Osaka University Knowledge Archive

Title	減数分裂期組換えホットスポット領域のクロマチン構造と2重鎖切断部位
Author(s)	鍋谷, 彰
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3079356
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

減数分裂期組換えホットスポット領域のクロマチン構造と２重鎖切断部位

Chromatin Structure of Hot-Spots of Meiotic Recombination and Double-Stranded DNA Breaks in *Saccharomyces cerevisiae*

鍋谷　彰

Akira Nabetani

目次

論文要旨	1
緒言	2
実験方法 (Materials and Methods)	6
結果	11
考察	19
参考文献 (References)	23
図 (Figures and Legends)	25

論文要旨

出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*では減数分裂期に組換え頻度が100-1000倍上昇する。この組換えが高頻度で起こる領域（組換えのホットスッポット）にはDNAの二重鎖切断が生じる。我々は、組換えに特異的な二重鎖DNA切断(DSB)が生じる機構の解析が、組換え開始の制御を理解する手がかりを与えると考え、減数分裂期組換えに特異的にDSBを蓄積する変異株*rad50S*を用い、減数分裂期組換えのホットスッポットであるARG4遺伝子の上流領域とYCR47/ YCR48のプロモーター領域について、減数分裂期導入前と導入後の染色体を分離し、次の二点について解析した。

（1）DSBの生じる位置を正確にDNA塩基配列上に決定し、切断位置の塩基配列に特異性があるかどうか、また、近傍の塩基配列に特徴があるかを検討した。

（2）DSBの生じる位置のクロマチン構造を観察し、DSBの挿入位置とクロマチン構造の関係、また、染色体フットプリンティングを行って、DSBに特異的に関与する因子が存在するかどうかを検討した。　その結果、DSBが生じる位置はsouthern blotで検出された領域内に、DNA上では数ヵ所あり、その切断の生じる位置の塩基配列に特異性はなく、切断点もフラッシュ端やコヘッシブ端などさまざまであった。DSBはクロマチン構造を取らない位置に生じるが、ヌクリエースに特異的に感受性となる部分とは一致していなかった。二重鎖DNA切断部位に特異的なフットプリントが観察され、DSB導入に特異的因子の関与が示唆された。

緒　言

真核生物の減数分裂期は生殖細胞や配偶子を形成する重要な過程である。この細胞周期を経て、二倍体のゲノムは一倍体となるが、このとき相同な２本の染色体はそれぞれ独立に別々の配偶子細胞に分配され、減数分裂期の核分裂の大きな特徴となっている。また、減数分裂期では体細胞分裂期に比べて組換え頻度が１００倍から１０００倍にも上昇する。この二つの事象は互いに独立したものではなく、減数分裂期組換えは相同染色体の正確な分配に必要な過程であることがわかっている。したがって相同染色体が正確に分配されるために必要な染色体レベルの相同性の認識機構は、遺伝的組換え機構によるＤＮＡレベルの相同性の認識機構に大きく依存すると考えられる。

出芽酵母 Saccharomyces cerevisiae は、遺伝的解析、分子生物学的手法が細菌と同じように行われることから、真核生物に特異的な減数分裂期組換え機構の研究が進み、これまでに多くの研究成果が得られている。特に減数分裂期組換えが盛んに起こる組換え領域（ホットスポット領域）に、減数分裂期にのみ観察されるＤＮＡの２重鎖切断（ＤＳＢ）は、その後の組換え過程の研究を行う上で大きな手がかりを与えた(Sun et al, 1989; Cao, et al., 1990)。その成果の一つは、ホットスッポット領域に生じるDSBの導入とその消失、組換え体DNA断片の検出法を確立したことで、減数分裂期組換えの時間経過をDNAレベル追跡できることに成功したことである。減数分裂期が進行するに従って、この２重鎖DNA切断は増加し、その５’末端が分解を受けていることがわかった。さらに時間が経ると２重鎖切断は消失し、その代わり、その末端が修復され、組換え体となったDNA断片が検出されるようになる（Cao, et al., 1990; Sun et al., 1991; Fig. 1）。次に遺伝的組換えに欠損のある変異株、特にDSBの導入、組み換え体形成に欠損を持つ変異株の分離である。これらの変異株の解析から、減数分裂期組換えは少なくとも３つのステップに分けて考えることができるようになった。

その第１ステップは２重鎖DNA切断を導入する過程(DSB)であり、減数分裂期組換えの誘導、特に組換え開始の制御機構に関与する欠損変異株のほとんどは、この２重鎖切断を形成することが出来ない。第２のステップは切断端の５’末を端から徐々に分解する過程である（processing）。この過程に関与する遺伝子にはRAD50、MRE11が知られているが(Alani, et al.

1990; Cao, et al., 1990; Johzuka, K.; personal comm.)、これらの遺伝子の欠失株ではＤＳＢが導入できないが、点変異株のあるものではDSBが蓄積し、しかもその末端が消化されないで、減数分裂期を通して蓄積する。また、同時に体細胞でのＤＮＡ２重鎖切断傷害の修復にも欠損を示す。最後のステップは組換え体を形成する過程（recombinant formation）である。この過程に機能する遺伝子としてRAD51、RAD52、RAD55などがある。これらの欠失変異株ではDSBは末端がさらに分解され、最終的な組換え体が形成されない(Shinohara, et al., 1992; Ogawa, T., et al., 1994; Ogawa, T.;personal comm.)。これらの変異株は体細胞分裂期の組換え修復にも欠損を示す。また、減数分裂期特異的なものとしてはDMC1遺伝子が知られており、その性質はRAD51遺伝子に似ている(Bishop, et al.,1992)。このように出芽酵母では、組換え欠損の変異株で２重鎖切断とその末端の様子を調べることで、減数分裂期組換えの過程が明らかにされてきた。

ＤＮＡ２重鎖切断が減数分裂期組換えの開始過程であることがわかった一方、その機構についてはほとんど解明されていない。例えば二重鎖切断を起こすヌクレアーゼなども未だ同定されていない。このような２重鎖切断が形成される機構をホットスポット領域を使って研究する興味は、次の２点にある。その１つは２重鎖切断領域の部位特異性がどのような機構で決まっているかということである。組換えのホットスポット領域で高い頻度で２重鎖切断が起こる機構が理解できれば、それを手がかりとして組み換えの制御機構を理解する手がかりが得られると考える。第２は減数分裂期にのみに起こる二重鎖切断の導入の制御機構と切断に直接かかわる機能が、どのような機構で役割分担されるのだろうかということである。細胞核内で２重鎖切断をホットスポットに起こす活性は、減数分裂期にのみ存在するように調節されているはずである。しかしこれまでに二重鎖切断の導入に関与する遺伝子として考えられているRAD50、MRE11、XRS2(Alani, et al. 1990; Ivanov, et al., 1992; Johzuka, K.; personal comm.)は体細胞のDNA傷害の修復にも働いている。つまり、減数分裂期の二重鎖切断の導入に特異的な機能ではない。この他、減数分裂期組換えの開始遺伝子として知られているものには、遺伝子の発現や活性の制御に関与するもの、また染色体構造の形成に関与するものもなどが知られている。つまり組換え開始過程は減数分裂期に特異的な染色体構造の変化にも関連していると考えられる。

２重鎖切断の部位特異性に関して、これまでの研究から得られた知見についてまとめてみる。ＡＲＧ４遺伝子のプロモーター領域にある２重鎖切断部位のホットスッポットの解析を、この領域のいろいろな欠失変異株で調べたとき、本来はDSBが生じないDNA上に２重鎖切断が起こることが観察された(de Massy and Nicolas, 1993)。これは、特異的な塩基配列によってDSBの導入が決定されていない可能性を示している。酵母第３染色体のプロモーターの強さと減数分裂期の二重鎖切断の導入頻度を比べると、そこに比例した相関のあることが観察されている。また、酵母の遺伝子プロモーター領域はクロマチン構造内で、特にDNase Iなどのヌクレアーゼに対して高感受性領域として同定されているが、そのような部位のほとんどには２重鎖切断が形成されることが示されている。特に、PHO５遺伝子のプロモーター領域のヌクレオソーム構造を壊してDNase Ｉの高感受性領域を変化させると、それに伴って２重鎖切断が形成される領域も変化することが示されている(Wu and Lichten, 1994)。　これらの結果は、クロマチン構造で比較的オープンな領域、例えばヌクレアーゼがアクセスしやすい高感受性領域には２重鎖切断が起こることを示している。しかし、Wu and Lichten (1994)は減数分裂期を通してDNase Iの高感受性領域に大きな変化は生じないので、ヌクレオソームポジションだけでは、２重鎖切断の減数分裂期の特異性については説明できないとしている。しかし、減数分裂導入後に、ヌクレオソームとは違ったクロマチン構造の変化が無いという証拠もまたない。このように、２重鎖切断が減数分裂期に特異的におこる制御についての明確な報告は全くない。

本研究は、先ず、２重鎖切断部位を塩基配列上にマッピングし、切断部位に特異的な塩基配列があるのか、それとも切断部位の周辺に特徴的なDNA構造があるかを明らかにすることを試みた。その結果、２重鎖切断としてSouthern blot で同定されるものは、数ヵ所のニックが一本鎖に生じ、２重鎖切断を形成している可能性が示された。第２にその切断は、ヒストンが結合していない領域内の、特定の部位に存在する。しかし、その二重鎖切断部位はヌクレアーゼ高感受性部位と塩基配列上では一致していないことがわかった。従って２重鎖DNA切断は、単にヌクレアーゼの感受性に影響を与えるようなクロマチン構造で決まるのではなく、異なった部位認識機構がある可能性を示した。更に、ヌクレアーゼを切断プローブにしたゲノミックフットプリンティング法により、２重鎖切断領域におけるＤＮ

Ａ－蛋白質の相互作用を観察したところ、ヒストンによるフットプリントは２重鎖切断部位から離れた位置に観察された。またヒストンが結合していない領域に、しかも２重鎖切断部位が観察される近傍にフットプリントが観察された。このフットプリントを示す蛋白質因子の働きについて考察を行った。

Materials and methods

Strains and plasmids

Strains used in this study are NKY278 (MATa/a, ho::LYS2/ho::LYS2, lys2/lys2, ura3/ura3) and NKY1181/1183 (*MATa/a, ho::LYS2/ho::LYS2, lys2/lys2, ura3/ura3, leu2::hisG/leu2::hisG, his4X::LEU2/his4X::LEU2, rad50-KI81::URA3/rad50-KI81::URA3*). (Alani, et al. 1987; Bishop, et al., 1992). They are diploids of SK-1 derivatives gifted from Nancy Kleckner's laboratory.

DNA fragments from two plasmids, pUC(ARG4) and pSG315, were used for Southern analysis (Southern, 1975) to detect double strand break (DSB) sites and nuclease hyper-sensitive (HS) regions of *ARG4* and YCR47c/YCR48w promoter region, respectively. pUC(ARG4) contains a SalI-HindIII fragment of *ARG4* region (Beacham, et al.,1984) and pSG315 has an about 7 kb fragment of YCR47c/YCR48w promoter region and *THR4* gene (Goldway et al., 1993). Sequence informations used in this study can be obtained from data bases.

Meiotic time course analysis

Yeast cells were grown vegetatively in YPD medium (1% yeast extract, 2% Bacto-peptone, 2% glucose) and YPA medium (1% yeast extract, 2% Bacto-peptone, 1% potassium acetate). Cells were sporulated in synchronous meiosis as follows: The fresh colonies on YPD solid media (YPD with 1.5 % agar) was innoculated into 50 ml YPD, pregrown to saturation at 30 °C, diluted into 1 liter of YPA mdeium, in which the concentration of the cell is about 0.2 OD_{600}, and incubated for about 15 hr at 30 °C. Cells were harvested, washed with water twice and transferred to 1 liter of SPM (1% potassium acetate, 0.02 % raffinose). Sporulation was carried out at 30 °C with vigorous shaking.

Southern blot analysis and indirect end labeling metod

About 5 μg of yeast chromosomal DNA was used for detection of DSBs or nuclease HS regions by Southern blot analysis. The DNA was digested with a restriction endonuclease and run on a 0.7% or 1.5% agarose gel. Southern transfer was performed as described (Sambrook et al., 1989, Church and Gilbert, 1984) using Nytran membrane (Schleicher & Schuell). Randomly primed ^{32}P-labeled probes were made and hybridization was carried out as described (Cao, et al., 1990).

To detect the nuclease HS regions by Southern analysis, I used a short DNA fragment (about 200 bases) as a probe located on the terminus of the restriction DNA fragment of interest. This is called as indirect end labeling method.

^{32}P Labeling of oligonucleotides

The oligonucleotides for primers are 5' end-labeled by T4 polynucleotide kinase in the presence of gamma-^{32}P-ATP. This reaction mixture contains 4.5 pmoles of oligonucleotide and 75 μCi (≥ 4000 Ci / mmole) gamma-^{32}P-ATP. After incubation at 37 °c for 2hr, the labeled oligonucleotide is purified by BioGel P-100 (BioRad) spun column chromatography, phenol / chloroform extraction and ethanol precipitation with sodium acetate. The specific activity of primers can be ≥ 2000 Ci / mmole in this reaction.

Nuclease partial digestion of yeast chromatin for genomic footprinting

Protocol of deoxyribonuclease I (DNase I; TAKARA) or micrococcal nuclease (MNase; Boeehringer) partial digestion is a modified version of Huibrestse and Engelke (1991), Hull et al. (1991) or Roth and Simpson (1991). Genomic DNA from about 6x10^9 yeast cells (mitotic or meiotic) was used in one assay. After harvesting from meiotic culture, the pellet of yeast cells was

suspended with 30 ml of 50 mM EDTA, 90 mM 2-mercaptoethanol. Incubation at room temperature for 5 min was followed by the centrifugation. Cells were completely suspended with 30 ml of 1 M sorbitol, 1 mM EDTA, 3 mM 2-mercaptoethanol, and 50 μl of 100 mg / ml Zymolyase 100T (Seikagaku Kogyo) was added to the suspension. After 20 min incubation at 30 °C with vigorous shaking, sheroplasts were collected by centrifugation. To disrupt the cell membrane, cell pellets were suspended with 22 ml of lysis buffer (10 mM Tris-HCl(pH 7.4), 10 mM $MgCl_2$, 5 mM 2-mercaptoethanol) for digestion by DNase I or digestion buffer (10mM Tris-HCl(pH 7.5), 0.5 mM $MgCl_2$, 0.05mM $CaCl_2$) for digestion by MNase. After adding 50 mM (final) of NaCl, complete cell lysis was carried out with 5 strokes of a Dounce homogenizer with a loose paste. In the case of MNase, no salts were added to the lysate.

Cell nuclei in the resulting whole cell lysate were expected to be intact. The partial digestion with nuclease was performed by adding the enzyme directly to the lysates. The optimal concentration of DNase I for the following assays in this condition is 200 Kunitz units / 5.5 ml lysate. The reactions with both 1.4 times higher and lower enzyme concentration were carried out together. The incubation for 10 min. at 18 °C was followed by addition of 5.5 ml of stop buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.6), 2% SDS 50mM EDTA) to terminate the reaction. The optimal concentration of MNase partial digestion is 360 units / 5.5 ml lysate. The reactions with 3 times higher and lower concentration of MNase should be performed together. The incubation of 5 min at 37 °C was followed by adding 5.5 ml stop buffer. The resultant suspension is incubated at 55 °C for 2 hr with 80 μg /ml of proteinase K(Merck). The most of the proteins were supposed to be denatured during this incubation. Further purification step is described in the next section.

