

論文内容の要旨

申請者氏名 井手 聖

申請者が所属する研究グループでは、真核生物の染色体異常の発生原因の一つとして、染色体複製開始制御プログラムの異常に起因する複製フォークの進行阻害を見いだしている。さらに、そのような複製フォーク進行阻害は細胞周期を G2/M 期で停止させる DNA 損傷チェックポイントを誘導し、細胞が持つ様々な修復機構の働きや複製開始制御プログラムの正常化を通じて染色体異常の発生を抑制することも明らかにしている。また、出芽酵母の複製開始制御に中心的な役割を果たしている複製開始複合体(origin recognition complex: ORC)をコードする遺伝子群の温度感受性変異株の解析を行う中で、複製開始制御プログラムの異常に伴って第 12 番染色体が高度に不安定化することを発見した。この高度な染色体不安定性の原因を究明する過程で、第 12 番染色体に存在する反復配列である rDNA が複製開始制御プログラムの異常によるチェックポイント誘導に何らかの役割を果たしている可能性が示唆されていた。

申請者は、主として遺伝学的な手法を用いて、rDNA のチェックポイント誘導に果たす役割の解明に取り組んでいる。申請者は、まず 2 種類の *orc* 変異株 (*orc1-4*, *orc2-1*) での高温下で誘導されるチェックポイント制御が働くなつた細胞を分離し、それらの細胞では第 12 番染色体の rDNA 領域が大きく欠失していることを見いだした。そこで、rDNA 領域の短縮と温度感受性抑制の効果の因果関係を明らかにするために、通常 rDNA 単位配列が 150 コピー反復されている rDNA 領域を人為的に 30 コピーまで減少させた細胞を作製し、2 種類の *orc* 変異株について、それぞれの温度感受性が抑制されるかを調べた。その結果、rDNA 領域を短縮させた *orc* 変異株では、温度シフトした後、G2/M 期での細胞周期の停止が誘導されなくなり、チェックポイントキナーゼである Rad53p のリン酸化によるシグナル伝達も 150 コピーの rDNA 領域を持つ *orc* 変異株に比べて低下していることを見いだした。このことから、rDNA 領域が短縮することによって、*orc* 変異株でのチェックポイント応答の感度が低下することを示した。さらに、rDNA 領域の短縮によって、*orc2-1* 変異株で特異的に生じる rDNA 領域の DNA 複製の遅延が緩和されることを明らかにしている。また、rDNA のコピー数が減少すると rDNA 単位配列に含まれる複製開始領域の開始頻度が上昇することも発見している。以上の結果などから、複製開始制御が乱れた時、rDNA 領域では、他の染色体に比べて、複製フォークの進行阻害が起きやすく、その結果、高頻度に DNA 損傷が生じていると考えられ、細胞は、rDNA 領域の特殊な複製様式を利用することで、複製開始制御の乱れにより誘発される DNA 損傷チェックポイントをモニターしている可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 井手 聖

真核生物のゲノムには多数の複製起点が散在し、各複製起点からの複製開始のタイミングや順序は厳密に制御されている。これまでの申請者が所属する研究グループの研究などから、複製開始制御プログラムが正しく行われることはゲノムを正確に複製するために必要不可欠であることが示されている。複製開始制御の中心的な役割を果たす複製開始複合体 (origin recognition complex : ORC) の遺伝子群の出芽酵母温度感受性変異株では、高温下で培養すると、ゲノム全体の活性化する複製起点の数が減少し、かつ、その順序が乱れ、染色体喪失や染色体再編などの染色体異常が誘発される。こうした複製開始制御の乱れは、いくつかの腫瘍細胞でも観察されており、腫瘍細胞の悪性化や細胞のガン化を考える上でも重要である。さらに、出芽酵母 *orc* 変異株では、複製開始制御が乱れた時、DNA 損傷チェックポイント機構がその異常を感知し、DNA 修復を活性化したり、細胞死を誘導することによって、染色体異常の発生を抑制することが知られている。

申請者は、出芽酵母ゲノム中の高度反復配列の一つである rDNA 領域が複製開始制御の異常に伴って、最も早くかつ高頻度に遺伝的不安定性を示すことに着目し、この遺伝的不安定性の原因を解明するとともに、チェックポイント誘導における rDNA 領域の役割の解明を行い、以下の成果をあげている。

- 1) 複製開始制御の異常により rDNA 領域の DNA 複製は特異的に阻害あるいは大きく遅延することを発見し、この領域での DNA 複製の阻害が DNA 損傷チェックポイントを誘発することを示した。
- 2) 上記の DNA 複製阻害は rDNA 領域の反復配列のコピー数を減少させると大幅に緩和されることを見だし、その原因は rDNA 配列中の複製開始領域の開始活性が反復配列のコピー数と逆相関することにあることを示した。
- 3) rDNA 領域に特異的な複製開始制御の異常に依存する複製阻害は 5S rRNA の転写と DNA 複製の衝突に起因する可能性を示した。

以上のように、本論文は複製開始制御の異常をモニターする細胞機能に関する画期的な発見を行ったもので、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。