。

Template	20 μ l	<u>95°C 5min</u>	
10 μ M MT1 primer	3 μ l	95°C 30sec	
10 μ M MP primer	1.5 μ l	55°C 30sec	30 cycle
10 μ M MM primer.	1.5 μ l	<u>72°C 2 min</u>	
2mM dNTP mix	2.5 μ l	8°C ∞	
10 $\times$ PCR buffer	5 μ l		
DDW	14.5 μ l		
Taq polymerase	1.25 μ l		
total	50 μ l		

colony-directed mat PCR

YES 培地で 4 日間培養した酵母が形成しているコロニーをとり 25 μ l の incubation solution (1.2 M sorbitol, 100 mM Na-phosphate pH7.4, 2.5 mg/ml T-20 Zymolyase) に懸濁し

た。細胞と同量の glass beads を加え 37°C で 30 分間 incubation した。100 μ l の lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl, 1% SDS, 2% TritonX-100) を加え 10 分間 vortex した。200 μ l の中性 Phenol/CIAA を加え、5 分間 vortex した。次に、15,000 rpm で 5 分間遠心分離した。上清を 200 μ l とって別のチューブに移し、もう一度同じステップを繰り返した。上清に 3M NaOAc (pH 5.2) 20 μ l と 99.5 % EtOH 500 μ l と 20 mg/ml のグリコーゲン 1 μ l を加えて 15,000 rpm で 15 分間遠心した。上清をすて、80%エタノールを 1ml 加えて wash し 5 分間 15,000 rpm で遠心して上清をアスピレーターで除いた。DDW を 50 μ l 加えて沈殿を溶かした。そのサンプルをテンプレートとして mat PCR と同じ方法を用いた。

Yeast Two Hybrid 法

bait タンパク質 Swi2 発現には pGBKT7、prey タンパク質 Swi6 発現には pGADT7 を用いた。出芽酵母 AH109(MATa, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* , *LYS2::GAL1^{UAS}-GAL1^{TATA}-HIS3*, *MEL1*, *GAL2^{UAS}-GAL2^{TATA}-ADE2*, *URA3::MEL1^{UAS}-MEL1^{TATA}-lacZ*) を Synthetic Defined (SD) Media 培地で培養した。炭素源として glucose を用いた。Swi2-Swi6 の相互作用を明確に解析するため HIS3 産物の阻害剤である 15mM 3-AT (3-amino-1,2,4-triazole) を添加した。

ゲノム抽出

late log phase まで培養した細胞を回収し、PBS で 2 回洗浄し、incubation solution(1.2M sorbitol, 0.1M リン酸バッファー pH7.4, 2.5mg/ml T-20 Zymolyase (nacala tesquei))を 10 μ l/ml 加え、よく混合した。37°C で 30 min 培養し、450 μ l の lysis buffer(10 mM Tris-HCl pH8.0, 100 mM NaCl, 1% SDS, 2% TritonX-100)を加え vortex した。400 μ l のフェノール/クロロホルムを加え、よく混合したのち、15,000 rpm 4°C で 10 min 遠心分離し、上清をとって別のチューブに移し、もう一度同じステップを繰り返した。上清に 3M NaOAc (pH 5.2) 40 μ l と 99.5 % EtOH 1000 μ l を加えて 15,000 rpm で 10min 遠心分離した。上清をすて、70%エタノールを 1ml 加えて洗浄し 5 分間 15,000 rpm で遠心して上清をアスピレーターで除いた。milliQ 水 50 μ l 加えて沈殿を溶かした。20mg/ml RNAaseA を 1 μ l 加え、37°C で 30 min 処理した。もう一度、フェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行ない、70%エタノールで洗浄したのち、milliQ 水 50 μ l 加えて沈殿を溶かして試料とした。