Preparation of yeast chromosomal DNA for primer extention assay

Primer extention assay requires highly purified chromosomal DNA because the unknown inpurities inhibit the polymerase reaction which confers intolerant background signals (data not shown). Spheroplasting of cells and cell disruption is described above, but without nucleolytic enzyme digestion.

Completely lysed yeast cell suspension was prepared with the incubation in stop buffer. Each round of phenol, phenol-chloroform, or chloroform extraction with equal volume was followed by overnight incubation at 37 °C with 20 μl of 10 mg / ml RNase A. Chromosomal DNA was further purified by extractions with phenol and chloroform and precipitated by adding 6 ml 7.5 M ammomium acetate and 9 ml of 2-propanol. After the centrifugation, the precipitated DNA was suspended completley with 1.5 ml of 10 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM EDTA. This sample was subject to CsCl-ethidium bromide density gradient centrifugation after adding 1.45 g of CsCl and 75 μl of 10 mg / ml ethidium bromide. The DNA band of chromosomal DNA was recovered after centrifugation at 100,000 RPM for 3.5 hr by HITACHI RP100 vertical roter. Removal of ethidium bromide with NaCl-saturated 2-propanol extraction was followed by ethanol precipitation, and chromosomal DNA was resuspended with 4 ml of 10 mM Tris-HCl (pH7.5), 1 mM EDTA and reprecipitated with 50 μl of 3 M sodium acetate (pH5.2) and 900 μl of ethanol. The DNA sample was suspended with about 50 μl of 10 mM Tris-HCl (pH7.5).

Primer extention for detection of DSB sites or nuclease hyper sensitive sites

Cycling reaction with a thermostable DNA polymerase is advantageous for the detection of DSB sites or nuclease HS sites. The genomic DNA was digested with an

appropriate restriction enzyme which did not cut the region of interest. This step was necessary to produce the stronger signals in this assay. The reaction mixture (30 μl) contained about 0.3 pmoles of ^{32}P-labeled oligonucleotide as primer (5 to15 x10^5 cpm), chromosomal DNA from 2x10^8 cells and also 10mM Tris-HCl (pH 8.9), 3 mM $MgCl_2$, 80 mM KCl, 500 μg /.ml BSA, 0.1 % sodium cholate, 0.1% TritonX-100, 200 μM each of dATP, dCTP, dGTP or dTTP. An enzyme, delta Tth DNA polymerase, was purchased from TOYOBO. Condition of the thermocycle reaction was 5 min. preincubation at 94 °C for denaturing the chromosomal DNA, followed by 30 cycles of 94 °C 1min., 60-70 °C (depending upon primers) 2 min., and 75°C 3 min. The products were purified by extraction by phenol / chloroform and ethanol precipitation with sodium acetate. The sample was suspended with 7.5 μl of water, and mixed with an equal volume of urea dye (8 M urea, 0.5 % BPB, 0.5 % XC). After heating (5 min. at 95 °C) and chilling (5 min. on ice) of the samples, aliquots were subject to DNA sequencing gel (6 % polyacrylamide, 8 M urea, 1x TBE) electrophoreses. Phosphoimage analysis (Fuji BAS2000) and autoradiography were performed for identifying the exention products.

The DSB sites or nuclease HS sites were determined by compairing of bands of the products to dideoxy sequence ladder extended from the same primers. A DNA fragment with dideoxy terminus runs half base faster than corresponding DNA with deoxy terminus in a sequencing gel. Furthermore, since delta Tth DNA polymerase has a 3'-terminal transferase activity that adds one nucleotide to a synthesized DNA (Clark, 1988), the extented DNA has one base longer than a run-off product from the opposite template strand with a cutting site. According to the above criteria, the DSB sites or nuclease hyper-sensitive (HS) sites were mapped exactly on a nucleotide level.

結　果

●サザン法による２重鎖切断の位置決定

減数分裂期組換えのホットスポットに生じる２重鎖切断をＤＮＡ塩基配列上に決定するため、減数分裂期特異的な２重鎖切断部位として初めて同定され、遺伝子変換のホットスポットとして知られているＡＲＧ４遺伝子のプロモーター領域（以下ＡＲＧ４領域）(Nicolas et al, 1989; Sun et al, 1989; Fig. 2)を実験に用いた。このＡＲＧ４領域は２重鎖切断部位に関する解析が最もよく進んでおり、Southern blo法によって切断部位はおおまかに決められている(Sun et al., 1991)。また第三番染色体ＴＨＲ４遺伝子より５ｋｂ程セントロメア側のＹＣＲ４７ｃ－ＹＣＲ４８ｗ遺伝子プロモーター領域（以下４７Ｃ－４８Ｗ領域）(Fig. 2)は第三番染色体で最も２重鎖切断が高頻度に観察される領域(Zenvirth et al., 1992; Goldway ,M. et al., 1993)であるため、塩基配列上で２重鎖切断部位を検出するときも強いシグナルを得ることが期待できる。これらの切断部位を決定するために、二重鎖切断は形成されるが、野生株とは異なり、その切断末端が分解や修復を受けず、減数分裂期が進行しても安定して残ることがわかっているｒａｄ５０Ｓ変異株の染色体ＤＮＡを使用した。(Cao, et al., 1990; Sun et al., 1991)。ＡＲＧ４領域についてはすでにマッピングされており、ＡＲＧ４のコーディング配列の上流側に１８５ベースから２００ベースの範囲にあると結論されている(Sun et al., 1991)。４７ｃ－４８ｗ領域に関してはＸｈｏＩで染色体ＤＮＡを分解し、1.5%アガロースゲル電気泳動で分離した後、ＡｆｌＩＩ－ＳａｌＩ断片をプローブにしてSouthern Blot 法で解析した。Fig. 2にこの領域の制限酵素地図とSouthern Blot の結果を示す。このマッピングによって４７ｃ／４８ｗ領域の２重鎖切断は４７ｃと４８ｗ遺伝子の間にあるＣｌａＩ部位から８０ｂｐ程度４８ｗ遺伝子側におこることが解った。しかしながら２重鎖切断によって生じるバンドは幾分太いことから、切断末端は一カ所ではないことが予想された。

●プライマー伸長法の概要

２重鎖切断領域の同定で得られた結果をもとに、切断部位を塩基配列上に決定するときに用いるプライマーを作成した。実験を行っている間にプライマーとして用いる塩基配列とその位置の選択が、この実験を成功させ

るために重要であることが判明した。プライマーからDNA鎖を伸長した時、プライマーの位置から約５０ベース以内はバックグラウンドが高く、正確なデーターを得るためには適さない。従って、プライマーは解析したい領域から少なくとも５０ベース離れた位置に設定する必要がある。また、プライマーの塩基配列に依存する非特異的なシグナルはある程度避けられないが、それが調べたい領域に強く現れる時も、勿論そのプライマーはこの解析に不適である。後者に関しては予測が不可能であるため、プライマーの決定はある程度試行錯誤が必要であった。これらの実験を通して、今回の解析に使用したオリゴヌクレオチドプライマーの構造とその位置をFig. 4に示す。

プライマー伸張法による二重鎖切断領域の決定法の詳細は、実験方法に書いてあるが、Fig. 5にその原理を簡単にまとめた。rad50S変異株を減数分裂期に導入し、導入直後（０ｈｒ）と減数分裂期に入って二重鎖切断が蓄積した時期（８.５ｈｒ）の染色体DNAを分離し、^{32}Ｐで末端標識したオリゴヌクレオチドからDNAポリメラーゼによるDNA鎖伸長反応を行った。二重鎖切断部位ではDNA合成の鋳型が無くなるので、その部位で合成が止って産物が蓄積する。この切断末端で得られるrun-off生成物を６％アクリルアミドのシーケンスゲルで分離し、オートラジオグラフまたはイメージアナライザーで検出して解析し、０ｈでは検出されず、８.５ｈｒで現われるシグナルを二重鎖切断部位と結論した。この方法では、一回の実験で、片方の鎖の切断位置が検出できることになるが、厳密な意味では片方の鎖の切断の５’側に存在するすべての切断を観察することになり、ＤＮＡ二重鎖切断部位の他に、一本鎖上にのみ生じた切断も同様に検出される。従って、２重鎖切断部位として同定するためには、両鎖の切断部位を決定し、切断が両鎖の同じ位置、もしくは数ベース以内の近傍に検出される場合に、その部位が２重鎖切断部位であると同定した。

●２重鎖切断部位のヌクレオチドマッピング

Fig. 6にプライマー伸長法によって検出された４７ｃ－４８ｗ領域の切断部位の結果を示す。便宜上、プライマー＃４で検出されるシグナルをＷ（ｗａｔｏｓｏｎ）鎖のシグナル、プライマー＃２のそれをＣ（ｃｒｉｃｋ）鎖のシグナルとする。切断部位決定はバックグラウンドによる誤まりを防ぐために、３回の独立した実験を行って決定した。

得られた結果を塩基配列上に示したものがFig. 7aである。この結果が示すように、シグナルはW鎖、C鎖共にかなりの数存在し、その位置は少なくとも８０ベースの範囲にわたって観察された。プライマー＃２で調べられない領域にも切断部位の存在することが、プライマー＃４で得られたW鎖の結果からわかる。この事実は、47c-48w領域の２重鎖切断がSouthern Blot 法では一ケ所の切断部位として検出されていたが、実際には１００ベース以上の範囲に、数ケ所に生じる切断から構成されていることが明らかになった。これは図２に示したSouthern Blot 法で得られたバンドの巾が単一バンドとしては太いことから、２重鎖切断が数ケ所に存在するのではないかと言う予測と一致している。

同様な方法でＡＲＧ４遺伝子の２重鎖切断部位を検出したオートラジオグラフィーをFig. 8に、その結果を塩基配列上にまとめたものをFig. 7bに示す。。ここでもプライマー＃５で検出されるシグナルをW鎖のシグナル、プライマー＃７で検出されるそれをC鎖のシグナルと呼ぶ。ARG4領域の２重鎖切断部位も４７ｃ－４８ｗ領域と同様に、一カ所では無く、明瞭な切断部位として３カ所の切断部位が約２０ベースの範囲内に検出された。しかし、切断部位の数も観察される範囲も４７ｃ－４８ｗ領域に比べて、少なく、狭かった。47W-48C領域の切断がARG4領域の切断量より多く、実際に組換え頻度も47W-48Cの方がARG4領域より高いことから、切断部位の数や切断が起こる範囲が、それぞれの組換えのホットスポット領域に生じる２重鎖切断の頻度と組換え頻度を決めていると考えられる。

二つの領域で２重鎖切断部位をマッピングした結果、切断箇所のシグナルの強さはその領域内の切断ケ所で一様でなはく、強弱が存在していることがわかった。これは一つの領域内に存在する複数個の切断部位でも、切断が起こる頻度に差がある事を示しており、２重鎖切断にはDNA構造上での部位特異性が存在していることを示唆している。このような特異性を決める最も単純な機構は塩基配列によるものと考えられるが、２重鎖切断部位の塩基配列には共通点を見いだすことはできなかった。むしろ切断が起こる部位の塩基配列はランダムであり、２重鎖切断の部位特異性が塩基配列とは異なる認識機構で決定されていると考えられる。

今回のマッピングの結果で得られた２重鎖切断部位の中で、切断のシグナルが高く検出されたものをFig. 9にまとめて示した。これから２重鎖切断部位でW鎖、C鎖の対応する切断によって生じる「切り口」の構造は一種

類ではなく、ある部位では平滑末端を生成することが予測され、別の部位では突出末端が生成される。また、ある部位ではW鎖とC鎖の切断頻度が大きく異なっている。このような末端構造の特徴は、２重鎖切断に関与する蛋白質（例えばエンドヌクレアーゼ）が２本鎖DNAを切断するものではなく、一本鎖DNAに切断を入れるような活性を持つ蛋白質である可能性を示している。

●クロマチンＤＮＡのヌクレアーゼによる部分加水分解とゲノミックフットプリント法の概要

２重鎖切断領域のＤＮＡが細胞内で、蛋白質とどのような相互作用をしているかを、ゲノミックフットプリント法を使用して調べた（Fig. 10）。ここでは相互作用をヒストン性と非ヒストン性の二種類に分けて観察することを試みた。この方法でヒストンオクタマーによるフットプリントが検出できれば、２重鎖切断部位がクロマチン構造のどのような領域に存在しているのかを明らかにできる。また、非ヒストン性のフットプリントが検出できれば、それは２重鎖切断部位に特異的なＤＮＡ－蛋白質の相互作用が存在することを示し、２重鎖切断機構を明らかにする上での大きな手がかりとなると考えた。実験の詳細は実験方法に述べてあるが、概略を述べると以下のとおりである。

酵母のスフェロプッラストを細胞核を壊さないように溶かしｗｈｏｌｅｌｙｓａｔｅを調製する。それを直接ヌクレアーゼの部分加水分解処理をして、染色体ＤＮＡを精製する。コントロールとして染色体DNAを精製した後ヌクレアーゼで部分加水分解したものを作成する。これらのDNAを鋳型にして目的の領域についてプライマー伸長法でヌクレアーゼによる切断部位を決定する。両者の切断パターンを比較した時、クロマチン内で保護されている領域がフットプリントとして検出される。このときｌｙｓａｔｅにいきなりヌクレアーゼを加えて部分加水分解を行うのは、集菌からの時間と手順を短くしてクロマチンの破壊をなるべく少なくするためである。また、ゲノミックフットプリントに用いるヌクレアーゼの量は、DNA分子一個に平均１ケ所以下の切断を入れる量で部分加水分解を行う。

Fig. 11に典型的なヌクレアーゼの部分加水分解の結果を示す。染色体ＤＮＡをＤＮａｓｅＩ、または、マイクロコッカルヌクレアーゼ（ＭＮａｓｅ）で処理し、0.7％のアガロースゲル電気泳動で分離し、エチジウムブロ

ミド染色で検出した。大体のヌクレアーゼ濃度が決まった後、最も適した分解を与えるヌクレアーゼの濃度の決定は、目的とするDNAを実際にフットプリントを行って決定した。その結果、分解する染色体ＤＮＡが２から１５ｋｂ程度の大きさであれば、最も良いフットプリントの結果が得られることがわかった。また、細胞を溶解する過程でクロマチン構造が破壊されないで保存されているかの検定は、ＤＮａｓｅＩ処理に関してはＡＲＧ４部位で間接末端標識法で確認した（Fig. 11）。このときＤＮａｓｅＩ高感受性部位が検出されれば、クロマチン構造が壊れていないと判断した。また、ＭＮａｓｅに関してはヌクレオソームのリンカー部分を切る特異性が高いので、クロマチンを切断したあと、染色体ＤＮＡをアガロースゲル電気泳動で分離すると、特徴的な１６０ベース単位のラダーが観察される。このラダーが顕著に観察された試料をクロマチン構造が保存されているものと判断した。

