

## 論文の内容の要旨

### 論文題目 「REQUIREMENT FOR A DOUBLE-STRAND BREAK REPAIR COMPONENT IN S PHASE COMPLETION IN FISSION YEAST CELL CYCLING」

(分裂酵母細胞周期のS期完了に必須なDNA二本鎖切断修復因子に関する研究)

氏 名 須藤 公彦

生物は、紫外線や化学物質などによって様々な形でDNAに傷害を受けている。その中でもDNA二本鎖切断は、細胞死や個体死を引き起こし得るといった点で生物にとって最も重大な傷害といえる。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の、放射線などによるDNA傷害を修復できない *rad* 突然変異株を用いた研究により、生物は大別して二種類の様式でDNA二本鎖切断を修復していることがわかっている。一つは相同な塩基配列をほとんど必要としない末端結合修復と呼ばれる方法であり、もう一つは相同な配列を要求する相同組換え修復である。分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の *rad22<sup>+</sup>* 遺伝子は、後者の修復系に関与している出芽酵母の *RAD52* 遺伝子と構造的に相同な遺伝子であり、分裂酵母内においてDNA二本鎖切断に対する相同組換え修復系の一因子をコードしている。この遺伝子は *RAD52* 遺伝子同様、遺伝子破壊株が致死とはならないことから、修復といった遺伝物質の安定性には関与しているが細胞の増殖自体には必須ではないと長らく考えられてきた。

私は、分裂酵母野生株を突然変異誘発物質であるニトロソグアニジン (MNNG) で処理することにより、許容温度においては生育可能であるが 35℃以上の非許容温度では細胞周期上の一定の時期で停止し生育不能となる、新たな温度感受性細胞周期 (*cdc*) 突然変異株 *H6* を単離した。そこでこの *H6* 株に対して分裂酵母ゲノムライブラリーを導入し過剰発現させたところ、*H6* 株が非許容温度においても生育可能となるような、すなわちこの温度感受性変異を抑制できる遺伝子として、*rad22<sup>+</sup>* 遺伝子とともに別の新規遺伝子を単離した。塩基配列を決定したところ、この新規遺伝子は *rad22<sup>+</sup>* と構造的相同性がみられ、*rti1<sup>+</sup>* (*rad-twentytwo isogene 1*) と名付けた。両遺伝子のうち *H6*

株に対する相補能は  $rad22^+$  の方が高く、既知の  $rad22$  変異株との掛け合わせにより  $H6$  株は  $rad22^+$  の新たな変異株であることが判明し、 $rad22-H6$  株と名付けた。更に  $rad22-H6$  変異遺伝子の塩基配列を調べたところ、この株の温度感受性細胞周期突然変異は  $rad22^+$  産物 (Rad22) や  $RAD52$  産物 (Rad52) に共通にみられる領域、すなわち組換え修復に必須な保存領域内における点突然変異によるものであることが判明した。

$rad22^+$  が完全に欠失した細胞 ( $\Delta rad22$ ) は様々な表現型、すなわち  $120 \text{ J/m}^2$  紫外線感受性、 $0.1 \text{ mg/ml}$  プレオマイシン感受性、 $\Delta rad22$  株同士による交配不能、交配型スイッチングが頻繁に起こるホモタリック株 ( $h^{90}$ ) における致死性を示したが、過剰発現させた  $rti1^+$  はそれら全ての表現型を有意に抑制することができた。この点と、 $rti1^+$  単独の欠失株 ( $\Delta rti1$ ) では紫外線感受性、プレオマイシン感受性、温度感受性ともにほとんど認められなかったことから、Rti1 は Rad22 と機能的にはほぼ同一であるが生理的な役割は副次的である可能性の高いことが考えられた。よって、ヘテロタリックな  $\Delta rad22$  株が致死ではないにも関わらずヘテロタリックな  $rad22-H6$  株が高温で致死となる原因は、 $rad22-H6$  変異がドミナントネガティブ変異であるからであると考えられ、実際に野生型二倍体株と比べて  $rad22^+/rad22-H6$  二倍体株は  $37^\circ\text{C}$  でコロニー形成能が著しく低下したことにより証明された。また、交配型スイッチングの起こらないヘテロタリックな株では  $rad22^+$ 、 $rti1^+$  のどちらか一方の遺伝子破壊株は生存可能だったが、両遺伝子ともに欠失した胞子は発芽後最初の細胞周期上で  $cdc$  変異株特有の表現型を示して増殖が停止し致死となった。

以上のことから、 $rad22^+$ 、 $rti1^+$  は細胞周期上で何らかの必須な機能を担っていることが明らかになったが、それは  $rad22^+$  の既知の機能の一つである交配型スイッチングへの関与ではなかった。交配型スイッチングは分裂酵母のヘテロタリックな株においても低頻度で起こっていることが知られているが、交配型スイッチングの起こらない  $mat1-p \Delta 17$  変異共存下でも  $rad22-H6$  株は高温で致死となったためである。