サザンブロッティング

抽出したゲノム 10 μ g を HindIII (TakaRa)で over night で切断した。70°C で 15 min で Hind III を不活化したのち、フェノールクロロホルム抽出したのち、エタノール沈殿して DNA を回収した。Mupid 電気泳動層にて 0.7% アガロースゲルを 18V で 15 時間電気泳動を行なった。ナイロンメンブレン Amersham HybondTM-N⁺ (GE Healthcare) へ DNA を転写した。プローブは *h90* 株のゲノムに対し、*mat1* 領域を含む 10.4 kbp の領域を約 3.5 kbp の 3 つのフラグメントに分けて、それぞれの領域を PCR で増幅し、精製した。増幅した 3 種類のフラグメントを混合して、1 μ g/15 μ l を 100°C で変性させた。1 μ g/15 μ l のテンプレート DNA 15 μ l、Random Hexanucleotide(Thermo Scientific) 2 μ l、DIG DNA labeling Mix, 10x conc (Roche) 2 μ l, klenow fragment enzyme 10 U / μ l (NEB) 1 μ l 加え、37°C で over night で反応させた。0.2 M EDTA を加えて反応を停止させ、65°C 10min で酵素を不活化した。これをそのまま probe とし、5 μ l 用いた。UV クロスリンクによる DNA のメンブレンへの固定、ハイブリダイゼーション、ブロッキング、検出は DIG Labeling and Detection Kit (Roche)に従って行った。UV クロスリンクは 0.07 J/cm²で行った。ハイブリダイゼーションは 42°Cで行った。ス

トリジェンシー洗浄は 65°Cで行った。メンブレンのブロッキングは DIG Labeling and Detection Kit (Roche)に付属のブロッキング溶液を調整し、さらに probe 5 μ l に対し、1 μ l の Salmon Sperm DNA 10 mg/ml(BioDynamics Laboratory Inc.)を加えた。検出は Amersham™ ImageQuant™ 800 を用いた。

Iodine staining

YES 液体培地で培養した酵母を回収後、PBS により 2 回洗浄したのち SPAS 培地で 25°C, 5 日間培養した。閉鎖系でヨウ素を展開し、約 5 分間のコロニーを染色した。