●間接末端標識法によるＤＮａｓｅＩ高感受性領域の検出

Wu and Lichten, (1994)は２重鎖切断部位のバンドが、クロマチンでＤＮａｓｅＩ処理をした時に高感受性領域として検出されるバンドの位置と一致することから、２重鎖切断部位はHHS部位と一致すると報告した。ここでは４７ｃ－４８ｗ領域のＤＮａｓｅＩ高感受性領域をWu等と同じ間接末端標識法を用いて調べたが、分解能を高めるために調べる領域の制限酵素断片の長さがより短くなるようにして解析した。ｒａｄ５０Ｓの減数分裂期染色体DNAと野生株の有糸分裂期染色体ＤＮＡをＤＮａｓｅＩで部分加水分解を行ったものをＢａｍＨＩで分解し、片端のＢａｍＨＩ－ＸｈｏＩの約３５０ベースのプローブでサザンブロットをおこなった。Fig. 12の結果が示すように、ｒａｄ５０Ｓで観察される２重鎖切断部位は、ＤＮａｓｅＩ高感受性部位とほぼ同じ領域に存在するが、厳密には、ＤＮａｓｅＩに対する高感受性領域として検出される領域内の一部分である。従って、４７ｃ－４８ｗ領域の２重鎖切断部位は、ヌクレアーゼに高感受性の部位とは完全には一致しない。

●ヌクレアーゼ高感受性部位（ＨＳＳ）と２重鎖切断部位の関係

まず、ゲノミックフットプリント法により、クロマチン上でのヌクレアーゼ高感受性部位（ＨＳＳ）を同定した。減数分裂期に移行した直後から

２重鎖切断が頻繁に起こる４時間目までの間（０、２、４時間）の野生型細胞からクロマチンＤＮＡを調製した。Fig. 13は４７ｃ－４８ｗ２重鎖切断領域について、ＤＮａｓｅＩをプローブにしてＨＳＳを同定したパターンを示し、その結果を塩基配列上にまとめて記したものがFig. 14に示してある。

この結果は、（１）クロマチンDNAの２重鎖切断領域のＤＮａｓｅＩ切断パターンは、精製した染色体ＤＮＡのそれとほぼ似ており、この領域は基本的にＤＮａｓｅＩによる切断の特異性に従って切断されている。（２）従って、クロマチンと精製したＤＮＡとで切断パターンを大きく変えるような蛋白質の結合は観察されない。一方（３）クロマチンDNAでは、この切断パターンの似た領域から離れた領域で、２重鎖切断が観察されないところで、プライマー＃２、および、プライマー＃４でクロマチンに特異的なシグナルが観察されることを示している。この結果からだけでは、ヌクレオソームのポジションを塩基配列上に決定できないが、間接末端標識法で得られた高感受性領域のマッピングの結果とあわせると、これはヒストンオクタマーによるフットプリントであると予測できる。

以上の結果は、クロマチン構造の中で２重鎖切断が起こる領域には基本的にヒストンオクタマーが形成されておらず、他方、ヒストンオクタマーが形成される場所には２重鎖切断が生じないことを示している。ＡＲＧ４部位においてＤＮａｓｅＩに対するＨＳＳを同定した際も、同様の結果が得られている（Fig. 15, 16）。即ち、ＡＲＧ４領域の２重鎖切断部位の周辺はヒストンフリーな状態である。ＡＲＧ４領域では２重鎖切断部位が約２０ベースの範囲にわたって観察されたが、ヒストンフリーな領域はそれよりも広い範囲にわたっていることが観察された。一方、ＡＲＧ４のクロマチン構造は、解析に都合の良いプライマー＃４があったため、ヒストンによるフットプリントが明瞭に観察され、ヌクレオソームがポジションしている領域には２重鎖切断が生じないことが明確に示された（Fig. 17）。

ＤＮａｓｅＩに対するＨＳＳと２重鎖切断部位の関係については、塩基配列上で両者は必ずしも一致しないことがわかった。この結果の意味することは、ＤＮａｓｅＩが示す切断の特異的部位に必ずしも２重鎖切断が入るのではないこと、また逆に、２重鎖切断がおこる部位でもＤＮａｓｅＩに対してＨＳＳにならないことである（Fig. 14, 16）。特に、ＡＲＧ４の２重鎖切断部位周辺には、精製したＤＮＡにはないクロマチン特異的なＤ

ＮａｓｅＩに対するＨＳＳが比較的明瞭に観察されるが、このような部位が２重鎖切断部位とは必ずしも一致していない。このように、ヌクレアーゼ高感受性部位（ＨＳＳ）と２重鎖切断部位が必ずしも一致しない事は、MNaseを使ったゲノミックフットプリントでも示されている（Fig. 18）。

４７ｃ－４８ｗ領域のクロマチンに特異的なＭＮａｓｅに対するＨＳＳは、ＤＮａｓｅＩの場合よりも明瞭に現れるので、その切断部位の違いはより明確に示された。クロマチン構造の中で比較的オープンになった領域や、ヌクレアーゼに対してＨＳＳな領域であっても、２重鎖切断が生じるとは限らず、２重鎖切断の生じる位置は特異的であると結論できる。これらの結果は２重鎖切断を挿入する部位の決定（例えば関与するエンドヌクレアーゼの切断部位の認識）が特異的な塩基配列によるのではなく、広い領域で決まるDNA構造、または、特異性を決める因子のあることを示唆している。

●２重鎖切断部位のＤＮＡ－蛋白質相互作用

次に、クロマチンＤＮＡと蛋白質因子の相互作用、特に非ヒストン性蛋白質との相互作用について、４７ｃ－４８ｗ領域を用いて解析した。Fig. 18の結果からもわかるように、この目的のジェノミックフットプリントにはＭＮａｓｅがプローブに適していた。Fig. 18では、４７ｃ－４８ｗ領域のクロマチンで特異的なフットプリントが観察される。特に、プライマー＃４で検出される明瞭なフットプリントは、この領域で最も強い２重鎖切断部位の２ベース横に位置している。このようなフットプリントは減数分裂期を通して変化しない。このフットプリントを形成する蛋白質因子は２重鎖切断の部位特異性を決定するために働く因子か、減数分裂期にのみ切断を誘導する制御因子であると考えられる。

クロマチンの試料では精製したＤＮＡよりも強い切断のシグナルが特定の部位に観察される。例えば、フットプリントが観察される部位のすぐ横に特異的な強い切断が観察されているが、これは蛋白質が結合して生じたＤＮＡ構造の変化により生じたＨＨＳと考えられる。この考えはクロマチン特異的なフットプリントの近傍に、クロマチン特異的な切断部位が観察されることからも支持される。また、このようなクロマチンに特異的なシグナルは、ＤＮａｓｅＩをプローブにしたジェノミックフットプリンティングでも観察されるが、ＭＮａｓｅのように明瞭なフットプリントは殆ど

得られなかった。

ゲノミックフットプリンティングで観察される、MNaseに対する感受性部位の中には減数分裂期の時間経過で変化するものがある。特に、４７ｃ－４８ｗの２重鎖切断領域をＭＮａｓｅをプローブにしたときに明瞭に観察された。多くのＭＮａｓｅに対するＨＳＳは、減数分裂期のクロマチンでより切断シグナルが強くなるが、これらの部位は２重鎖切断部位の近傍に生じるものもあれば、逆に離れた場所に存在するものもある。このような減数分裂期に高感受性になる部位は、減数分裂期に特異的な組換えのホットスポットになるための共通なＤＮＡ構造の存在を反映している可能性を示しているとも考えられるし、減数分裂期特異的なクロマチン構造の変化の存在を示している可能性もある。また減数分裂期にのみ保護されるフットプリントが、２重鎖切断部位にＤＮａｓｅ　Ｉによるフットプリントで観察された。今後、これらの因子の解析が減数分裂期組換えの開始の制御や開始過程そのものを明確にする手掛かりを与えると考える。

考　察

本研究は、減数分裂期組換えの開始過程である２重鎖切断に注目し、その切断部位を塩基配列上でマッピングした。その結果、従来一つの２重鎖切断として検出されていた領域内に、ＤＮＡ上には切断部位が複数ケ所存在していることがわかった。また、２重鎖切断の末端構造は、平滑末端や突出末端など多様であった。更に、ゲノミックフットプリントによる解析は、このような２重鎖切断部位はヌクレアーゼの高感受性部位とは必ずしも一致しないこと、クロマチン内で２重鎖切断部位の近傍にフットプリントが観察される事を示し、２重鎖切断は特異的な部位に生じ、その部位には特異的なＤＮＡと蛋白質の相互作用がある事を明らかにした。

●２重鎖切断部位とホットスポット領域の組換え頻度

今回解析した４７ｃ－４８ｗ領域とＡＲＧ４領域の二つの減数分裂期組換えのホットスッポット領域では、検出される２重鎖切断部位の数や、その分布に違いがあった（Fig. 4a,b）。４７ｃ－４８ｗ領域では明瞭な切断部位が少なくとも９カ所あるのに対して、ＡＲＧ４領域では３カ所のみの切断部位が存在した。また、これらの２重鎖切断部位は、４７ｃ－４８ｗ領域では１００ベース以上の範囲わたって検出されたのに対し、ＡＲＧ４領域では最大でも２０ベース以内に存在していた。これらの結果は、一つの組換えホットスッポットに生じる切断部位の数や、その部位が存在する領域の広さが、２重鎖切断頻度や、組換え頻度を決める要因であることを示唆している。この可能性は、実際に４７ｃ－４８ｗ領域の方がＡＲＧ４領域よりも２重鎖切断頻度が高く、組換え頻度が高いと言う結果と良く一致することから支持される(Wu and Lichten, 1994; de Massy and Nicolas, 1993)。更に、同一ホットスポット領域内にある切断部位の間でも、２重鎖切断がおこる頻度に差がみられた。従って、このような一つの部位での切断頻度も、ホットスポット領域全体の組換え頻度に影響を与えていると考えられる。

●２重鎖切断の部位特異性

同一領域内の塩基配列上に決定された二重鎖切断部位の切断頻度は一様でなく、またヌクレアーゼ高感受性部位と２重鎖切断部位が必ずしも一致

しない。しかも、塩基配列上に共通の構造を検出することはできず、それぞれの切断部位の塩基配列はほぼランダムであったので、二重鎖切断部位には明らかに部位特異性が存在しない様に見える。しかし、その中でも塩基配列が特徴的であると考えられる２重鎖切断部位を挙げるとしたら、二カ所ある。一つはＡＲＧ４領域で最も切断が強く観察される部位で、この切断部位は１０ベース(AATCATGATT)からなるパリンドローム構造の丁度真ん中に存在する。もう一つは４７ｃ－４８ｗ領域で最も強い２重鎖切断部位である（図６？）。この部位(CCCGGCCG)はＡ／Ｔに富んだこの領域の中で、特別にＧ／Ｃ配列が連続している部位である。このような塩基配列を持つＤＮＡでは、その構造が２重鎖切断が起こりやすくなる様な構造になっているのかも知れない。今回解析した２つのホットスポット領域全体で、塩基配列の特徴は２重鎖切断部位にＡ／Ｔのｔｒａｃｔｓが存在していることである（Fig. 2）。４７ｃ－４８ｗの２重鎖切断部位はこのＡ１５を挟んで両側に観察された。一方、ＡＲＧ４領域では約１２０ベース離れて存在するＴ１０とＡ１４のｔｒａｃｔｓのほぼ真ん中に２重鎖切断部位が存在している(Fig. 7)。このようなＡ、もしくはＴの連続した配列はＤＮＡ湾曲を起こし、また、このような配列はヌクレオソーム構造をとることができない(Thoma, 1992)。従って、このような配列そのものが持つＤＮＡの特殊な性質が周辺でポジションしているヌクレオソームの影響を受けて形成される染色体構造で、２重鎖切断部位の部位特異性を決定している可能性が考えられる。

ＰＨＯ５遺伝子のプロモーター領域に形成されるヌクレオソームを破壊すると、その領域は新たに２重鎖切断部位となることが報告されている(Wu and Lichten, 1994)。この結果からは、ヒストンオクタマーが形成されていない領域ならば、そこには必ず２重鎖切断が形成されると考えることができる。しかし、塩基配列上に２重鎖切断部位を決定した結果、ヌクレオソーム構造をとっていない領域でも２重鎖切断が起こる部位と起こらない部位のあることがわかった。この事実は、２重鎖切断が起こる部位は、ヌクレオソームの内にあるか否かだけで決定されるのではないことを示している。Wu and Lichten, (1994) が示した結果は、ヌクレオソームを破壊して、「オープンに」した領域内に、偶然に２重鎖切断の部位特異性を満たす条件を備えた部位があったと考えられる。このような部位特異性がどのような機構で決定されているかは現在のところ不明であるが、今回の

ゲノミックフットプリンティングで、２重鎖切断領域に特異的なＤＮＡ－蛋白質の相互作用が観察されたことは、２重鎖切断の部位に特異的なDNA構造や蛋白質の関与があることを強く示唆している。

●２重鎖切断の減数分裂期特異性の決定

出芽酵母の遺伝子には、プロモーターをヌクレオソームの中に存在させるか外に存在させるかで、転写因子の結合の仕方を変化させて、転写調節を行っているものがある(Almer et al., 1986)。また、転写調節因子の中には、ＤＮＡに結合した時にプロモーター領域のヌクレオソーム構造を大きく変えて転写量を変化させるものも存在する(Morse, 1993)。酵母の２重鎖切断も遺伝子のプロモーター領域に起こり、しかも切断の挿入頻度とプロモター活性に相関があると言う結果が得られている。従って、減数分裂期の２重鎖切断が起こる時期にのみ２重鎖切断部位のヌクレオソーム構造が破壊されるような機構も想定できる。しかし、今回のジェノミックフットプリントの結果では、２重鎖切断領域にヒストンによるフットプリントは検出されなかった。また、間接末端標識法によるヌクレアーゼに対して高感受性領域を調べた結果では、２重鎖切断部位には減数分裂期、体細胞分裂期を問わずヒストンが存在し無いことを示した。従って、ヌクレオソームのポジションの変化によって２重鎖切断が減数分裂期に特異的に起こるような調節機構の存在は考えにくい。

２重鎖切断領域に存在するヌクレアーゼに対する高感受性部位の中には、減数分裂期でその感受性の程度に変化を示す部位のあることが観察された。しかし、このような高感受性部位は２重鎖切断部位とは必ずしも一致しなかったので、２重鎖切断との関係はまだ明きらかでない。しかし、減数分裂期になってヌクレアーゼに高感受性になるような変化は、減数分裂期に特異的なＤＮＡの構造の変化を反映している可能性があり、そのような構造変化が減数分裂期にのみ２重鎖切断を生じさせる制御機構となっているかも知れない。

●２重鎖切断を生じさせる活性の特徴

減数分裂期の２重鎖切断には、エンドヌクレアーゼなどによるＤＮＡ切断活性が関与していると仮定して、今回の２重鎖切断部位のマッピングの結果を考察すると、特異的ヌクレアーゼの存在を予測することはできない。