そこで、 $rad22^+$ 、 $rti1^+$  が交配型スイッチングに代表されるような修復以外の機能を持つ可能性を考え、まず  $rad22-H6$  株における細胞周期上の停止点を調べた。非許容温度下、窒素源飢餓状態で G1 期に同調培養した  $rad22-H6$  株の S 期におけるゲノムの複製は、フローサイトメトリーで調べた限り遅延なく行われていた。しかも、パルスフィールド電気泳動によりゲノムの複製レベルをみたところ、複製はほぼ完了しており染色体に異常は観察できなかった。よって  $rad22-H6$  株の細胞周期停止点は、少なくとも S 期終盤以降であることがわかった。更に、 $rad22-H6 \Delta rti1$  株では M 期の指標である隔膜の観察される割合でみる限り M 期に入るのが遅れていたこと、リン酸化チロシン残基に対する抗体によって Cdc2 タンパク質のチロシン残基における高レベルなリン酸化が検出されたことから、少なくとも M 期以前であることも判明した。以上の結果と、 $rad22-H6$  と  $rad1-1$  チェックポイント変異株との二重変異株が無核細胞などを生み出すカット表現型といわれる典型的な S 期停止表現型を示したことより、 $rad22-H6$  株の細胞周期停止点すなわち Rad22 や Rti1 が必須な役割を担っている時期は S 期の終わりであると結論づけた。

更に、S 期の終わりにおける Rad22 や Rti1 の機能を検討した。 $rad11^+$  は複製タン

パク質A (RPA) の大サブユニットをコードしているが、この RPA は複製のみならず相同組換え修復にも関与しており、特に後者においては出芽酵母で Rad52 などとも機能的関係が認められている。そこで私は、S 期の終わりにおける Rad22 や Rtl1 の RPA との相互作用を調べた。rad11-A1 変異株は、rad22<sup>+</sup> または rtl1<sup>+</sup> を欠失させるか rad22-H6 変異との二重変異株にすると、その制限温度が 4-6 °C 程低下し、その制限温度において窒素源飢餓状態の G1 期から細胞周期を開始させると染色体複製が不完全な状態で細胞周期が停止した。よって、Rad22/Rtl1 は RPA と相互作用することが判明した。

このように、分裂酵母では Rad22/Rtl1 という二本鎖切断修復成分が、少なくとも部分的には RPA を介して、DNA 傷害-修復系とは無関係な、染色体複製のある段階に必要であると考えられた。その Rad22/Rtl1 が S 期の完了を促進するメカニズムは不明であるが、 $\Delta rad22$  または  $\Delta rtl1$  と rad11-A1 変異との遺伝学的相互作用や過剰発現させた rtl1<sup>+</sup> が rad11-A1 変異を相補できたことから考えて、少なくとも RPA は Rad22/Rtl1 のターゲットであるといえる。ここで、RPA が複製に必須であるにも関わらず rad22-H6 株の非許容温度下での複製はほぼ正常である理由として、二通り考えられる。一つは、複製の大部分においては Rad22/Rtl1 様の因子が RPA を活性化しており、Rad22/Rtl1 は Rad22/Rtl1 様の因子が不活性化状態にある S 期の終わりに機能しているか、染色体の特異的部分の複製において機能している場合である。もう一つは、RPA は染色体がほとんど複製された後に特異的に Rad22/Rtl1 を必要としている場合である。更に、RPA 以外の別のターゲットがある可能性もある。rad11<sup>+</sup> は rad22-H6 変異を抑制できず、rad22-H6 の細胞周期停止点では上述のように複製異常は見られなかったからである。

Rad22/Rtl1 が RPA を活性化する機構は不明だが、Rad52 と RPA との相互作用から以下の三通りの仕組みが考えられた。一つは Rad22/Rtl1 が RPA サブユニットの活性化複合体への集合を促進するタイプ、一つは RPA の単鎖 DNA への結合を安定化、促進するタイプ、もう一つは単鎖 DNA からの RPA の解離を促進するタイプである。三つ目の機構は、Rad51 が触媒する DNA 単鎖交換における Rad52 の機能としても知られている。また、rtl1<sup>+</sup> と rad22<sup>+</sup> は機能的に異なっている可能性もある。rtl1<sup>+</sup> の rad11-A1 変異に対する抑制能は rad22<sup>+</sup> よりも強く、rad11-A1 変異との二重変異株では rad11-A1 株の温度感受性が有意に低下したからである。

現在までのところ、Rad22/Rad52 の相同遺伝子が他生物でも細胞周期 S 期の終わりにおいて必須の機能をしているかどうかは明らかではない。他生物の相同遺伝子は必須ではないことが知られている。しかし、それは rtl1<sup>+</sup> のような機能的相同遺伝子が存在したり、または Rad22 様因子が S 期における RPA 活性化を主に担っているからなのかもしれない。出芽酵母では Rad52 が染色体に局在していること、またヒトでは S 期に発現がみられることから考えると、少なくとも分裂酵母 Rad22/Rtl1 の機能と共通点のある可能性は高い。