

氏 名 夏目 豊彰

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 958 号

学位授与の日付 平成 18 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Mcl1, DNA polymerase α accessory factor, is required
for two distinct domain structures in fission yeast
centromere

論文審査委員 主 査 教授 荒木 弘之
教授 仁木 弘典
教授 広海 健
教授 角谷 徹仁
助教授 岩崎 博史（横浜市立大学）

論文内容の要旨

Genomic DNA is wrapped around the histone octamer to form nucleosome, and this basal unit is assembled into a variety of higher-order chromatin structures. These chromatin structures are important for many cellular processes such as transcriptional regulation (promoter) and chromosome segregation (centromere). Although these structures must be precisely maintained during DNA replication to inherit epigenetic information to daughter cells, its underlying mechanisms are poorly understood.

Fission yeast centromere is composed of two structurally and functionally distinct two chromatin domains, both of which are necessary for fully functional centromere. The central domain organizes kinetochore with multiple protein complexes including histone H3 variant, SpCENP-A, and is essential for bipolar attachment to mitotic spindle microtubules (MTs) from opposite poles. On the other hand, outer repetitive domain forms transcriptionally silent heterochromatin-like structure coated with Heterochromatin Protein 1 (HP1)-homologue, Swi6, and is required for recruiting cohesin complex to tightly bind sister-chromatids. This structural feature that kinetochore is flanked by repetitive heterochromatic element resembles those of metazoan centromeres, making genetically tractable fission yeast an excellent model system to study centromere.

Fission yeast Mcl1 is a conserved family protein from yeast to human. Previous studies have shown that Mcl1 genetically interacts, and factors involved in \square with Swi7, a largest subunit of DNA polymerase \square Okazaki fragment processing, and physically interacts with Swi7 *in vivo* and *in vitro*, suggesting that Mcl1 is implicated in lagging strand DNA synthesis. Furthermore, Mcl1-deficient cells show premature separation of sister centromere, indicating that Mcl1 is also required for sister chromatid cohesion (SCC) at outer centromere. Since it is known that SCC at outer centromere depends on heterochromatin protein, Swi6, and that Swi6-loading onto outer \square , Swi7, it was hypothesized that \square centromere depends on DNA polymerase \square Swi7-associating Mcl1 might be directly involved in heterochromatin assembly, that is Swi6-loading, and contribute to SCC at outer centromere indirectly. In this study, based on this hypothesis, roles of Mcl1 in chromosome metabolisms have been analyzed.

Marker genes inserted into heterochromatin are transcriptionally repressed. This phenomenon is called transcriptional gene silencing (TGS) and is used as an indicator of integrity of heterochromatin. Mcl1-deficient cells (*mcl1-101*) showed alleviation of TGS of marker genes inserted into outer centromere as well as *mat* loci and telomere, similar to *swi7* mutants. However, chromatin immunoprecipitation (ChIP) and microscopic analysis showed that Swi6 association to outer centromere was not diminished in *mcl1-101* cells in contrast to *swi7* cells. In addition, *mcl1-101* cells showed synergistic sensitivity to TBZ, which inhibits MT-kinetochore attachment, when combined with \square *swi6* mutation. These results suggest that Mcl1 acts on a Swi6-independent pathway responsible for maintaining outer centromeric heterochromatin. Interestingly, *mcl1-101* and, moreover, *swi7* cells showed sensitivity to histone deacetylase (HDAC) inhibitor, TSA. In addition, *mcl1-101* cells accumulated acetylated histone H4 at the outer centromere as well as *mat* loci and telomere. These results further suggest that Mcl1 and Swi7 are implicated in an HDAC-related

process.

Unexpectedly, the central domain (kinetochore) that flanked by outer centromeric heterochromatin drastically accumulated acetylated histone H4 in *mcl1-101* and, to lesser extent, in *swi7* cells. In addition, *mcl1-101* and *swi7* cells were deficient in TGS at the central domain, which is known to reflect kinetochore function and structure. Indeed, *mcl1-101* cells showed unequal chromosome segregation, manifestation of fatal mono-polar attachment of sister-kinetochores to one side of mitotic spindle MTs. Furthermore, a specialized chromatin structure at the central domain was disrupted, and S-phase association of SpCENP-A to kinetochore was abolished in *mcl1-101* cells. It is known that at least two pathways are responsible for SpCENP-A loading: Ams2 pathway (S-phase) and Mis6 pathway (S- and G2-phase). The *mcl1-101* mutation was synthetically lethal with the Δ *ams2* mutation, and constitutive Mis6 association to kinetochore was not abolished in *mcl1-101* cells, suggesting that Mcl1 might be involved in the third pathway distinct from Ams2 and Mis6.