参考文献

- [1] C. Richardson, N. Horikoshi, and T. K. Pandita, "The role of the DNA double-strand break response network in meiosis," Aug. 2004. doi: 10.1016/j.dnarep.2004.05.007.
- [2] D. C. Van Gent and M. Van Der Burg, "Non-homologous end-joining, a sticky affair," Dec. 10, 2007. doi: 10.1038/sj.onc.1210871.
- [3] Y. Abe *et al.*, "HP1-Assisted Aurora B Kinase Activity Prevents Chromosome Segregation Errors," *Dev Cell*, vol. 36, no. 5, pp. 487–497, Mar. 2016, doi: 10.1016/j.devcel.2016.02.008.
- [4] A. L. Pidoux and R. C. Allshire, "Kinetochore and heterochromatin domains of the fission yeast centromere," *Chromosome Res*, vol. 12, no. 6, pp. 521–534, 2004, doi: 10.1023/B:CHRO.0000036586.81775.8B.
- [5] R. C. Allshire and H. D. Madhani, "Ten principles of heterochromatin formation and function," *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2017 19:4, vol. 19, no. 4, pp. 229–244, Dec. 2017, doi: 10.1038/nrm.2017.119.
- [6] S. Jia, T. Yamada, and S. I. S. Grewal, "Heterochromatin Regulates Cell Type-Specific Long-Range Chromatin Interactions Essential for Directed Recombination," 2004.
- [7] C.-S. Lee and J. E. Haber, "Mating-type Gene Switching in *Saccharomyces cerevisiae*," in *Mobile DNA III*, vol. 3, no. 2, American Society of Microbiology, 2015, pp. 491–514. doi: 10.1128/microbiolspec.mdna3-0013-2014.
- [8] J. E. Haber, "Mating-type genes and MAT switching in *Saccharomyces cerevisiae*," *Genetics*, vol. 191, no. 1, pp. 33–64, May 2012, doi: 10.1534/genetics.111.134577.
- [9] G. Thon, T. Maki, J. E. Haber, and H. Iwasaki, "Mating-type switching by homology-directed recombinational repair: a matter of choice," Apr. 05, 2019, *Springer Verlag*. doi: 10.1007/s00294-018-0900-2.
- [10] R. Egel, "Frequency of mating-type switching in homothallic fission yeast [21]," 1977, *Nature Publishing Group*. doi: 10.1038/266172a0.
- [11] M. Kelly, J. Burke, M. Smith, A. Klar, and D. Beach, "Four mating-type genes control sexual differentiation in the fission yeast.," *EMBO J*, vol. 7, no. 5, pp. 1537–1547, 1988, doi: 10.1002/j.1460-2075.1988.tb02973.x.
- [12] J. Z. Dalgaard and A. J. S. Klar, "Swi1 and swi3 perform imprinting, pausing, and termination of DNA replication in *S. Pombe*," *Cell*, vol. 102, no. 6, pp. 745–751, Sep. 2000, doi: 10.1016/S0092-8674(00)00063-5.
- [13] S. Vengrova and J. Z. Dalgaard, "The wild - type *Schizosaccharomyces pombe mat1* imprint consists of two ribonucleotides," *EMBO Rep*, vol. 7, no. 1, pp. 59–65, Jan. 2006, doi: 10.1038/sj.embor.7400576.
- [14] S. Vengrova and J. Z. Dalgaard, "RNase-sensitive DNA modification(s) initiates *S. pombe* mating-type switching," *Genes Dev*, vol. 18, no. 7, pp. 794–804, Apr. 2004, doi: 10.1101/gad.289404.
- [15] A. Kaykov and B. Arcangioli, "A programmed strand-specific and modified nick in *S.*