Fig. 9に切断のシグナルが高い切断部位についてまとめたが、これらの切断部位で、W鎖、C鎖の切断によって生じる「切り口」は一種類ではない。ある部位では平滑末端が生じることが予測され、別の部位では突出末端が予想される。その突出末端も5’が飛び出ていたり、3’が飛び出ていたり、その飛び出しが1ベースであったり2ベースであったり一様でない。この結果は、予測しているＤＮＡ切断活性が、（ａ）二重鎖DNAの切断に、塩基配列特異性を示さない活性が存在する。（ｂ）実際は一本鎖ＤＮＡのみを切断する活性が存在し、２重鎖切断はこの一本鎖切断が両鎖上で近傍に生じて形成されているものである。この後者の可能性は同じ２重鎖切断部位でも、W鎖とＣ鎖では切断の効率が違う部位が存在していることからも支持される。同時に二本鎖を切断する活性が存在するならば、両鎖を同頻度で切断されることが容易に考えられる。

●２重鎖切断部位に特異的なＤＮＡ結合蛋白質の機能

４７ｃ－４８ｗ領域には、ゲノミックフットプリント法で２重鎖切断部位に特異的なＤＮＡ－蛋白質相互作用が検出された。このフットプリントには、減数分裂期を通して変化しないものと、減数分裂期に特異的に検出されるものがあった。このＤＮＡ結合蛋白質は２重鎖切断の部位特異性を満足していることから、２重鎖切断機構やその制御機構に関与する因子である可能性が強い。この因子の機能として考えられるのは２重鎖切断を起こす部位の決定である。このフットプリントを与える蛋白質とそれをコードする遺伝子の同定がその機能を解析する上で必須であり、今後の課題である。

References

Alani, E., Cao, L. and Kleckner, N., (1987) Genetics **116:** 541-545

Alani, E., Padmore, R. and Kleckner, N., (1990). Cell **61:** 419-436

Almer, A., Rudolph, H., Hinnen, A. and Horz, W., (1986). EMBO J. **5:** 2689-1986

Beacham, I. R., Schweitzer, B. W., Warrick, H. M. and Carbon, J., (1984). Gene **29:** 271-279

Bishop, D. K., Park, D., Xu, L. and Kleckner, N., (1992). Cell **69:** 439-456

Cao, L., Alani, E. and Kleckner, N., (1990). Cell **61:** 1089-1101

Church, G. M. and Gilbert, W., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81:** 1991-1995

Clark, J. M., (1988) Nucleic Acids Res. **16:** 9677-9686

de Massy, B. and Nicolas, A., (1993). EMBO J. **12:** 1459-1466

Goldway, M., Sherman, A., Zenvirth, D., Arbel, T. and Simchen, G., (1993). Genetics **133:** 159-169

Goyon,C. and Lichten, M., (1993). Mol. Cell. Biol. **13:** 373-382

Huibrestse, J. H. and Engelke, D. R., (1991). Methods in Enzymol. **194:** 550-562

Hull, M. H., Thomas, G., Huibrestse, J. H. and Engelke, D. R., (1991). Methods in Cell Biol. **35:** 383-415

Ivanov, E. L., Korolev, V. G., and Fabre, F. (1992). Genetics **132:** 651-664

Morse, R. H., (1993). Science **262:** 1563-1566

Nicolas, A., Treco, D., Schultes, N. P. and Szostak, J. W., (1989). Nature **338:** 35-39

Ogawa, T., Shinohara, A., Nabetani, A., Ikeya, T., Yu, X., Egelman, E., H. and Ogawa, H., (1994). Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. **58:** 567-576

Roth, S. Y. and Simpson, R. T., (1991). Methods in Cell Biol. **35:** 289-314

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T., (1989). Molecular cloning, second ed. (Cold Spring Harbor, N.Y.)

Schultes, N. P. and Szostak, J. W., (1991). Mol. Cell Biol.,**11:** 322-328

Shinohara, A., Ogawa, T. and Ogawa, H., (1992). Cell **69:** 457-470

Southern, E., (1975). J. Mol. Biol. **98:** 503-517

Sun, H., Treco, D., Schultes, N. P. and Szostak, J. W., (1989). Nature **338:** 87-90

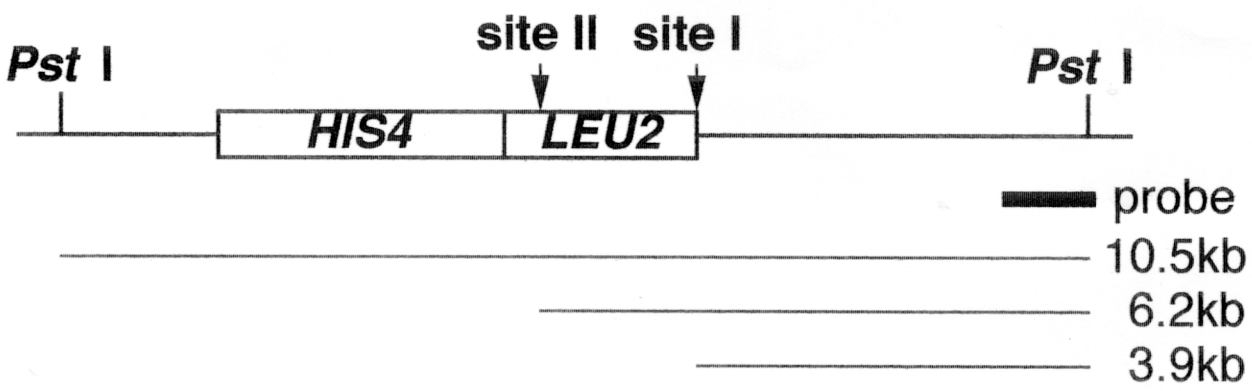
Sun, H., Treco, D. and Szostak, J. W., (1991). Cell **64:** 1155-1161

Thoma, F., (1992). Biochem. Biophys. Acta **1130:** 1-19

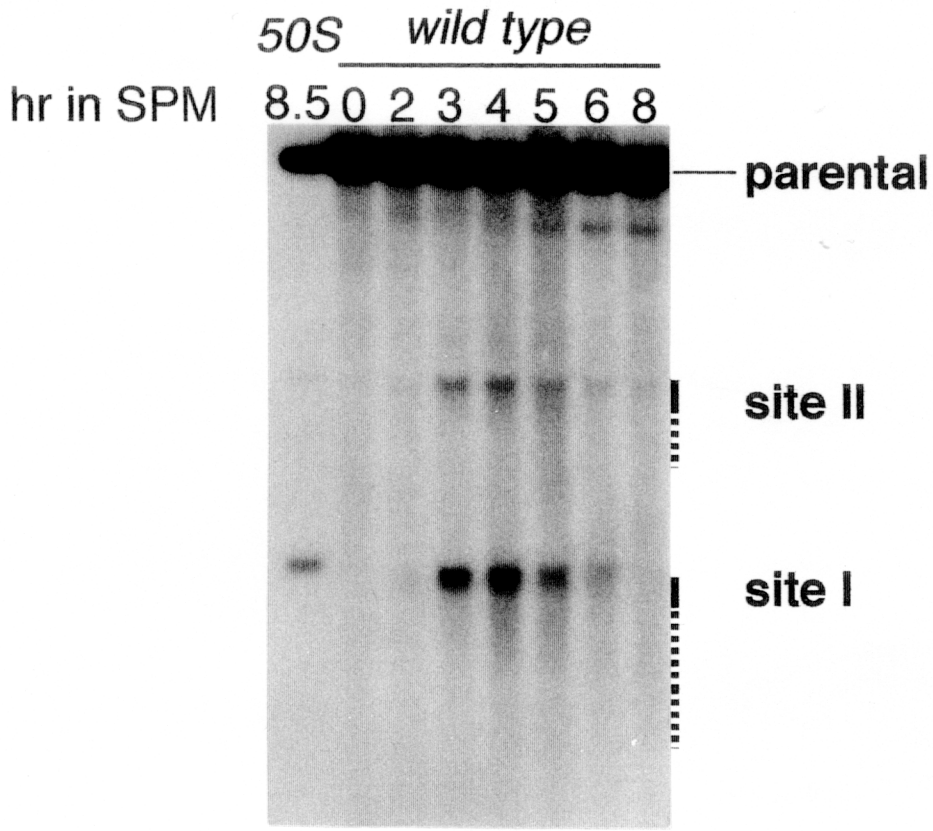
Wu, T.-C. and Licten, M., (1994). Science **263:** 515-518

Zenvirth, D., Arbel, T., Sherman, A., Goldway, M.,Klein, S. and Simchen, G., (1992) EMBO J. **11:** 3441-3447

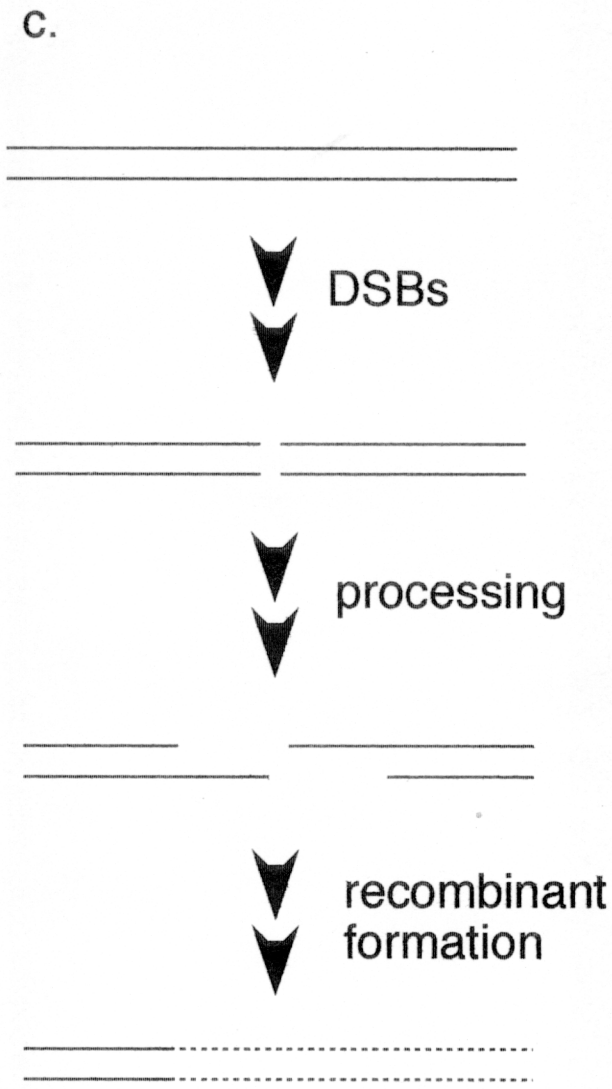
a.


site II
site I
Pst I
Pst I
HIS4
LEU2
probe
10.5kb
6.2kb
3.9kb

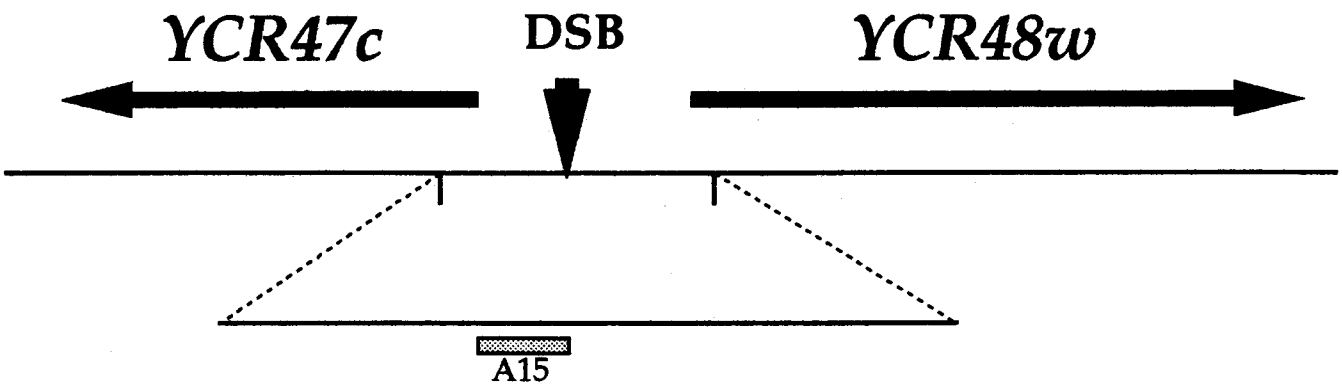
b.


50S
wild type
hr in SPM
8.5 0 2 3 4 5 6 8
parental
site II
site I

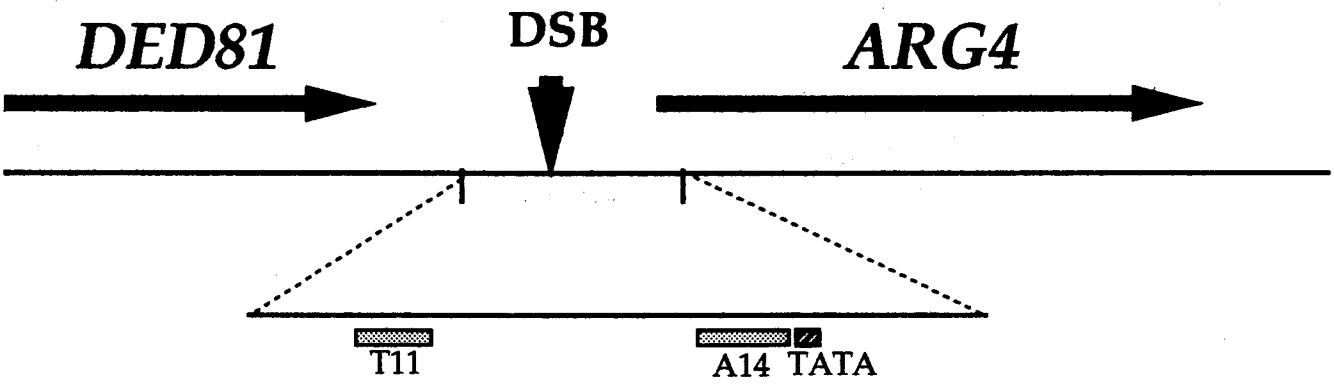
c.


DSBs
processing
recombinant
formation

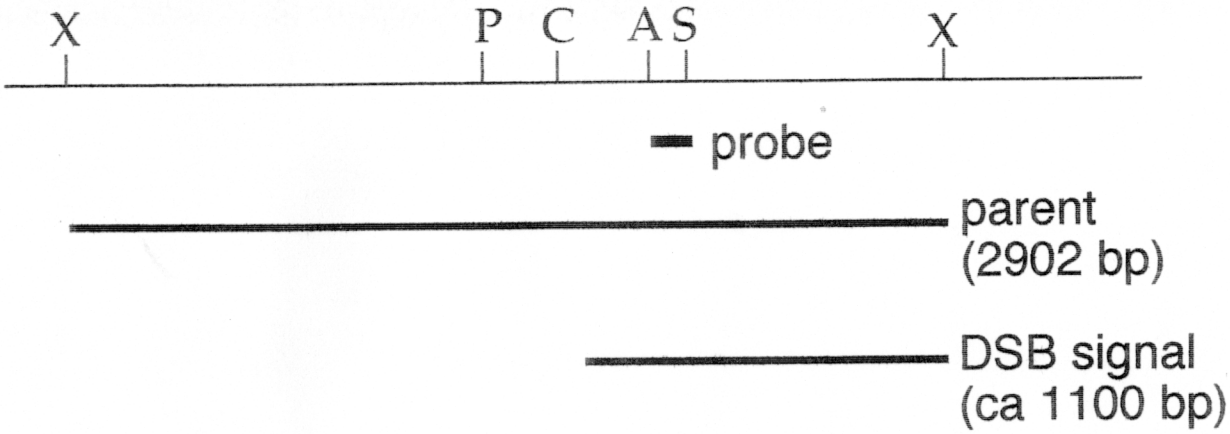
a.



