

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 須藤 公彦

本研究は、真核生物の細胞分裂周期における制御機構の詳細を明らかにするため、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* の温度感受性細胞周期 (*cdc*) 突然変異株を樹立し、これを用いてS期で機能している新たな制御因子の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 分裂酵母野生株をニトロソグアニジン処理することにより高温下で生育不能な新たな温度感受性 *cdc* 突然変異株 (*H6* 株) を樹立し、これを用いて分裂酵母ゲノムライブラリーを用いた発現クローニングを行い、二種類の遺伝子を単離した。塩基配列を決定したところ、既知遺伝子 *rad22*<sup>+</sup> とアミノ酸レベルで相同性のみられる新規遺伝子 (*rti1*<sup>+</sup>) であることが判明した。他の *rad22*<sup>+</sup> 変異株との掛け合わせにより、*H6* 株は新たな *rad22*<sup>+</sup> 変異株 (*rad22-H6* 株) であることが示された。PCR法によって *rad22-H6* 株の *rad22*<sup>+</sup> を単離したところ、*rad22-H6* の変異点は *rad22*<sup>+</sup> と出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の *RAD52* 遺伝子との相同領域における点突然変異であることが示された。
2. *rad22*<sup>+</sup> が完全に欠失した変異株 ( $\Delta rad22$  株) を作製し *rti1*<sup>+</sup> を細胞内過剰発現させたところ、 $\Delta rad22$  株の表現型すなわち紫外線感受性、プレオマイシン感受性、ホモタリック株における致死性は抑制され、*rti1*<sup>+</sup> は機能的に *rad22*<sup>+</sup> と同一性の高いことが示された。四分子分析により  $\Delta rad22$  株に  $\Delta rti1$  全欠失変異を導入したところ、発芽後最初の細胞周期上で増殖が停止し致死となり、Rad22/Rti1 は細胞周期の進行に必須の役割を果たしていることが示された。*rad22*<sup>+</sup>/*rad22-H6* 二重変異株を作製したところ、このコロニー形成能が高温下で著しく低下したことにより、*rad22-H6*

変異はドミナントネガティブ変異であることが示された。

3. 交配型スイッチングの頻度が著しく低い *mat1-p $\Delta$ 17* 株に *rad22-H6* 変異を導入したところ、高温下で致死となり、*rad22-H6* 株の致死性はDNA二本鎖切断の修復不能と無関係である可能性の高いことが示された。
4. 高温下におけるG1 静止期からの細胞周期の進行を、フローサイトメトリーやパルスフィールドゲル電気泳動法により核内DNA量やゲノム複製レベルを指標として測定したところ、*rad22-H6* 株の細胞周期停止点におけるゲノム複製はほぼ完了していることが示された。ウエスタンブロッティング法により、*rad22-H6* 株の細胞周期停止点におけるG2/M 期制御因子 Cdc2 のチロシン残基リン酸化状態を測定したところ、高度にリン酸化されていることが示された。以上の結果と、*rad22-H6* 株にチェックポイント変異である *rad1-1* 変異を導入したところ高温下で cut 表現型を示したことにより、*rad22-H6* 株の細胞周期停止点はS期の終わりであることが示された。
5. 複製タンパク質A (RPA) 大サブユニット遺伝子 *rad11<sup>+</sup>* の変異株 *rad11-A1* に  $\Delta$ *rad22*、 $\Delta$ *rti1*、*rad22-H6* 変異を導入したところ、増殖制限温度が4-6℃程度低下し、この温度下でG1 静止期からの細胞周期の進行をフローサイトメトリーにより測定したところ、ゲノム複製が不完全な状態で進行が停止した。以上の結果と、*rti1<sup>+</sup>* の過剰発現が *rad11-A1* 変異を部分的に抑制したことにより、分裂酵母ではDNA二本鎖切断修復因子 Rad22/Rti1 がゲノム複製のある段階において少なくとも部分的にはRPAを介して、修復とは異なる必須な機能を果たしていることが示された。

以上、本論文は新たな分裂酵母細胞周期変異株 *rad22-H6* を用いて、この変異を抑制する遺伝子 *rad22<sup>+</sup>/rti1<sup>+</sup>* の解析から、真核生物細胞周期S期の終わりにおける新たな制御機構の存在を明らかにした。本研究はこれまで未知に等しかったDNA二本鎖切断修復因子の、修復とは異なる増殖上必須な機能の解明に重要な貢献をなすだけでなく、真核生物におけるゲノム複製制御機構の解明にも大きく寄与すると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。