- pombe constitutes a novel type of chromosomal imprint,” *Current Biology*, vol. 14, no. 21, pp. 1924–1928, Nov. 2004, doi: 10.1016/j.cub.2004.10.026.
- [16] A. Toomre *et al.*, “Cell type switching by DNA transposition in fission yeast,” SPIE, 1972.
 - [17] D. Beach, P. Nurse, and R. Egel, “Molecular rearrangement of mating-type genes in fission yeast,” *Nature*, vol. 296, no. 5858, pp. 682–683, 1982, doi: 10.1038/296682a0.
 - [18] B. Arcangioli and R. De Lahondè, “Fission yeast switches mating type by a replication-recombination coupled process,” 2000.
 - [19] J. Z. Dalgaard and A. J. S. Klar, “A DNA replication-arrest site RTS1 regulates imprinting by determining the direction of replication at mat1 in *S. pombe*,” *Genes Dev*, vol. 15, no. 16, pp. 2060–2068, Aug. 2001, doi: 10.1101/gad.200801.
 - [20] G. Thon and A. J. Klar, “Directionality of fission yeast mating-type interconversion is controlled by the location of the donor loci,” *Genetics*, vol. 134, no. 4, 1993.
 - [21] B. Arcangioli and A. J. Klar, “A novel switch-activating site (SAS1) and its cognate binding factor (SAP1) required for efficient mat1 switching in *Schizosaccharomyces pombe*,” *EMBO J*, vol. 10, no. 10, pp. 3025–3032, Oct. 1991, doi: 10.1002/j.1460-2075.1991.tb07853.x.
 - [22] U. Styrkársdóttir, R. Egel, and O. Nielsen, “The smt-0 mutation which abolishes mating-type switching in fission yeast is a deletion,” *Curr Genet*, vol. 23, no. 2, pp. 184–186, Feb. 1993, doi: 10.1007/BF00352020.
 - [23] T. Jakočiunas, L. R. Holm, J. Verhein-Hansen, A. Trusina, and G. Thon, “Two Portable Recombination Enhancers Direct Donor Choice in Fission Yeast Heterochromatin,” *PLoS Genet*, vol. 9, no. 10, Oct. 2013, doi: 10.1371/journal.pgen.1003762.
 - [24] R. Egel, D. H. Beacht, and A. J. S. Klart, “Genes required for initiation and resolution steps of mating-type switching in fission yeast (DNA double-strand cut/DNA rearrangement),” 1984. [Online]. Available: <https://www.pnas.org>
 - [25] H. Gutz and H. Schmidt, “Switching genes in *Schizosaccharomyces pombe*,” *Curr Genet*, vol. 9, no. 5, pp. 325–331, May 1985, doi: 10.1007/BF00421601.
 - [26] T. Maki, N. Ogura, J. E. Haber, H. Iwasaki, and G. Thon, “New insights into donor directionality of mating-type switching in *Schizosaccharomyces pombe*,” *PLoS Genet*, vol. 14, no. 5, May 2018, doi: 10.1371/journal.pgen.1007424.
 - [27] K. Ostermann, A. Lorentz, and H. Schmidt, “The fission yeast rad22 gene, having a function in matingtype switching and repair of DNA damages, encodes a protein homolog to Rad52 of *saccharomyces cerevisiae*,” *Nucleic Acids Res*, vol. 21, no. 25, pp. 5940–5944, Dec. 1993, doi: 10.1093/nar/21.25.5940.
 - [28] G. Thon and A. J. S. Klar, “The clr1 locus regulates the expression of the cryptic mating-type loci of fission yeast,” *Genetics*, vol. 131, no. 2, pp. 287–296, 1992, doi: 10.1093/genetics/131.2.287.
 - [29] K. Ekwall and T. Ruusala, “Mutations in rik1, clr2, clr3 and clr4 genes asymmetrically derepress the silent mating-type loci in fission yeast,” *Genetics*, vol. 136, no. 1, pp. 53–64, 1994, Accessed: Mar. 01, 2021. [Online]. Available:

/pmc/articles/PMC1205792/?report=abstract

- [30] J. Singh, V. Goel, and A. J. S. Klar, "A Novel Function of the DNA Repair Gene *rhp6* in Mating-Type Silencing by Chromatin Remodeling in Fission Yeast," *Mol Cell Biol*, vol. 18, no. 9, pp. 5511–5522, Sep. 1998, doi: 10.1128/mcb.18.9.5511.
- [31] N. Nonaka *et al.*, "Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast," *Nat Cell Biol*, vol. 4, no. 1, pp. 89–93, Nov. 2002, doi: 10.1038/ncb739.
- [32] G. D. Shankaranarayana, M. R. Motamedi, D. Moazed, and S. I. S. Grewal, "Sir2 regulates histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in fission yeast," *Current Biology*, vol. 13, no. 14, pp. 1240–1246, Jul. 2003, doi: 10.1016/S0960-9822(03)00489-5.
- [33] S. Jia, R. Kobayashi, and S. I. S. Grewal, "Ubiquitin ligase component Cul4 associates with Clr4 histone methyltransferase to assemble heterochromatin," *Nat Cell Biol*, vol. 7, no. 10, pp. 1007–1013, Oct. 2005, doi: 10.1038/ncb1300.
- [34] G. Thon *et al.*, "The Clr7 and Clr8 directionality factors and the Pcu4 cullin mediate heterochromatin formation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*," *Genetics*, vol. 171, no. 4, pp. 1583–1595, Dec. 2005, doi: 10.1534/genetics.105.048298.
- [35] D. A. Vagin, F. K. Khasanov, and V. I. Bashkirov, "The role of recombinational repair proteins in mating type switching in fission yeast cells," *Russ J Genet*, vol. 42, no. 4, pp. 385–391, Apr. 2006, doi: 10.1134/S1022795406040041.
- [36] L. Roseaulin, Y. Yamada, Y. Tsutsui, P. Russell, H. Iwasaki, and B. Arcangioli, "Mus81 is essential for sister chromatid recombination at broken replication forks," *EMBO Journal*, vol. 27, no. 9, pp. 1378–1387, May 2008, doi: 10.1038/emboj.2008.65.
- [37] M. Zaratiegui *et al.*, "CENP-B preserves genome integrity at replication forks paused by retrotransposon LTR," *Nature*, vol. 469, no. 7328, pp. 112–115, Jan. 2011, doi: 10.1038/nature09608.
- [38] R. J. Lawrence and T. A. Volpe, "Msc1 links dynamic Swi6/HP1 binding to cell fate determination," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, no. 4, pp. 1163–1168, Jan. 2009, doi: 10.1073/pnas.0811161106.
- [39] E. Matsuda, R. Sugioka-Sugiyama, T. Mizuguchi, S. Mehta, B. Cui, and S. I. S. Grewal, "A homolog of male sex-determining factor SRY cooperates with a transposon-derived CENP-B protein to control sex-specific directed recombination," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 108, no. 46, pp. 18754–18759, Nov. 2011, doi: 10.1073/pnas.1109988108.
- [40] R. N. Dubey, N. Nakwal, K. K. Bisht, A. Saini, S. Haldar, and J. Singh, "Interaction of APC/C-E3 ligase with swi6/HP1 and Clr4/Suv39 in heterochromatin assembly in fission yeast," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 11, pp. 7165–7176, Mar. 2009, doi: 10.1074/jbc.M806461200.
- [41] A. Holmes *et al.*, "Lsd1 and Lsd2 Control Programmed Replication Fork Pauses and Imprinting in Fission Yeast," *Cell Rep*, vol. 2, no. 6, pp. 1513–1520, Dec. 2012, doi: 10.1016/j.celrep.2012.10.011.
- [42] J.-M. Zhang *et al.*, "Fission Yeast Pxd1 Promotes Proper DNA Repair by Activating Rad16XPF and Inhibiting Dna2," *PLoS Biol*, vol. 12, no. 9, p. e1001946, Sep. 2014, doi:

- 10.1371/journal.pbio.1001946.
- [43] J. Zech, E. L. Godfrey, H. Masai, E. Hartsuiker, and J. Z. Dalgaard, "The DNA-Binding Domain of *S. pombe* Mrc1 (Claspin) Acts to Enhance Stalling at Replication Barriers," *PLoS One*, vol. 10, no. 7, p. e0132595, Jul. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0132595.
 - [44] R. Egel, "Mating-type switching and mitotic crossing-over at the mating-type locus in fission yeast.," *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, vol. 45 Pt 2, pp. 1003–1007, Jan. 1981, doi: 10.1101/sqb.1981.045.01.116.
 - [45] R. Egel, "Rearrangements at the mating type locus in fission yeast," *MGG Molecular & General Genetics*, vol. 148, no. 2, pp. 149–158, Jan. 1976, doi: 10.1007/BF00268379.
 - [46] R. Egel, "The genetic instabilities of the mating type locus in fission yeast," *MGG Molecular & General Genetics*, vol. 145, no. 3, pp. 281–286, Jan. 1976, doi: 10.1007/BF00325824.
 - [47] H. Gutz and F. J. Doe, "Two Different h Mating Types in SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE.," *Genetics*, vol. 74, no. 4, pp. 563–9, Aug. 1973, Accessed: Mar. 01, 2021. [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17248627>
 - [48] B. Arcangioli and S. Gangloff, "The Fission Yeast Mating-Type Switching Motto: 'One-for-Two' and 'Two-for-One,'" *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, vol. 87, no. 1, Mar. 2023, doi: 10.1128/mmbr.00008-21.
 - [49] P. B. Singh *et al.*, "A sequence motif found in a *Drosophila* heterochromatin protein is conserved in animals and plants." Accessed: Mar. 11, 2019. [Online]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC333712/pdf/nar00240-0095.pdf>
 - [50] Y. Akamatsu, D. Dziadkowiec, M. Ikeguchi, H. Shinagawa, and H. Iwasaki, "Two different Swi5-containing protein complexes are involved in mating-type switching and recombination repair in fission yeast," 2003. [Online]. Available: <https://www.pnas.org>
 - [51] C. Ellermeier *et al.*, "RNAi and heterochromatin repress centromeric meiotic recombination," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 107, no. 19, pp. 8701–8705, May 2010, doi: 10.1073/pnas.0914160107.
 - [52] A. K. Okita *et al.*, "Heterochromatin suppresses gross chromosomal rearrangements at centromeres by repressing Tfs1/TFIIS-dependent transcription," *Commun Biol*, vol. 2, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s42003-018-0251-z.
 - [53] T. Westphal and G. Reuter, "Recombinogenic Effects of Suppressors of Position-Effect Variegation in *Drosophila*." [Online]. Available: <https://academic.oup.com/genetics/article/160/2/609/6049733>
 - [54] T. Maki, G. Thon, and H. Iwasaki, "Fission yeast Swi2 designates cell-type specific donor and stimulates Rad51-driven strand exchange for mating-type switching," *Nucleic Acids Res*, vol. 51, no. 8, pp. 3869–3887, May 2023, doi: 10.1093/nar/gkad204.
 - [55] Y. Akamatsu *et al.*, "Fission yeast Swi5/Sfr1 and Rhp55/Rhp57 differentially regulate Rhp51-dependent recombination outcomes," *EMBO J*, vol. 26, no. 5, pp. 1352–1362, Mar. 2007, doi: 10.1038/sj.emboj.7601582.
 - [56] N. Haruta *et al.*, "The Swi5-Sfr1 complex stimulates Rhp51/Rad51 - and Dmc1-mediated

- DNA strand exchange in vitro," *Nat Struct Mol Biol*, vol. 13, no. 9, pp. 823–830, Sep. 2006, doi: 10.1038/nsmb1136.
- [57] G. A. Cromie, J. C. Connelly, and D. R. F. Leach, "Recombination at double-strand breaks and DNA ends: Conserved mechanisms from phage to humans," Dec. 01, 2001, *Cell Press*. doi: 10.1016/S1097-2765(01)00419-1.
 - [58] N. P. Cowieson, J. F. Partridge, R. C. Allshire, and P. J. McLaughlin, "Dimerisation of a chromo shadow domain and distinctions from the chromodomain as revealed by structural analysis," *Current Biology*, vol. 10, no. 9, pp. 517–525, May 2000, doi: 10.1016/S0960-9822(00)00467-X.
 - [59] J. F. Smothers and S. Henikoff, "The HP1 chromo shadow domain binds a consensus peptide pentamer," *Current Biology*, vol. 10, no. 1, pp. 27–30, Jan. 2000, doi: 10.1016/S0960-9822(99)00260-2.
 - [60] S. V. Brasher *et al.*, "The structure of mouse HP1 suggests a unique mode of single peptide recognition by the shadow chromo domain dimer," *EMBO J*, vol. 19, no. 7, pp. 1587–1597, Apr. 2000, doi: 10.1093/emboj/19.7.1587.
 - [61] T. Fischer *et al.*, "Diverse roles of HP1 proteins in heterochromatin assembly and functions in fission yeast," *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 106, no. 22, pp. 8998–9003, Jun. 2009, doi: 10.1073/pnas.0813063106.
 - [62] A. Thiru *et al.*, "Structural basis of HP1/PXVXL motif peptide interactions and HP1 localisation to heterochromatin," *EMBO J*, vol. 23, pp. 489–499, 2004, doi: 10.1038/sj.emboj.7600088.
 - [63] S. Sanulli *et al.*, "HP1 reshapes nucleosome core to promote phase separation of heterochromatin," *Nature*, vol. 575, no. 7782, pp. 390–394, Nov. 2019, doi: 10.1038/s41586-019-1669-2.
 - [64] M. T. Hayashi, T. S. Takahashi, T. Nakagawa, J. I. Nakayama, and H. Masukata, "The heterochromatin protein Swi6/HP1 activates replication origins at the pericentromeric region and silent mating-type locus," *Nat Cell Biol*, vol. 11, no. 3, pp. 357–362, 2009, doi: 10.1038/ncb1845.
 - [65] J. M. Bailis, P. Bernard, R. Antonelli, R. C. Allshire, and S. L. Forsburg, "Hsk1-Dfp1 is required for heterochromatin-mediated cohesion at centromeres," *Nat Cell Biol*, vol. 5, no. 12, pp. 1111–1116, Dec. 2003, doi: 10.1038/ncb1069.
 - [66] S. Ahmed, S. Saini, S. Arora, and J. Singh, "Chromodomain Protein Swi6-mediated Role of DNA Polymerase α in Establishment of Silencing in Fission Yeast," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 51, pp. 47814–47821, Dec. 2001, doi: 10.1074/jbc.M109186200.
 - [67] O. Fleck, C. Rudolph, C. Albrecht, A. Lorentz, "Prim0 Schiirty2, and H. Schmidt, "The Mutator Gene swi8 Effects Specific Mutations i n the Mating-Type Region of Schixosaccharomyces pombe," 1994. [Online]. Available: <https://academic.oup.com/genetics/article/138/3/621/6012738>
 - [68] J. Heath *et al.*, "POGZ promotes homology - directed DNA repair in an HP1 - dependent