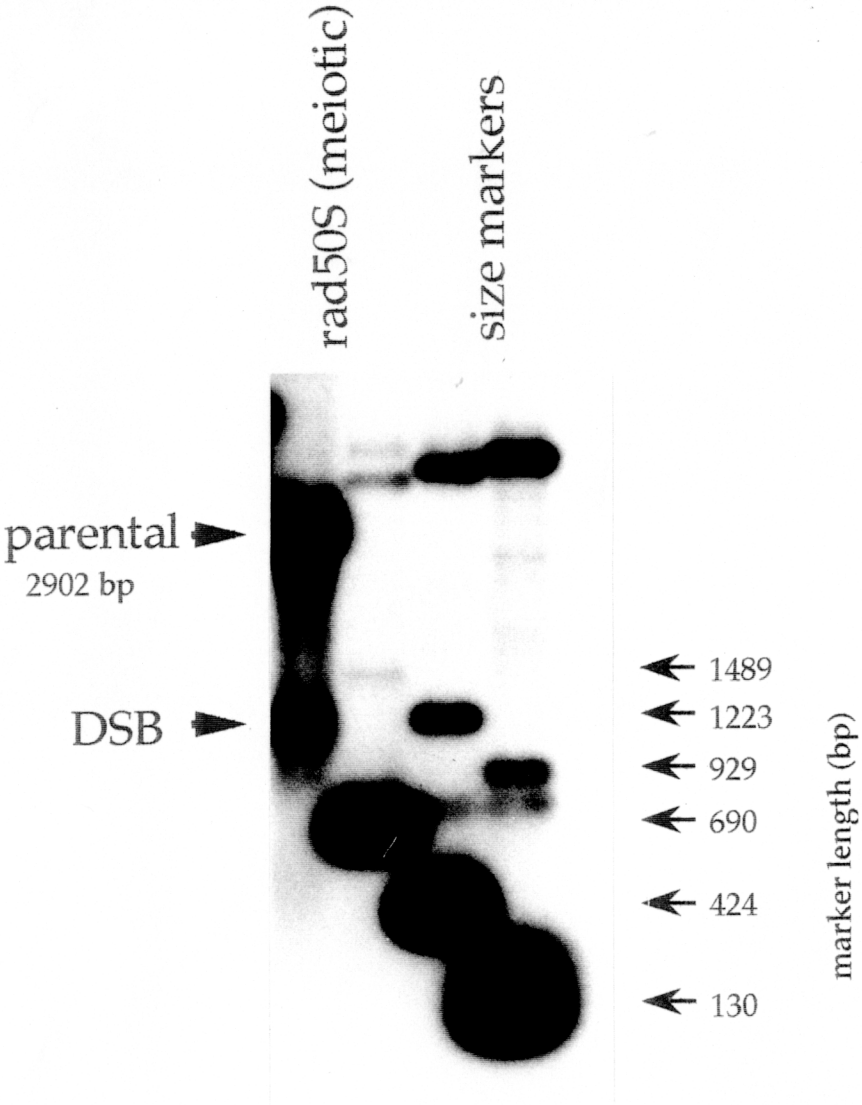
b.



a.


X
P
C
A
S
X
probe
parent
(2902 bp)
DSB signal
(ca 1100 bp)

b.


rad50S (meiotic)
size markers
parental
2902 bp
DSB
1489
1223
929
690
424
130
marker length (bp)

a.

YCR47c ORF

W GGTCGAACCC GTGTACTTGT GTGCTTCGCT ATCATTATAG AAAATCTCCG
C CCAGCTTGGG CACATGAACA CACGAAGCGA TAGTAATATC TTTTAGAGGC

GTGGTGCCAA CTCCTCAGGA CGTGACATTA TTTCTTCTCT GATATATTTC
CACCACGGTT GAGGAGTCCT GCACTGTAAT AAAGAAGAGA CTATATAAAG

CTGTGTTTCC GTACCGCACC TTTTTAGCAC TACTTTTTTA CTATGCTCTT
GACACAAAGG CATGGCGTGG AAAAATCGTG ATGAAAAAAT GATACGAGAA

pri#2

CTTCTTCTGC TTCTTCTGCT TTTTTCCTCT TTATCACACT ATGTATGTGC
GAAGAAGACG AAGAAGACGA AAAAAGGAGA AATAGTGTGA TACATACACG

Cla I

TGCTCATCTC TTCTTTTTAT CGATAAAATT GAAAAATGTG AGATGGTGTA
ACGAGTAGAG AAGAAAAATA GCTATTTTAA CTTTTTACAC TCTACCACAT

GAGTGAAAAA AAAAAAAAAA TCTGGCTTGG CCATCAAATA CCCGGCCGTG
CTCACTTTTT TTTTTTTTTT AGACCGAACC GGTAGTTTAT GGGCCGGCAC

DSB site expected

GTTGGACTCG TTTAGCGAAC AATAGCACCC AGCAGACCCT GGCAACATGC
CAACCTGAGC AAATCGCTTG TTATCGTGGG TCGTCTGGGA GGCTTGTACG

GGATGATATA AGAAGGACGA GCGTGGTGGA GGAAAGGGGC GCCATTGGCA
CCTACTATAT TCTTCCTGCT CGCACCACCT CCTTTCCCCG CGGTAACCGT

CACTCACGCA GGTGGTTGTT CAGCACGGCT TGCAGCAAGA GCGCCAAAAC
GTGAGTGCGT CCACCAACAA GTCGTGCCGA ACGTCGTTCT CGCGGTTTTG

YCR48w ORF

AGATTGCAAG AATGACGGAG ACTAAGGATT TGTTGCAAGA CGAAGAGTTT
TCTAACGTTC TTACTGCCTC TGATTCCTAA ACAACGTTCT GCTTCTCAAA

Afl III

CTTAAGATCC GCAGACTCAA TTCCGCAGAA GCCAACAAAC GGCATTCGGT
GAATTCTAGG CGTCTGAGTT AAGGCGTCTT CGGTTGTTTG CCGTAAGCCA

pri#4

b.

```
WACGTTCCTCC CTCTCTCTAA TTATTCATTG ATTTATTCAA GAATTAGCGT
CTGCAAGGAGG GAGAGAGATT AATAAGTAAC TAAATAAGTT CTTAATCGCA
```

pri#5

```
TATAACAATA AATGGTTGGC GCAGGCATTT AATTTTTCTT TACTCTTCCA
ATATTGTTAT TTACCAACCG CGTCCGTAAA TTAAAAAGAA ATGAGAAGGT

AACCCTCTGT TAACGACAAT CAAATAACCT GATCTGCCAA GGCTCCATCA
TTGGGAGACA ATTGCTGTTA GTTTATTGGA CTAGACGGTT CCGAGGTAGT

TATCTGGCCT AGAAACAGTT TTTTTTTTTC GATTATTTGT TCGTTCTTGT
ATAGACCGGA TCTTTGTCAA AAAAAAAAAG CTAATAAACA AGCAAGAACA
```

DSB site expected

```
GGTGGTTACT CATTGGCAGA ATCCCGAAAA TCATGATTAG TAGATGAATG
CCACCAATGA GTAACCGTCT TAGGGCTTTT AGTACTAATC ATCTACTTAC

ACTCACTTTT TGGATAAGCT GGCGCAAATT GAAACATGTG AAAAAAAAAA
TGAGTGAAAA ACCTATTCGA CCGCGTTTAA CTTTGTACAC TTTTTTTTTT
```

pri#4R

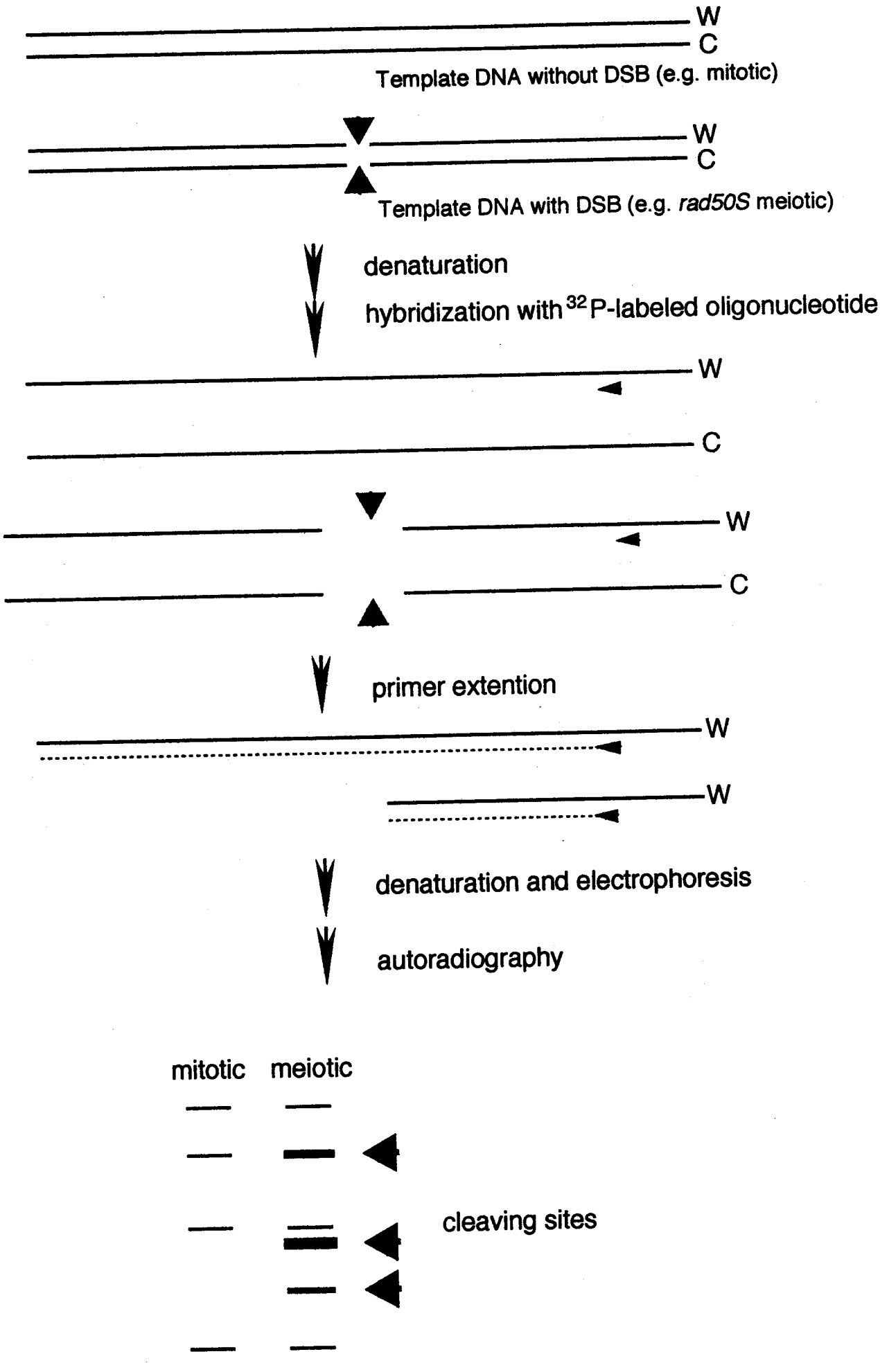
```
AAAAGGATTA TAAAAGGTCA GCGAAGCACA GAACTCTGAG ATAAGACTAC
TTTTCCTAAT ATTTTCCAGT CGCTTCGTGT CTTGAGACTC TATTCTGATG

CTTTCTTTAG CTAGGGGAGA ATATTCGCAA TTGAAGAGCT CAAAAGCAGG
GAAAGAAATC GATCCCCTCT TATAAGCGTT AACTTCTCGA GTTTTCGTCC
```

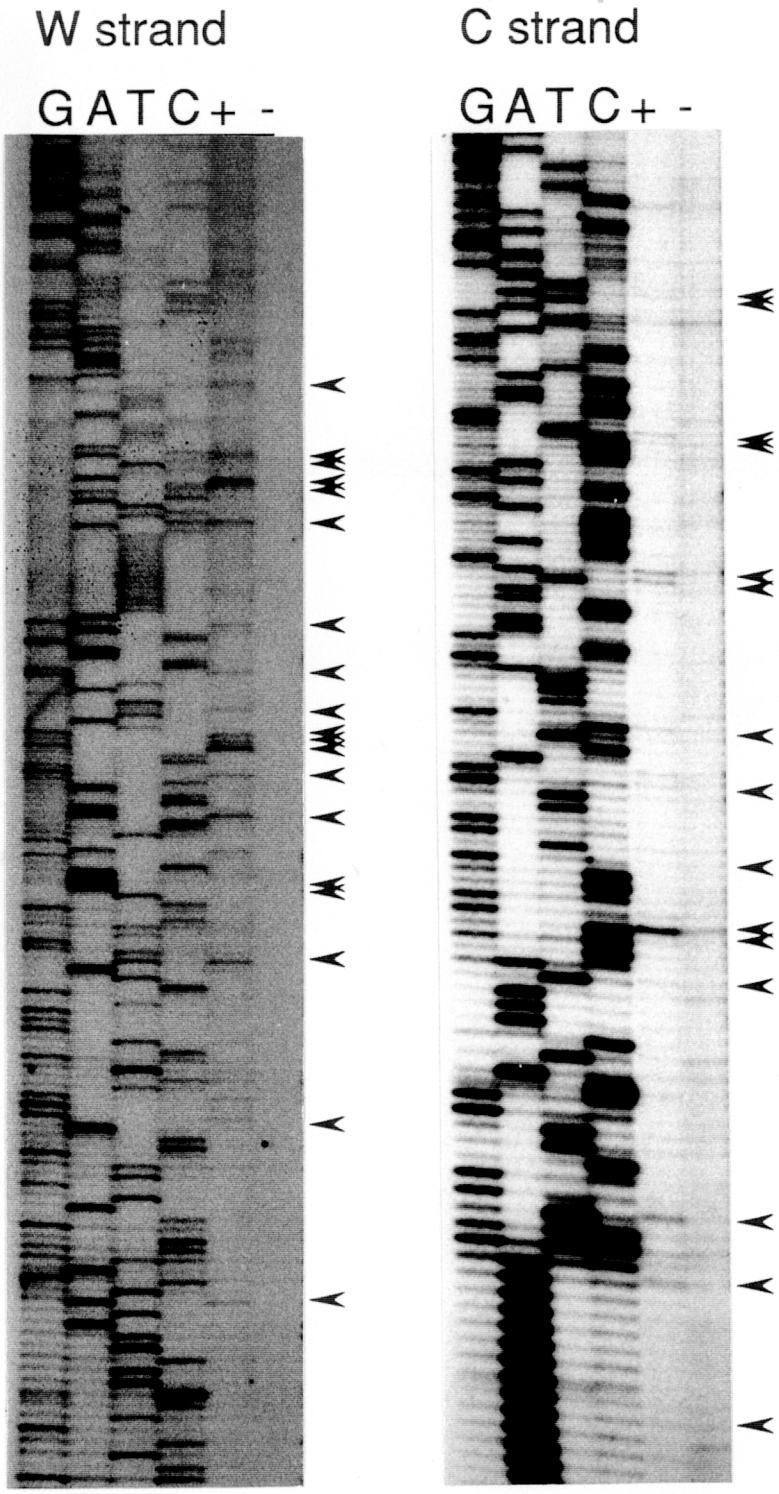
ARG4 ORF

```
TAACTATATA ACAAGACTAA GGCAAACATG TCAGACGGCA CTCAAAAACT
ATTGATATAT TGTTCTGATT CCGTTTGTAC AGTCTGCCGT GAGTTTTTGA
```

pri#7

```
ATGGGGTGGG AGATTCACTG GTGAAACCGA TCCTTTGATG CACCTTTACA
TACCCCACCC TCTAAGTGAC CACTTTGGCT AGGAAACTAC GTGGAAATGT
```