This study demonstrated that Mcl1 maintains two distinct chromatin structures in fission yeast centromere. Most centromere proteins reported so far are required for either kinetochore or outer heterochromatin. In this context, Mcl1 is a novel type of factor that acts on both domains. At outer repetitive domain, Mcl1 acts on heterochromatin independent of Swi6 while, at the central domain, Mcl1 mediates SpCENP-A loading to kinetochore apart from Ams2 and Mis6. It is thus suggested that a critical role of Mcl1 in both domains is to maintain hypoacetylated state of histone H4, and that Swi7 is also implicated in this process in addition to the Swi6-dependent role at outer centromere. Mcl1 and Swi7 might regulate or recruit HDAC(s) activity at replication fork. It is plausible that deposition-related acetylation of histone H3 and H4 must be immediately removed to reassemble appropriate chromatin structures after replication fork has passed. Alternatively, by analogy to transcript elongation, transient acetylation and subsequent deacetylation of replicated regions might be important to overcome repressive nature of chromatin and to restore the chromatin to its original state, respectively. Although a precise role of deacetylation remains unclear, this study would provide a novel insight into the close link between DNA replication apparatus and histone acetylation state in epigenetic inheritance of chromatin structures.

論文の審査結果の要旨

染色体のクロマチン構造は、細胞分裂に伴って正確に受け継がれて行く。しかし、その機構についての知見は乏しい。夏目君は、分裂酵母Mc11タンパク質に注目し、染色体の分配を司るセントロメアのクロマチン構造の継承に関する研究を行なった。

分裂酵母のセントロメアは高等真核生物に似た構造をしており、キネトコアとその両側に位置するヘテロクロマチンの2つの領域から構成されている。キネトコアはヒストンH3のバリエーションであるCENP-Aを含み、紡錘体の結合領域として機能する。一方、ヘテロクロマチン領域にはヘテロクロマチン結合タンパク質であるSwi6 (HP1ホモログ) が結合し姉妹染色分体接着の場として機能している。このヘテロクロマチン領域に挿入されたレポーター遺伝子は、そのクロマチン構造の故に発現が抑えられる(サイレンシング)。キネトコアでも、動原体形成因子が多数結合した構造をとるため、挿入されたレポーター遺伝子がサイレンシングされる。*mcl1*遺伝子は、染色体の維持や組換え修復に関与する遺伝子として分離され、その産物は染色体DNA複製に必須なDNAポリメラーゼ α (Pol α)と複合体を作ることができる。Pol α の触媒サブユニットをコードするSwi7の変異でも、ヘテロクロマチン領域でのサイレンシングに欠損を持つことが知られている。

夏目君はまず、温度感受性変異*mcl1-101*を持つ細胞が半許容温度においてヘテロクロマチン領域でのサイレンシングに欠損があることを見いだした。*swi7*変異ではSwi6のこの領域への結合が減少し、サイレンシングに欠損を持つが、*mcl1*変異ではSwi6結合量が逆に増加していた。さらに、*mcl1 swi6*二重変異のチュブリン重合阻害剤TBZへの感受性が、それぞれの単独変異に対して加算的であることから、両者が異なった経路で働いていると結論している。*swi7 swi6*二重変異においてもTBZへの感受性が加算的であることから、Swi7もSwi6依存的な経路と非依存的な経路で働いていることも示唆した。夏目君はさらにキネトコアにおいても、*mcl1-101*変異ではサイレンシングが欠損していることを見いだした。また、CENP-Aのセントロメアへの局在化が*mcl1-101*変異では全く見えないか、弱くなっていることを示している。この領域は野生型株ではヌクレオゾーム構造を取らないことが知られているが、マイクロコッカルヌクレアーゼによる解析では、*mcl1-101*変異ではヌクレオゾーム構造が観察され、キネトコアの高次構造が変化していることを示した。次に、*mcl1-101*変異株では、セントロメア領域(ヘテロクロマチン領域及びキネトコア)でのヒストンH4のアセチル化が亢進していることが示し、ヘテロクロマチン領域でのサイレンシングの解除とキネトコアの構造変化をもたらす共通の機構の存在する可能性を示唆した。そして、ヒストンデアセチラーゼ(HDAC)の阻害剤であるトリコスタチンにこの変異株が感受性であることを示し、Mc11とHDACとの機能的な相互作用も示唆した。

以上の結果は、Mc11はアセチル化ヒストンからアセチルを除く過程に関与し、このアセチル化レベルがセントロメアのクロマチン構造に影響を与えていることを示唆している。夏目君は、以上の結果を基に、Mc11は、複製フォークにおいてPol α とともにHDACをセントロメアに呼び寄せ、ヒストンの脱アセチル化を行うことによって、クロマチン高次構造の継承機構を制御しているというモデルを提唱した。

セントロメアのキネトコアとヘテロクロマチン領域の両者のクロマチン構造に同時に関与する因子はこれまで知られておらず、Mc11が両者のクロマチン構造に関与するという

発見は、この分野の研究に新たな知見を加えるものである。また、ヒストンアセチル化が Mc11の欠損により変化することを示し、且つHDACの関与を示唆したことは、今後のこの分野の発展に寄与するものである。このようなことから、本論文は学位授与の要件を十分満たすものと審査員一同判断した。