- manner,” *EMBO Rep*, vol. 23, no. 1, Jan. 2022, doi: 10.15252/embr.202051041.
- [69] I. Chiolo, A. Minoda, S. U. Colmenares, A. Polyzos, S. V. Costes, and G. H. Karpen, “Double-strand breaks in heterochromatin move outside of a dynamic HP1a domain to complete recombinational repair,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 732–744, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.012.
 - [70] C. Baldeyron, G. Soria, D. Roche, A. J. L. Cook, and G. Almouzni, “HP1 α recruitment to DNA damage by p150CAF-1 promotes homologous recombination repair,” *Journal of Cell Biology*, vol. 193, no. 1, pp. 81–95, Apr. 2011, doi: 10.1083/jcb.201101030.
 - [71] Y. H. Lee, C. Y. Kuo, J. M. Stark, H. M. Shih, and D. K. Ann, “HP1 promotes tumor suppressor BRCA1 functions during the DNA damage response,” *Nucleic Acids Res*, vol. 41, no. 11, pp. 5784–5798, Jun. 2013, doi: 10.1093/nar/gkt231.
 - [72] W. Wu *et al.*, “Interaction of BARD1 and HP1 is required for BRCA1 retention at sites of DNA damage,” *Cancer Res*, vol. 75, no. 7, pp. 1311–1321, Apr. 2015, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2796.
 - [73] M. Alagoz *et al.*, “SETDB1, HP1 and SUV39 promote repositioning of 53BP1 to extend resection during homologous recombination in G2 cells,” *Nucleic Acids Res*, vol. 43, no. 16, pp. 7931–7944, Jul. 2015, doi: 10.1093/nar/gkv722.
 - [74] R. M. Densham *et al.*, “Human BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase activity counteracts chromatin barriers to DNA resection,” *Nat Struct Mol Biol*, vol. 23, no. 7, pp. 647–655, Jul. 2016, doi: 10.1038/nsmb.3236.
 - [75] K. Leopold, A. Stirpe, and T. Schalch, “Transcriptional gene silencing requires dedicated interaction between hp1 protein chp2 and chromatin remodeler mit1,” *Genes Dev*, vol. 33, no. 9–10, pp. 565–577, May 2019, doi: 10.1101/gad.320440.118.
 - [76] V. Maksimov *et al.*, “The binding of Chp2’s chromodomain to methylated H3K9 is essential for Chp2’s role in heterochromatin assembly in fission yeast,” *PLoS One*, vol. 13, no. 8, Aug. 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0201101.
 - [77] K. Bao, C. M. Shan, J. Moresco, J. Yates, and S. Jia, “Anti-silencing factor epe1 associates with SAGA to regulate transcription within heterochromatin,” *Genes Dev*, vol. 33, no. 1–2, pp. 116–126, Jan. 2019, doi: 10.1101/gad.318030.118.
 - [78] M. Sorida *et al.*, “Regulation of ectopic heterochromatin-mediated epigenetic diversification by the JmjC family protein Epe1,” *PLoS Genet*, vol. 15, no. 6, Jun. 2019, doi: 10.1371/journal.pgen.1008129.
 - [79] M. Sadaie *et al.*, “Balance between Distinct HP1 Family Proteins Controls Heterochromatin Assembly in Fission Yeast,” *Mol Cell Biol*, vol. 28, no. 23, pp. 6973–6988, Dec. 2008, doi: 10.1128/mcb.00791-08.
 - [80] M. Zofall and S. I. S. Grewal, “Swi6/HP1 Recruits a JmjC Domain Protein to Facilitate Transcription of Heterochromatic Repeats,” *Mol Cell*, vol. 22, no. 5, pp. 681–692, Jun. 2006, doi: 10.1016/j.molcel.2006.05.010.
 - [81] S. C. Trewick, E. Minc, R. Antonelli, T. Urano, and R. C. Allshire, “The JmjC domain protein Epe1 prevents unregulated assembly and disassembly of heterochromatin,” *EMBO*