W
C
Template DNA without DSB (e.g. mitotic)
W
C
Template DNA with DSB (e.g. rad50S meiotic)
denaturation
hybridization with 32P-labeled oligonucleotide
W
C
W
C
primer extention
W
W
denaturation and electrophoresis
autoradiography
mitotic
meiotic
cleaving sites

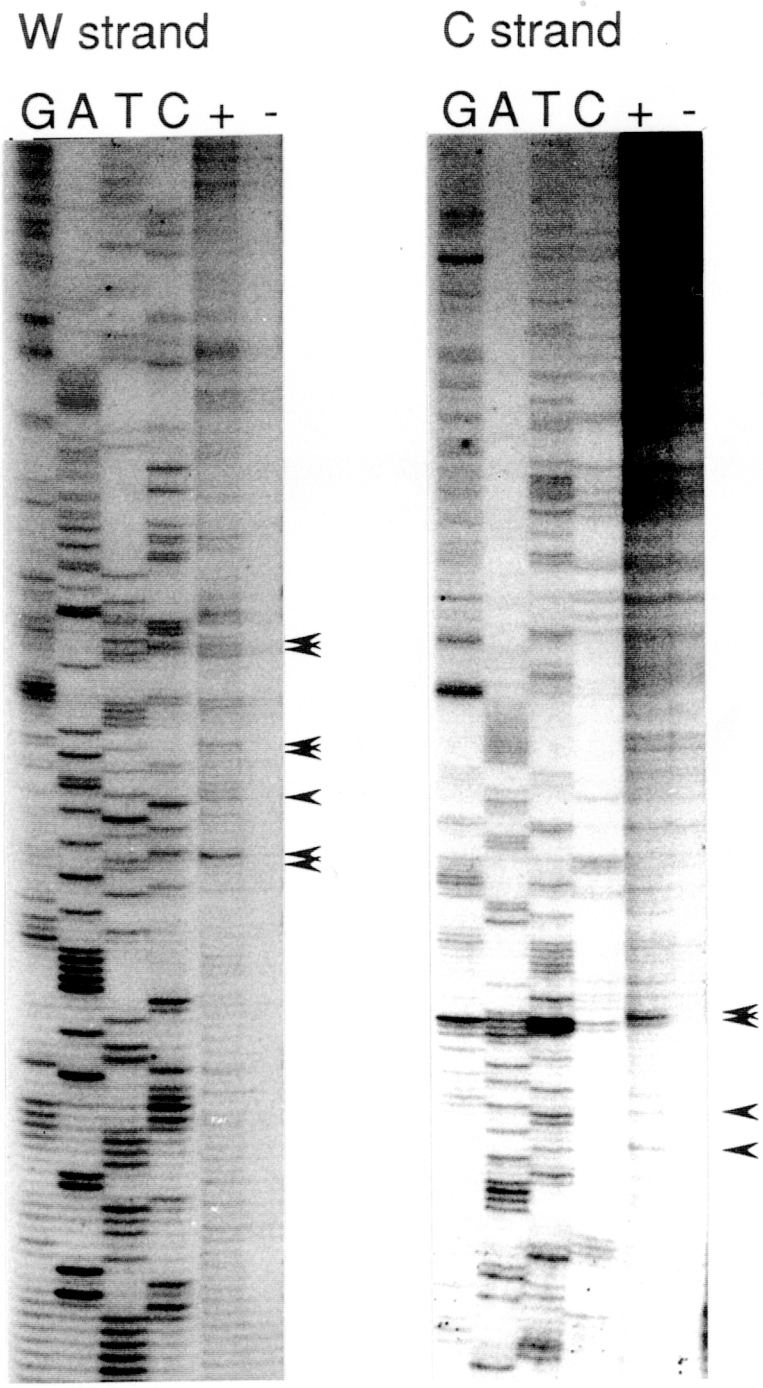

W strand
G A T C + -
C strand
G A T C + -

a.

```
W CTTCTTCTGC TTCTTCTGCT TTTTTCCTCT TTATCACACT ATGTATGTGC
C GAGAAGACG AAGAAGACGA AAAAAGGAGA AATAGTGTGA TACATACACG

                                i                   ii   iii
  TGCTCATCTC TTCTTTTTAT CGATAAAATT GAAAAATGTG AGATGGTGTA
  ACGAGTAGAG AAGAAAAATA GCTATTTTAA CTTTTTACAC TCTACCACAT

     iv                          I          II      III  IV
  GAGTGAAAAA AAAAAAAAAA TCTGGCTTGG CCATCAAATA CCCGGCCGTG
  CTCACTTTTT TTTTTTTTTT AGACCGAACC GGTAGTTTAT GGGCCGGCAC

  V      VI                     VII          VIII
  GTTGGACTCG TTTAGCGAAC AATAGCACCC AGCAGACCCT GGCAACATGC
  CAACCTGAGC AAATCGCTTG TTATCGTGGG TCGTCTGGGA GGCTTGTACG

        IX
  GGATGATATA AGAAGGACGA GCGTGGTGGA GGAAAGGGGC GCCATTGGCA
  CCTACTATAT TCTTCCTGCT CGCACCACCT CCTTTCCCCG CGGTAACCGT

  CACTCACGCA GGTGGTTGTT CAGCACGGCT TGCAGCAAGA GCGCCAAAAC
  GTGAGTGCGT CCACCAACAA GTCGTGCCGA ACGTCGTTCT CGCGGTTTTG
```

b.

```
W AACCCTCTGT TAACGACAAT CAAATAACCT GATCTGCCAA GGCTCCATCA
C TTGGGAGACA ATTGCTGTTA GTTTATTGGA CTAGACGGTT CCGAGGTAGT

  TATCTGGCCT AGAAACAGTT TTTTTTTTTC GATTATTTGT TCGTTCTTGT
  ATAGACCGGA TCTTTGTCAA AAAAAAAAAG CTAATAAACA AGCAAGAACA

                      I                II     III      IV
  GGTGGTTACT CATTGGCAGA ATCCCGAAAA TCATGATTAG TAGATGAATG
  CCACCAATGA GTAACCGTCT TAGGGCTTTT AGTACTAATC ATCTACTTAC

  ACTCACTTTT TGGATAAGCT GGCGCAAATT GAAACATGTG AAAAAAAAAA
  TGAGTGAAAA ACCTATTCGA CCGCGTTTAA CTTTGTACAC TTTTTTTTTT

  AAAAGGATTA TAAAAGGTCA GCGAAGCACA GAACTCTGAG ATAAGACTAC
  TTTTCCTAAT ATTTTCCAGT CGCTTCGTGT CTTGAGACTC TATTCTGATG
```


W strand
G A T C + -
C strand
G A T C + -

a.

I

ATCTGGCTTG

TAGACCGAAC

III

TACCCGGCC

ATGGGCCGG

V & VI

GTTGGACTCGTTT

CAACCTGAGCAAA

VII

ACAATAGCACCC

TGTTATCGTGGG

VIII

ACCCTGGC

TGGGAGGC

IX

TGATATAA

ACTATATT

b.

