

論文の内容の要旨

論文題目 ブルーム症候群原因遺伝子の酵母相同遺伝子 *SGS1* の機能解析

氏 名 宮島 敦子

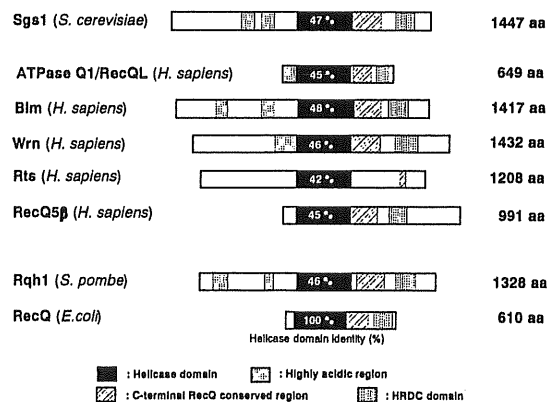
出芽酵母 *SGS1* は、大腸菌において DNA 修復および組み換えに参与している *RecQ* に高い相同性を有し、*RecQ* family に属する遺伝子である。*SGS1* 遺伝子は、出芽酵母において DNA topoisomerase 3(*TOP3*) の遺伝子破壊株の増殖遅延を相補する変異遺伝子(slow growth suppressor)として同定された。ヒトにおいては、現在までに5種類の *RecQ* 相同遺伝子が報告されており、それらは、*ATPaseQ1*、ブルーム症候群(Bloom syndrome : *BLM*)、ウェルナー症候群(Werner syndrome : *WRN*)、ロトムント・トムソン症候群遺伝子(Rothmund-Thomson syndrome : *RTS*)および *RECQ5* である (図 1)。

これら3つの症候群はいずれも、癌多発性、DNA 修復異常、染色体不安定性を示す、常染色体劣性遺伝疾患である。大腸菌の *RecQ* 蛋白質は、DNA helicase 活性を持ち、これらの相同遺伝子も helicase domain を持つことから、生体内で DNA helicase が関与する生体内機能に関わっていると考えられる。

出芽酵母においてはゲノムプロジェクトが終了し、全ゲノム配列の情報が data base を用いて検索

可能になった。*RecQ* 相同遺伝子間で高く保存されている helicase domain をプローブとして、出芽酵母の

図 1 *RecQ* family 蛋白質の比較



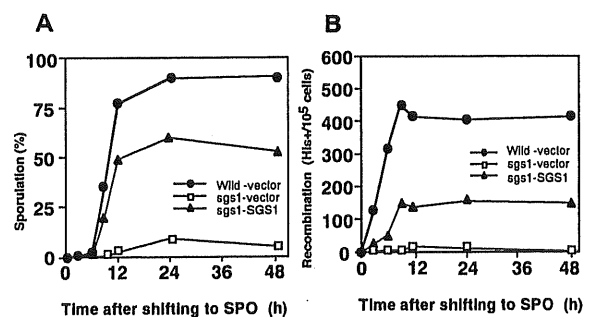
可能になった。RecQ 相同遺伝子間で高く保存されている helicase domain をプローブとして、出芽酵母のゲノムライブラリーを検索した結果、*SGS1* 以外の遺伝子は得られず、酵母細胞において、Sgs1 蛋白はヒトにおける RecQ 相同遺伝子産物の機能をオーバーラップして担っていると考えられた。そこで、分子遺伝学的な解析が容易な酵母細胞において *sgs1* 遺伝子破壊株を作製し、*SGS1* の機能について解析を進め、ヒトにおけるこれらの RecQ 相同遺伝子産物の機能と、疾患発症のメカニズムとの関連について検討を進めた。