- Journal*, vol. 26, no. 22, pp. 4670–4682, Nov. 2007, doi: 10.1038/sj.emboj.7601892.
- [82] Y. Yamagishi, T. Sakuno, M. Shimura, and Y. Watanabe, “Heterochromatin links to centromeric protection by recruiting shugoshin”, doi: 10.1038/nature07217.
 - [83] S. Takahata, S. Chida, A. Ohnuma, M. Ando, T. Asanuma, and Y. Murakami, “Two secured FACT recruitment mechanisms are essential for heterochromatin maintenance,” *Cell Rep*, vol. 36, no. 7, Aug. 2021, doi: 10.1016/j.celrep.2021.109540.
 - [84] A. Ames *et al.*, “Epigenetic memory is governed by an effector recruitment specificity toggle in Heterochromatin Protein 1,” *Nat Commun*, vol. 15, no. 1, Dec. 2024, doi: 10.1038/s41467-024-50538-z.
 - [85] N. Afshar, B. Argunhan, M. Palihati, G. Taniguchi, H. Tsubouchi, and H. Iwasaki, “A novel motif of RAD51 serves as an interaction hub for recombination auxiliary factors,” *Elife*, vol. 10, pp. 1–33, Jan. 2021, doi: 10.7554/eLife.64131.

謝辞

研究の指導をしてくださった村上洋太博士に深く感謝いたします。

また、主査を引き受けて下さった阿部一啓教授、副査を引き受けて下さった坂口和靖教授、松本謙一郎教授、高畑信也特任講師に感謝申し上げます。

特に高畑信也特任講師には、貴重な助言と議論、技術的なサポートをいただきました。深く感謝申し上げます。

また生物有機化学研究室のメンバー全員に支えられました。感謝申し上げます。

分裂酵母株を提供して下さった Dr. B. Arcangioli と岩崎博史教授に感謝します。

最後に、絶え間ない支援と励ましをくれた家族、友人に感謝します。