I

GGCAGAAT

CCGTCTTA

II

ATCATGAT

TAGTACTA

III

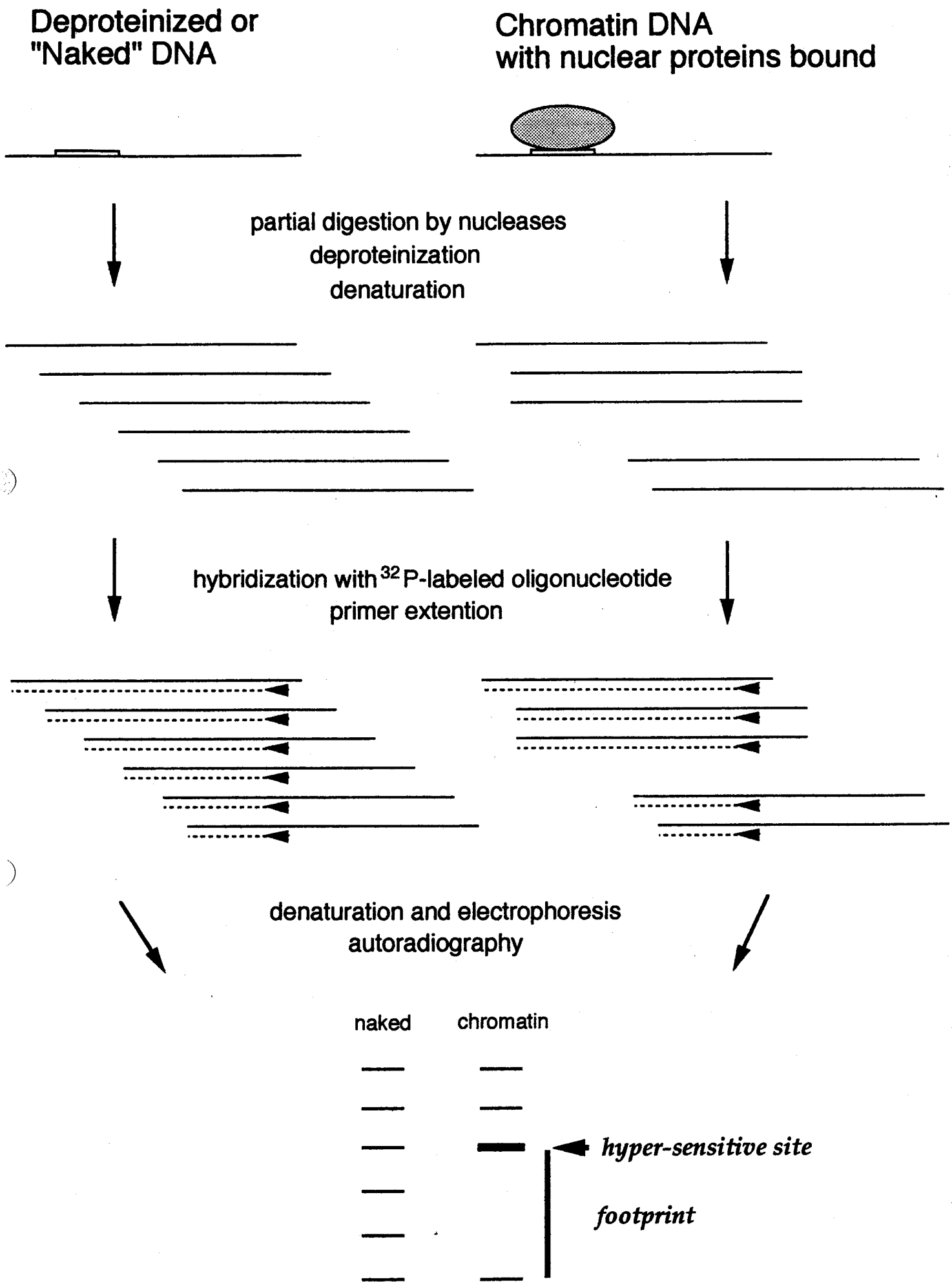
GATTAGTAGA

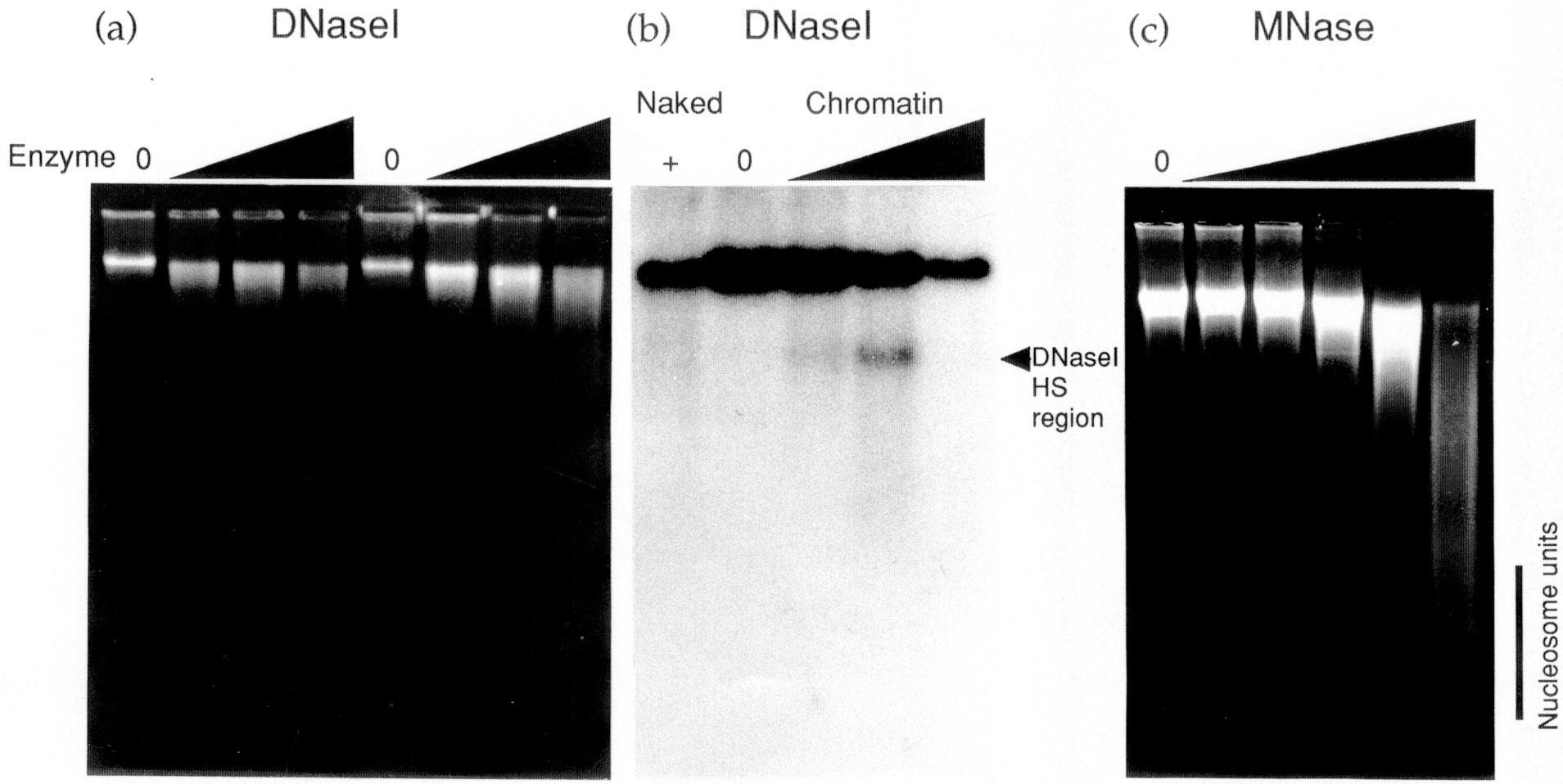
CTAATCATCT

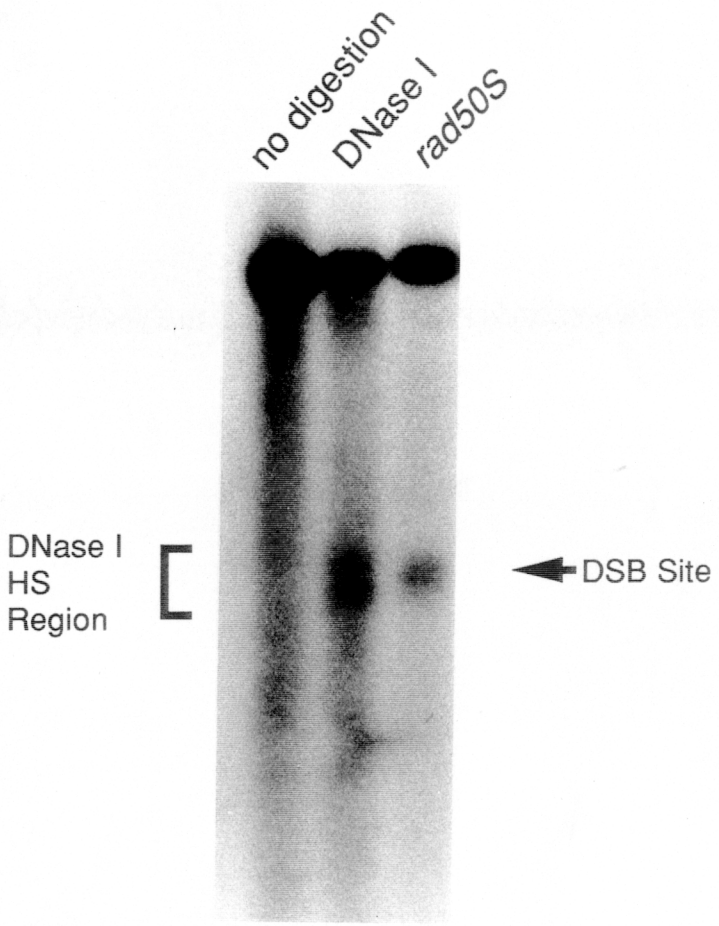
IV

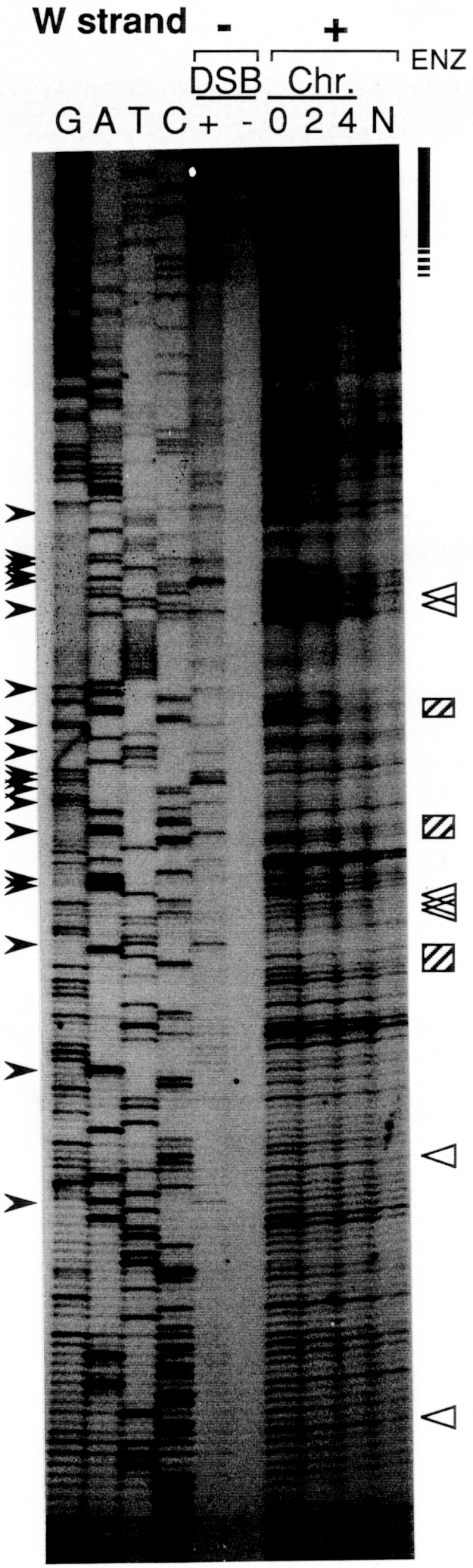
TGAATGACT

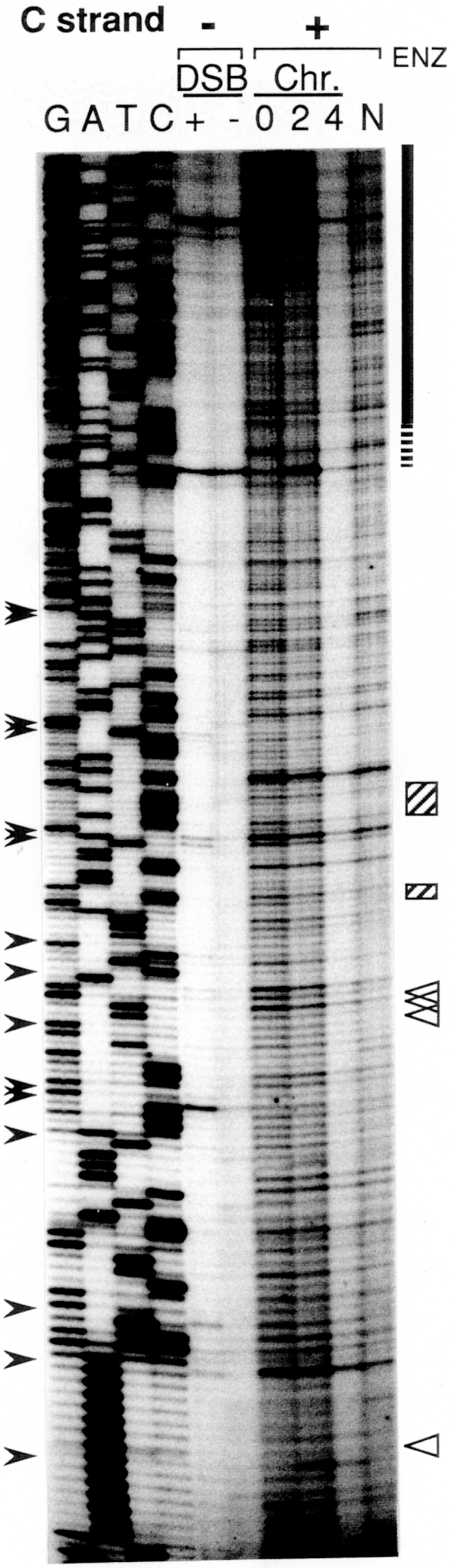
ACTTACTGA


Deproteinized or
"Naked" DNA
Chromatin DNA
with nuclear proteins bound
partial digestion by nucleases
deproteinization
denaturation
hybridization with 32 P-labeled oligonucleotide
primer extention
denaturation and electrophoresis
autoradiography
naked
chromatin
hyper-sensitive site
footprint


(a)
DNaseI
Enzyme
0
0
(b)
DNaseI
Naked
Chromatin
+
0
DNaseI
HS
region
(c)
MNase
0
Nucleosome units


no digestion
DNase I
rad50S
DNase I
HS
Region
DSB Site


W strand
-
+
DSB
Chr.
ENZ
G A T C + - 0 2 4 N


C strand
-
+
DSB
Chr.
ENZ
G A T C + - 0 2 4 N

GTGGTGCCAA CTCCTCAGGA CGTGACATTA TTTCTTCTCT GATATATTTC
CACCACGGTT GAGGAGTCCT GCACTGTAAT AAAGAAGAGA CTATATAAAG

CTGTGTTTCC GTACCGCACC TTTTTAGCAC TACTTTTTTA CTATGCTCTT
GACACAAAGG CATGGCGTGG AAAAATCGTG ATGAAAAAAT GATACGAGAA

CTTCTTCTGC TTCTTCTGCT TTTTTCCTCT TTATCACACT ATGTATGTGC
GAAGAAGACG AAGAAGACGA AAAAAGGAGA AATAGTGTGA TACATACACG

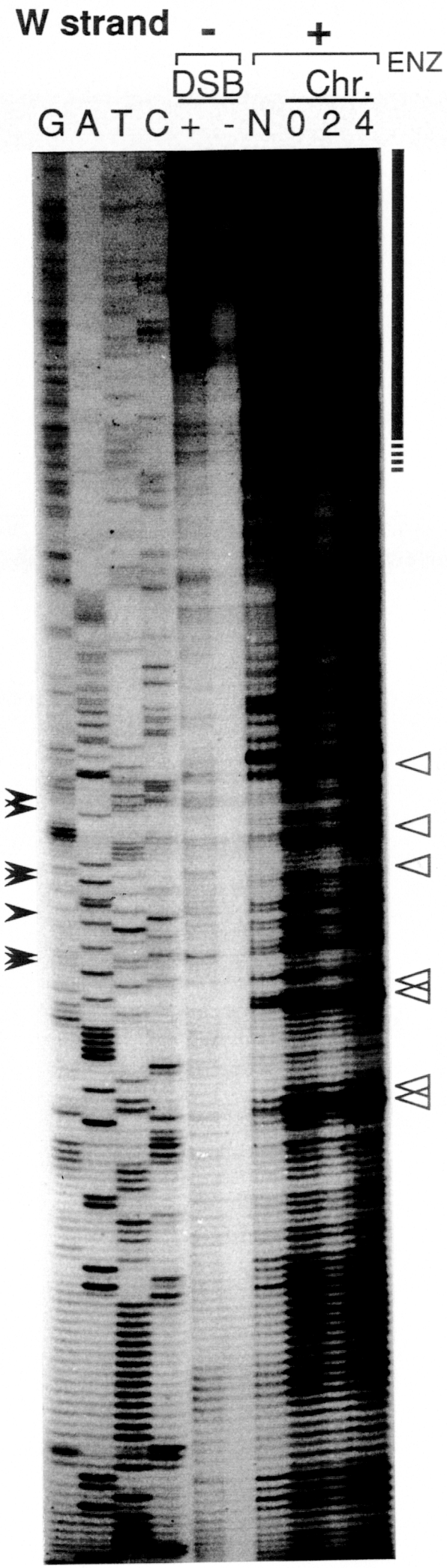
TGCTCATCTC TTCTTTTTAT CGATAAAATT GAAAAATGTG AGATGGTGTA
ACGAGTAGAG AAGAAAAATA GCTATTTTAA CTTTTTACAC TCTACCACAT

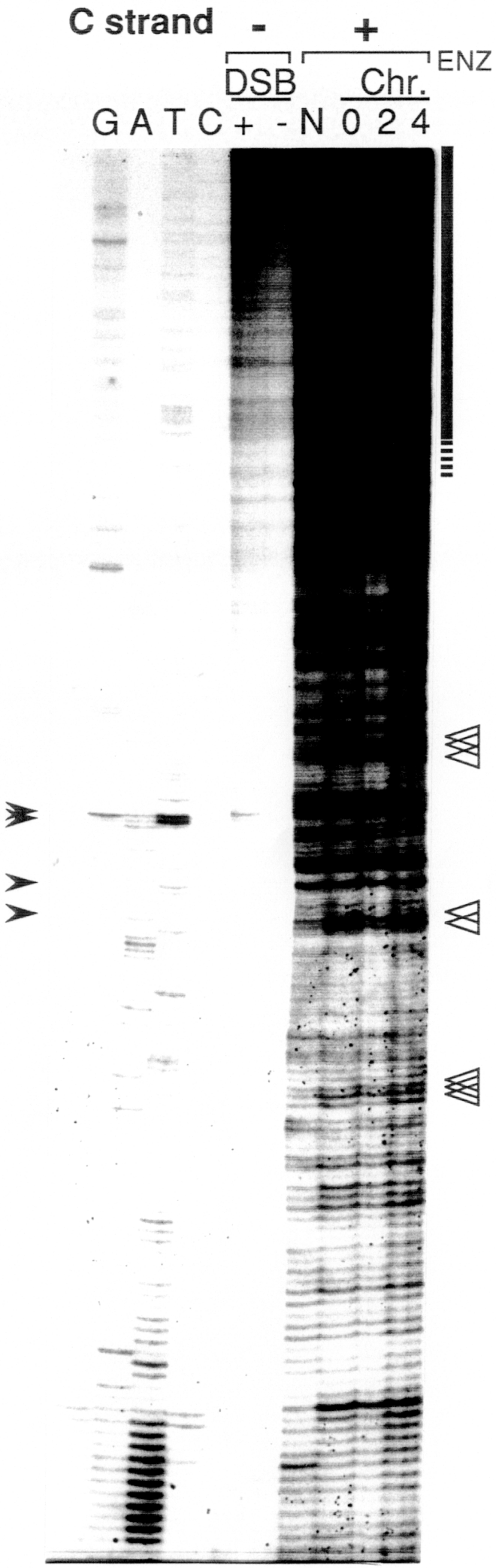
GAGTGAAAAA AAAAAAAAAA TCTGGCTTGG CCATCAAATA CCCGGCCGTG
CTCACTTTTT TTTTTTTTTT AGACCGAACC GGTAGTTTAT GGGCCGGCAC