1. *sgs1* 遺伝子破壊株の表現型

酵母細胞株において *sgs1* 破壊株を作製し、DNA 傷害剤に対する感受性について解析を進めた。DNA 傷害剤として、UV, X-ray, methyl methanesulfonate(MMS), ethyl methanesulfonate(EMS), bleomycin, mitomycin C および hydroxyurea (HU) に対する感受性を野生株と比較した結果、*sgs1* 破壊株は、アルキル化剤である MMS, EMS および DNA 合成阻害剤として知られている HU に感受性を示した。体細胞分裂期においては、染色体間相同組み換えにおいて高頻度組み換えを示した。これらの傷害物質に対する高感受性および高頻度相同組み換えは、遺伝子破壊株に全長の *SGS1* 遺伝子を挿入した vector を導入することにより相補され、その感受性が Sgs1 の欠損によるものであることが確認された。次に、*sgs1* 破壊株を用いて、胞子形成率を野生株と比較し、胞子形成率が野生株に比べて減少することを見いだした。

また *sgs1* 破壊株において、胞子形成培地に移行 24 時間後の、遺伝子組み換え体の出現頻度が減少していた (図 2)。これらの胞子形成率および組み換え頻度の低下は、遺伝子破壊株に全長の *SGS1* 遺伝子を挿入した vector を導入することにより相補され、これらの表現型が Sgs1 の欠損によるものであることが確認された。

図 2 *sgs1* 遺伝子破壊株の減数分裂組み換えに及ぼす影響



2. *SGS1* の減数分裂における機能の解析

sgs1 破壊株において、胞子形成率および組み換え頻度の低下が観察されたことから、*SGS1* は減数分裂の過程において何らかの役割を果たしていると考えられ、減数分裂における機能についてさらに検討を進めた。*SGS1* mRNA の発現は、胞子形成培地に移行数時間後に誘導が観察された。*sgs1* 破壊株において、減数分裂前 DNA 合成は野生株と同様に進行していた。組み換えの初期反応である DNA 二本鎖切断(double

strand break, DSB)の形成に関しては、*sgs1* 破壊株において DSB の形成の抑制と進行の遅れが観察された。さらに減数分裂における組み換え体の形成について検討したところ、crossing over, non-crossing over type 両組み換え産物が野生株とほぼ同程度観察された。また、*spo13*, *mre11* 破壊株との二重遺伝子破壊株を作製した結果、大部分の *sgs1-spo13* 破壊株は、*spo13* 破壊株と異なり第一減数分裂を bypass する事ができなかった。また、*sgs1-mre11* 破壊株では、*mre11* 株と同様、胞子は致死であった。減数分裂における checkpoint について検討したところ、*sgs1-red1*, *sgs1-rad17* 破壊株において、*RED1*, *RAD17* 破壊は、*sgs1* 破壊株の胞子形成能の低下を部分的に抑制した。

3. 部位特異的変異導入およびN末、C末欠失 *SGS1* を用いた機能の解析

酵母細胞における Sgs1 の機能および、ヒトにおける疾患との関わりについて解析を進めるため、部位特異的変異導入した *SGS1* vector を作製した。まず、酵母細胞における実験系が、ヒトにおける疾患を評価するシステムとして利用できるかどうかを検討するため、ブルーム症候群およびウェルナー症候群と同様の変異(pBLM1, 2, 4 および pWS1)を導入した。また、出芽酵母 *SGS1* 遺伝子は、helicase domain の両側に長いN末、C末部分を有していることから、これらの部分の機能について解析を進めるため、N末、C末欠失 *SGS1* vector を作製した。これらの改変 *SGS1* vector を用いて、*sgs1* 破壊株の表現型に及ぼす影響について検討した。その結果、pBLM2 は MMS, HU 感受性を相補したが、他の変異は相補することができなかった。胞子形成については、pWS1 は相補できず、pBLM1, 2, 4 は相補した。*SGS1* の helicase domain に変異を導入した vector (K706A, helicase 活性は消失した pATP1(*sgs1-hd*)) は、MMS, HU 感受性、体細胞分裂期の組み換えを相補しなかったが、胞子形成、減数分裂組み換えは相補し、両機能における helicase 活性の要求性が異なることが示された (図3、表1)。さらに、N末、C末欠失 *SGS1* vector を用いて解析を進めたところ、体細胞分裂期および減数分裂期の機能に必要とされる Sgs1 の領域が異なることが示された。

