

所 属 (主指導教官)	原核生物分子遺伝学講座 (真木 寿治 教授)		
氏 名	渡辺 圭一	提 出	平成 13 年 1 月 9 日
題 目	出芽酵母orc変異株における染色体不安定性と チェックポイント制御機構の関与		
要旨 欠失、転座や異数性などの染色体レベルで生じる大きなゲノム変化は総じて染色体異常と呼ばれるが、これらは細胞の癌化やゲノム再編、あるいは進化に関して重要な役割を担っている。しかし、その発生機構については不明な点が多い。当研究室では、出芽酵母二倍体細胞の第Ⅲ染色体の一方に導入した <i>URA3</i> 遺伝子マーカーの喪失を指標とした染色体異常の検出・解析系を確立し、真核生物での染色体異常発生の特徴や分子機構の解明を行ってきた。 本研究では、まず最初に野生株における自然染色体異常の発生に影響を及ぼす染色体構造上の種々の要因を検討した。その結果、染色体異常の指標となる <i>URA3</i> マーカー挿入時の遺伝子配列の方向性の違いや、遺伝マーカーの挿入自体によって生じる相同染色体間での挿入部位周辺の相同性の歪みなどが、わずかではあるが有意に染色体異常の発生に影響を及ぼすことが示された。さらに、第Ⅲ染色体及び第Ⅴ染色体を対象とした自然染色体異常の解析から、相同染色体間組換えは各染色体のセントロメアと遺伝マーカーの距離に依存してほぼ同じ頻度で生じるのに対して、染色体喪失や欠失、転座などの発生頻度はそれぞれの染色体に固有の染色体上の因子に大きく依存することが明らかとなった。また、これらの解析から、自然染色体異常の発生にはS期における染色体複製が必須であり、倍加した染色体同士での様々な組換え反応が重要な役割を果たしていることが示唆された。このことは、増殖中の細胞でのDNA複製の際に組換え反応を誘発するDNA障害が発生しており、その修復の過程で染色体異常が引き起こされることを示唆している。 次に、自然染色体異常の発生原因と考えられる内在性DNA障害の実体の解明を目的として、真核生物の複製開始制御因子であるORC (origin recognition complex)の機能に欠損を持つ温度感受性変異株での染色体不安定性の解析を行った。S期中に発生した自然DNA損傷に加えて、マルチレプリコンでの複製			

様式を持つ真核生物においては、レプリコン間の複製開始のタイミングの制御が乱れた場合にも複製フォークの進行阻害が引き起こされる可能性が考えられるからである。まず、ORC複合体の最も大きなサブユニットをコードする *ORC1* 遺伝子の温度感受性変異について調べたところ、*orc1-4* および *orc1-3* のホモ二倍体細胞を非許容温度下で生育させた場合に顕著な染色体異常頻度の上昇が観察された。また、これらの変異株細胞は非許容温度下で G2/M 期での細胞周期停止を引き起こすことと、この細胞周期停止は *RAD9* 遺伝子に依存することから、ORC の機能欠損によりチェックポイント機構の活性化を誘発する何らかの DNA 障害が発生していることが示唆された。しかし、*orc1-4* 変異株での温度シフト後の G2/M 期停止は一時的なものであり、細胞周期停止の解除の後に染色体異常の誘発が見られるようになる。一方、*orc1-4 rad9Δ* 二重変異株においては、G2/M 期での細胞周期停止が起こらなくなり、温度シフト後の早い時期から染色体異常の誘発が見られる様になった。これらのことから、Orc1p の機能欠損が染色体異常の最初の引き金となる DNA 障害を誘発する潜在力を有していることが結論された。さらに、この種の DNA 障害による染色体異常の誘発は *RAD9* 遺伝子が関与するチェックポイント機構により強く抑制されることも明らかになった。

ORC の別のサブユニットをコードする *ORC2* 遺伝子に欠損を持つ *orc2-1* 変異株を用いた解析では、半許容温度である 26℃ で細胞周期の停止と生育阻害が引き起こされたが、この場合には細胞周期停止の解除や染色体異常の誘発は起こらなかった。また、*orc2-1 rad9Δ* 二重変異株においては上記の細胞周期の停止や生育阻害は解消されたが、染色体異常の発生レベルは依然として低いままであった。これらのことから、Orc2p の機能欠損によっても *RAD9* 遺伝子依存的なチェックポイント機構の活性化は引き起こされるが、*orc1* 変異株の場合とは異なり、*orc2-1* 変異株で生じる何らかの DNA 障害は染色体異常の誘発につながる潜在力は有しておらず、Orc1p の機能欠損との間に質的な相違が存在することが示唆された。この *orc1* 変異株と *orc2* 変異株の表現型の違いの原因は不明であるが、DNA 複製開始制御における Orc1p と Orc2p の役割の違いを反映している可能性が考えられる。

以上の結果から、複製開始制御が正常に働かない場合に自然染色体異常の発生を誘発することが明らかになったが、この場合に生じる DNA 障害の特徴や特異的な修復機構については今後の研究での解明が期待される。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 渡 辺 圭 一

染色体の再編はゲノム情報の維持および生物進化を考える上で最も基本的な問題である。また、癌や各種の遺伝病などの遺伝子疾患の発症に伴って、頻繁に染色体再編が見出される。これらのことから、染色体再編の発生や制御の分子機構の解明は生物学上の問題にとどまらず医学の上でも重要な課題となっている。これまでの出芽酵母を用いた遺伝学的解析などから、通常の細胞増殖の際に生じる自然染色体異常の大部分には相同染色体間もしくは異なる染色体間での相同組換えが関与することが示されている。このことから、紫外線や変異原物質などの細胞外からの要因による DNA 傷害がない場合でも、細胞内では組換え反応を誘発する何らかの DNA 傷害が染色体上に生じていることが強く示唆されている。しかしながら、組換え反応を誘発する内在性の原因については不明な点が多い。本論文は、出芽酵母二倍体細胞を用いて、染色体複製開始制御の乱れが自然染色体異常発生の要因となっている可能性を遺伝学的に研究したものである。

まず、出芽酵母の複製開始制御に関与する *ORC1* 遺伝子の温度感受性変異株の非許容温度下での増殖中の染色体異常の発生が詳細に解析された。その結果、*orc1* 変異株では非許容温度下で染色体異常が強く誘発されることが明らかになり、複製開始制御の異常が自然染色体異常の発生を引き起こすことが明確に示された。しかし、染色体異常の誘発は細胞を非許容温度にさらしてすぐに観察されるわけではなく、10 時間以上の処理が必要であった。また、細胞を非許容温度にさらすと、細胞増殖は10 時間までは継続し、その後に顕著な細胞死の誘導が観察された。この結果を踏まえて、変異株の細胞増殖・細胞周期が詳細に検討された。その結果、*orc1* 変異株を非許容温度下に移すと、複製開始制御の乱れに起因する未知の DNA 傷害が発生し、細胞周期のチェックポイント制御がそれを検知して細胞周期を停止させるのみならず細胞死を誘導することが明確に示された。これらの実験結果により、細胞周期のチェックポイント制御機構は複製開始制御の乱れを監視しており、細胞周期制御と細胞死の誘発をコントロールすることにより染色体異常の発生を強く抑制していることが初めて発見された。

以上のように、本論文は真核生物における自然染色体の発生と抑制に複製開始制御機構およびチェックポイント制御機構が関与することを世界で初めて明らかにし、出芽酵母においてもチェックポイント制御機構の作用としての細胞死の誘導を発見したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。