GTTGGACTCG TTTAGCGAAC AATAGCACCC AGCAGACCCT GGCAACATGC
CAACCTGAGC AAATCGCTTG TTATCGTGGG TCGTCTGGGA GGCTTGTACG

GGATGATATA AGAAGGACGA GCGTGGTGGA GGAAAGGGGC GCCATTGGCA
CCTACTATAT TCTTCCTGCT CGCACCACCT CCTTTCCCCG CGGTAACCGT

CACTCACGCA GGTGGTTGTT CAGCACGGCT TGCAGCAAGA GCGCCAAAAC
GTGAGTGCGT CCACCAACAA GTCGTGCCGA ACGTCGTTCT CGCGGTTTTG


W strand
-
+
ENZ
DSB
Chr.
G A T C + - N 0 2 4


C strand
-
+
ENZ
DSB
Chr.
G A T C + - N 0 2 4

AACCCTCTGT TAACGACAAT CAAATAACCT GATCTGCCAA GGCTCCATCA
TTGGGAGACA ATTGCTGTTA GTTTATTGGA CTAGACGGTT CCGAGGTAGT

TATCTGGCCT AGAAACAGTT TTTTTTTTTC GATTATTTGT TCGTTCTTGT
ATAGACCGGA TCTTTGTCAA AAAAAAAAAG CTAATAAACA AGCAAGAACA

GGTGGTTACT CATTGGCAGA ATCCCGAAAA TCATGATTAG TAGATGAATG
CCACCAATGA GTAACCGTCT TAGGGCTTTT AGTACTAATC ATCTACTTAC

ACTCACTTTT TGGATAAGCT GGCGCAAATT GAAACATGTG AAAAAAAAAA
TGAGTGAAAA ACCTATTCGA CCGCGTTTAA CTTTGTACAC TTTTTTTTTT

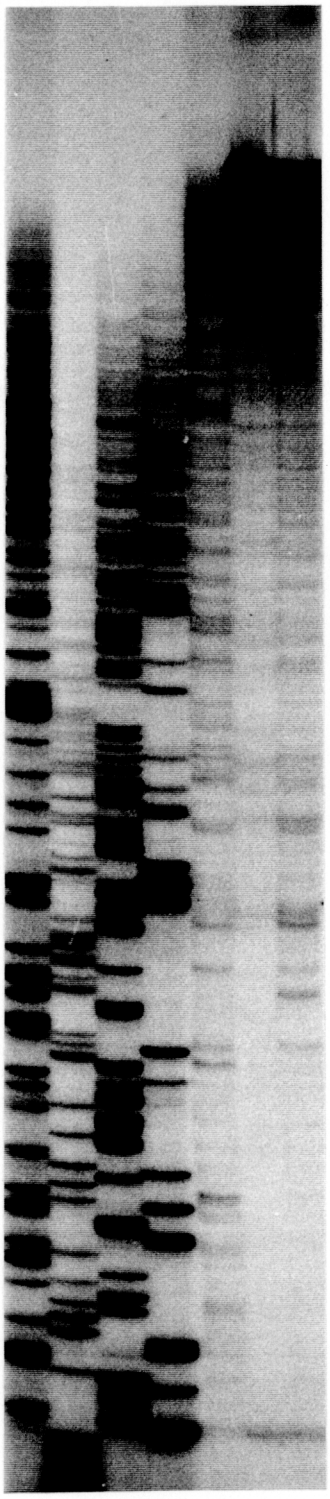
AAAAGGATTA TAAAAGGTCA GCGAAGCACA GAACTCTGAG ATAAGACTAC
TTTTCCTAAT ATTTTCCAGT CGCTTCGTGT CTTGAGACTC TATTCTGATG

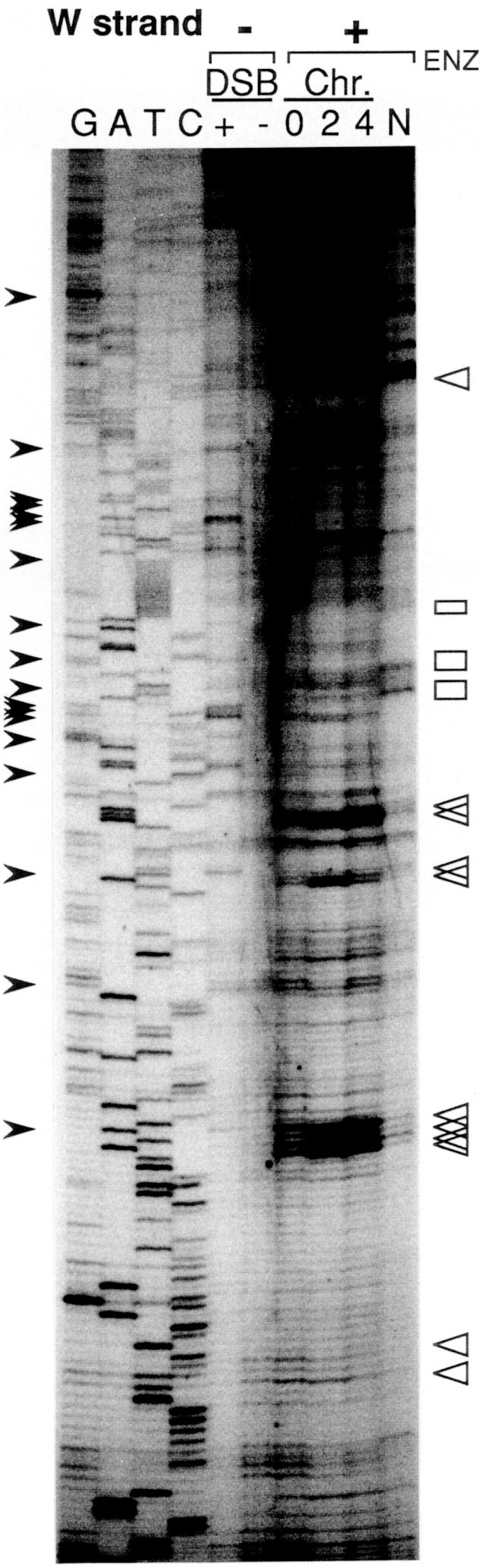
CTTTCTTTAG CTAGGGGAGA ATATTCGCAA TTGAAGAGCT CAAAAGCAGG
GAAAGAAATC GATCCCCTCT TATAAGCGTT AACTTCTCGA GTTTTCGTCC

W strand

N Chr.

G A T C + - + DNase I




W strand
-
+
ENZ
DSB
Chr.
G A T C + - 0 2 4 N

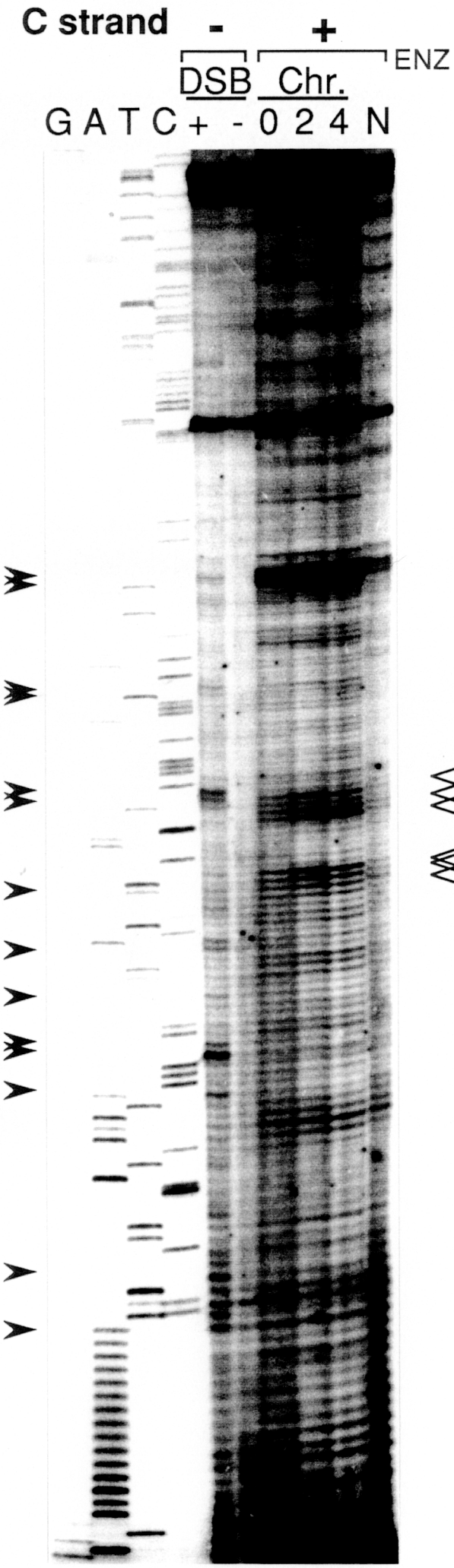

C strand
-
+
ENZ
DSB
Chr.
G A T C + - 0 2 4 N

Figure legends

Fig. 1. Meiosis-specific double strand breaks (DSBs) in yeast. (a) A map around the *HIS4-LEU2* locus of chromosome III. The locus is an artificially constructed hot spot of meiotic recombination (Cao, et al., 1990). The map shows two meiotic specific DSB sites (site I and II). Each horizontal line below the map represents the fragment detected by the probe. (b) Formation, processing and repair of DSBs of this region. Each DSB at site I or II is detected as a band of 3.9 kb and 6.2 kb, respectively. DSBs in wild type strain are smear,indicating that termini of the DSB are processed, whereas those in *rad50S* mutant are discrete. (c) Three steps of meiotic recombination deduced by DSB structures.

Fig. 2. Gene structures with meiosis-specific double strand break (DSB) sites. The horizontal arrows show an open reading frame predicted by DNA sequence. Vertical arrows indicate an approximate position of DSB sites. Dotted and Hatched box represent poly (A) / poly (T) tracts and TATA element, respectively. (a) *YCR47c / YCR48w* promoter region on chromosome III. A sequence homologous with TATA promoter sequences does not exist in this region. (b) *ARG4* promoter region on chromosome VIII. The region including A14 tracts and TATA box affects either DSB or gene conversion frequency (Schultes and Szostak, 1991; de Massy and Nicolas, 1993).

Fig. 3. Mapping of *YCR47c / YCR48w* DSB sites by Southern analysis. (a) The restriction site map of *47c / 48w* region. (b) Autoradiography. The numbers with arrow on the right of picture represent the length (bp) of marker DNA. Chromosomal DNA from the *rad50S* mutant (NKY1181/1183) was digested with Xho I and run on a 1.5 % agarose gel, Southern blot and hybridization with a

^{32}P-labeled Afl III-Sal I fragment were performed decsribed in Materials & Methods. The DSBs are observed as discrete signals in *rad50S* strain which are not processed or degraded during meiosis (Cao, et al., 1990; Sun et al., 1991; Fig. A.).

Fig.4. Sequence of oligonucleotide primers and their location on hot-spot region. The horizontal arrows beside the sequence mean primers. Expected DSB sites are shown by dashed lines. Open reading frames deduced from DNA sequence (boxes) are shown together. (a) *YCR47c / YCR48w* promoter region. (b) *ARG4* region.

Fig. 5. Schematic representation of primer extention method. A ^{32}P- labeled oligonucleotide primer (arrow) is annealed to the site of interest in chromosomal DNA with or without DSBs. A primer DNA is extended with delta Tth DNA polymerase and followed by separation on a DNA sequencing gel. As in this figure, an assay with one primer identifies cutting sites on one strand (.eg., the W strand). The cutting sites on the other strand (e.g., the C strand in this figure) can be determined by the same method using appropriate oligonucleotide primers. Since some nonspecific or background signals exist, the DSB sites are determined by comparing of the results obtained from chromosomal DNA with DSB (DNA sample from *rad50S* meiosis) to those without DSB (vegetative).

Fig. 6. Mapping of the DSB sites of *YCR47c / YCR48w* region (b) *ARG4* region at nucleotide resolution level. The data of the W strand and C strand shown together. Sequence laddars (G, A, T and C) by dideoxy reaction extended from the same primer are shown and used as marker. The bands observed at rad50S

meiotic (dsb+) but not at vegetative (dsb-) were determined as the DSB or cutting sites. The DSB sites were indicated by arrowheads.

Fig. 7 Summary of DSB sites of (a) *YCR47c / YCR48w* and (b) *ARG4* region. The cutting sites of each the W or C strand are represented by arrowheads besides the sequence. Size of arrowheads corresponds strength of the signal. The cutting sites were mapped by compairing to dideoxy sequence ladder extended fom same primer (see Materials and Methods). The major cutting sites are numbered as in the figure. Strong signal on the W strand in *47c/ 48w* are numbered with small letters since the C strand in this region was not analyzed.

Fig. 8. Mapping of the DSB sites of *ARG4* region at nucleotide resolution level. The data of the W strand and C strand shown together. Sequence laddars (G, A, T and C) by dideoxy reaction extended from the same primer are shown and used as marker. The bands observed at rad50S meiotic (dsb+) but not at vegetative (dsb-) were determined as the DSB or cutting sites.The DNA cutting sites were indicated by arrowheads.

Fig. 9. Majior meiosis-specific cutting sites in *rad50S* mutant. (a)*YCR47c / YCR48w*. (b)*ARG4*. Vertical bars mean the cutting sites and horizontal ones the cohesive termini that are shown by mapping data. While DSBs seem to be formed on most of the sites, single stranded nicks does in site I at *ARG4*.

Fig. 10. Schematic representation of genomic footprinting method of yeast chromatin. Dotted oval and open box represents a site-specific binding protein and its binding site, respectively. Chromatin DNA with nuclear proteins bound was prepared, treated by limited amount of nucleases, purified and used for

primer extention analyses like as shown in Fig. 4. The parallel assay of purified chromosomal DNA was necessary to determine whether the digested signals are chromation specific or not.

Fig. 11. Limited digestion of the chromation DNA by nucleases. (a) DNase I digestion was performed for two samples, and in this case, the right most is the appropriate for the following assays. (b) Confirmation of intact chromatin digested with DNase I by indirect endolabeling method. Southern blot displays the DNase I HS region at the ARG4 promoter in chromation digests , while not in purified or "naked" DNA. The chromosomal DNA was digested by Pst I, run on 0.7 % agarose gel electrophoresis, followed by Southern analysis. The probe DNA is Hpa I-Pst I fragments. (c) MNase digestion. Since MNase digests the linker position besides nucleosome, the digestion of intact chromatin results in the ladder bands in agarose gel.

Fig. 12. DNase I hyper-sensitive (HS) region and the DSB at 47c / 48w observed by indirect endlabeling method. Chromosomal DNA was digested by Bam HI and run on 1.5 % agarose gel electrophoresis. Southern analysis was performed by the Bam HI-Xho I fragment as a probe.

Fig. 13. Genomic footprinting of *YCR47c / YCR 48w* region by DNase I as cutting probe. The results of the W strand and C strand are shown together. Thesamples of sequence laddar (G, A, T and C) and dsb+ samples are obtained by the same reaction shown in Fig. 6. 0, 2 and 4 are the chromation samples from the time (hr) from the entry into meiosis, and N shows naked (or purified) DNA. The arrowheads on the left sides show the DSB sites mapped above. The meiosis

specific footprints near DSB sites are shown by the hatched boxes. The open triangles represent the DNase I HS sites.

Fig. 14. The footprints detected at the 47c / 48w region. The dotted lines represent the regions where footprints of nucleosomes (or histones) are observed. The arrowheads shows the DSB sites showed above. The dashed or open boxes are the location of footprints ditected by DNase I or MNase , respectively. The doted line show the region where the footprints of nucleosomes (or histone).

Fig.15. Genomic footprinting of *ARG4* region by DNase I as cutting probe. The results of the W strand and C strand are shown together. The marks in this figures are the same as Fig. 11.

Fig. 16. The DNase I HSS observed at ARG4. Open triangles point the DNase I HSS, and arroeheads do the DSB sites. The doted line show the region where the footprints of nucleosomes (or histone).

Fig. 17. The region of positioned nucleosomes at ARG4 upstream displays the footprints by DNase I. This is the footprints of meiotic chromatin and the same pattern as the chromation from vegetative cells .

Fig. 18. Genomic footprinting of *YCR47c / YCR 48w* region by MNase as cutting probe. The results of the W strand and C strand are shown together. The arrowheads on the left sides show the DSB sites. The clear footprints in the DSB sites are shown by the open boxes. The open triangles represent the MNase HS sites.

謝 辞

この研究を行なうにあたり、直接指導をしていただいた小川智子博士に感謝いたします。また日々の研究において限りない支援をしていただいた小川英行教授、伊藤建夫博士、篠原彰博士に感謝します。最後に定塚勝樹博士をはじめ、小川研究室のメンバーとのディスカッションからうけた刺激が、今回の研究を進める原動力になりました。