図3 pATP1(*sgs1-hd*)による、MMS, HU感受性の相補

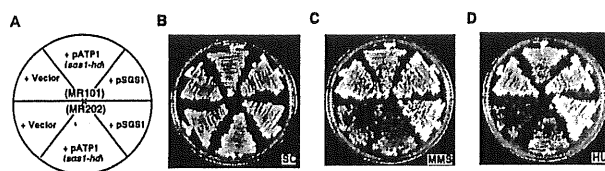


表1 pATP1 (*sgs1-hd*)による、組み換え、胞子形成の相補

Strain	plasmid	Mitotic recomb.	Spontiation		Mitotic recomb.
		(His+ frequency)	(% of asci formed)		(His+ frequency)
			0h	12h	24h
MR101 (WT)	+ vector	2.7×10^4	82	89	27.8×10^3
	+ pSGS1	3.1×10^4	82	89	26.1×10^3
	+pATP1 (<i>sgs1-hd</i>)	3.5×10^4	81	89	24.1×10^3
MR202 (<i>sgs1</i>)	+ vector	23.4×10^4	4.9	7.4	4.2×10^3
	+ pSGS1	6.0×10^4	36	64	22.3×10^3
	+pATP1 (<i>sgs1-hd</i>)	16.3×10^4	23	50	15.5×10^3

以上の結果より、出芽酵母において Sgs1 は、体細胞分裂期の DNA 修復、DNA 組み換えにおいて機能を果たしていることが明らかとなった。体細胞分裂期における DNA 修復については、*sgs1* 破壊株が MMS,

EMS, HU に対して感受性を示し、Sgs1 は、酵母細胞においてアルキル化剤による DNA 損傷に対する DNA 修復に関与してしていると考えられた。この結果は、ブルーム症候群患者の細胞がアルキル化剤に感受性を示すという報告と一致していた。体細胞分裂期における組み換えについては、interchromosomal homologous recombination において、sgs1 破壊株は高頻度組み換えの表現型を示した。組み換えにおける頻度の上昇は、ブルーム症候群患者の細胞における姉妹染色分体交換(sister chromatid exchange, SCE)の頻度上昇、ウェルナー症候群における染色体の欠失、転座、ロトムント・トムソン症候群における染色体モザイク現象と相関していると考えられる。また、ウェルナー症候群、ロトムント・トムソン症候群において観察される早期老化の症状とも深い関連があると考えられる。

減数分裂期においても、Sgs1 は機能を果たしていることが明らかとなった。出芽酵母細胞において sgs1 破壊株は、胞子形成の低下、減数分裂組み換え頻度の低下を示し、野生株では SGS1 mRNA の誘導が観察された。Sgs1 は減数分裂において、複数の過程 (DSB より前、および組み換えの後期から子嚢胞子形成の過程) に機能していることが示唆された。ヒトの臓器・組織における mRNA の発現は、BLM は胸腺と精巣、WRN は膵臓、精巣、卵巣、RTS は胸腺と精巣で高い。BLM, WRN, RTS の mRNA が高発現する臓器・組織は、臨床症状の現れる部位と関連していると考えられる。ブルーム症候群患者において、男性患者の不妊が報告されており、このメカニズムを解明する上で重要な知見となることが期待できる。

部位特異的変異導入、N 末、C 末の欠失 vector を用いた解析の結果、Sgs1 の機能の発現に重要な部位について明らかにできた。DNA 修復および体細胞分裂期組み換えについては、helicase 活性が必須で、N 末 1-45 aa および、helicase domain, C-terminal RecQ conserved region を含む 698-1195 aa 部分が必要であった。また、減数分裂における機能については、helicase 活性は必須ではなかったが、126-400 aa および helicase domain, C-terminal RecQ conserved region を含む 596-1195 aa 部分が必要であることが明らかになった (図 4)。

酵母 Two-hybrid system を用いた解析の結果、Sgs1 の N 末 1-283 aa は Top3 と、446-746 aa は Top2 と相互作用する事が示されており、両機能において、これらの蛋白との相互作用が大きく関与していることが示唆された。以上より、蛋白質の高次構造、他の蛋白質との相互作用を含めた解析を進めることにより、SGS1 の機能および、ヒト recQ 相同遺伝子の機能、疾患発症のメカニズムについて、重要な知見が得られることが期待される。

図 4 体細胞分裂期および減数分裂期に必要な Sgs1 の領域

