

所属 (主指導教官)	原核生物分子遺伝学 (真木 寿治 教授)		
氏名	吉田 純平	提出	平成15年 1月 7日
題目	出芽酵母のゲノム安定性維持における相同組換えと複製後修復の役割		

ゲノム情報の遺伝的変化は、点突然変異の様な塩基配列レベルで生じる変化と、転座や欠失といった染色体レベルでの変化の二種類に大別される。染色体レベルでの遺伝情報の変化は、様々な疾患やゲノム再編、進化といった事象と密接に関連していると考えられているが、その発生や制御のメカニズムには不明な点が多い。この点について分子レベルで明らかにするため、当研究室では、出芽酵母二倍体細胞をモデルとした解析系を用いた研究が進められて来た。この系では第 III 染色体に挿入した *URA3* マーカーのヘテロ接合性の喪失 (LOH; Loss of Heterozygosity) を指標とすることで、染色体喪失、交叉・転座などの染色体再編から点突然変異まで多様なゲノムの変化を網羅的に検出・分類し、それぞれを定量的に比較することが可能である。野生株において自然発生する LOH の頻度は 1.2×10^{-4} であり、そのうち 30%は交叉等の相同染色体アリル間の組換えによるものであった。異常なサイズの染色体を生じる転座や欠失は 10%の割合で検出され、その殆どがレトロトランスポゾン等の散在性の繰返し配列を介した異所性組換えにより生じていた。このように、アリル間の組換えと同様、異所性組換えも相同性を利用したものであった。また、染色体喪失は LOH の 60%を占めていたが、その一部には交叉に伴って生じたと思われるものがあつた。つまり、相同組換え機構がこれらの染色体異常・再編の発生過程に多面的に関与していることが示された。これらの結果より、通常の細胞増殖期には相同組換えの基質となる様な自然 DNA 傷害が発生しており、それが LOH の主要な原因となっていることが示唆された。

本研究では、まず染色体異常・再編の発生における相同組換えの役割を明確にするため、相同組換え関連遺伝子である *RAD52*、*RAD51* および *RAD50* 遺伝子を欠損した株を作製し、それらに生じる LOH を詳細に解析した。*RAD52* 遺伝子は鎖交換や単鎖対合といった相同組換え経路全般に、*RAD51* 遺伝子は鎖交換反応に要求される。また、*RAD50* 遺伝子は組換え初期過程の DNA 末端のプロセッシングに関与している。これらの欠損株ではいずれも LOH 頻度が $2.5 \sim 3.6 \times 10^{-3}$ と野生株の 20~30 倍と大きく上昇し、染色体喪失が LOH の 80~99%を占めていた。これらの結果から、増殖中の細胞内では染色体の崩壊や複製阻害をもたらす様な自然 DNA 傷害が頻繁に生じており、それらは相同組換え機構によってエラーフリーに、つまり LOH を伴わない形で回避されていることが示唆された。このような回避プロセスの実体は姉妹染色分体間の組換えであると推測される。*rad50 rad52* および *rad51 rad52* 二重欠損株とそれぞれの単独欠損株を比較すると染色体喪失の発生頻度は全

て同レベルだったことから、姉妹染色分体間の組換えの大部分は *RAD52*、*RAD51* および *RAD50* 遺伝子の全てを必要とすることが示唆される。アリル間・異所性組換えによる LOH に関しては、*rad52* 欠損株では全てのタイプの頻度が野生株に対し減少していたが、*rad50* 欠損株ではこれらは逆に増加していた。また、*rad51* 欠損株では異所性組換えの頻度のみが増加していた。これらの結果より、LOH の発生には複数の非姉妹染色分体間の組換え経路が関与しており、各欠損株の結果は、それぞれの株で利用可能な組換え経路の種類やその寄与度を反映していると考えられる。以上の知見を総合して考察すると、自然 DNA 傷害の多くは相同組換え機構により回避されているが、その過程の一部が染色体異常・再編を引き起こしていることが推測される。さらに、*rad52* 欠損株と *rad51* 欠損株では野生株に比べ点突然変異が顕著に上昇し、また、*rad52* 欠損株では相同配列を介していない転座も一例認められた。このことから、相同組換えが欠損した場合には、少なくとも一部の自然 DNA 傷害は損傷乗り越え DNA 合成や非相同末端結合 (NHEJ; Non homologous end joining) の様な代替経路によって回避されていることが推測された。これらの経路の基質は相同組換えの基質と部分的に共通であることが知られており、それぞれ相同組換えと相互に補完して作用している可能性が考えられた。

そこで研究の第二段階として、損傷乗り越え DNA 合成を含めた複製後修復機構や NHEJ の役割を明らかにするために、これらの経路に関連する遺伝子を欠損した株で LOH を解析した。複製後修復は *RAD6-RAD18* 遺伝子により制御され、その下流に *RAD5*、*RAD30* および *REV3* それぞれの遺伝子が関与する複数の経路が知られている。*RAD6-RAD18*、*RAD5* 遺伝子はユビキチン化を介した機構によって複製後修復に関与しており、*RAD30*、*REV3* 遺伝子はそれぞれ損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼをコードしている。*rad18* 欠損株では LOH 頻度が 1.4×10^3 と野生株の約 12 倍に上昇し、染色体喪失と *RAD52* 依存性の種々の染色体再編の双方について上昇が観られた。一方、*rad18 rad52* 二重欠損株では LOH 頻度が 7.1×10^3 と野生株の 59 倍と劇的に上昇し、そのほぼ全てが染色体喪失によるものであった。この頻度は *rad18* 欠損株と *rad52* 欠損株それぞれの LOH 頻度の総和よりも高かった。また、*rad5*、*rad30* および *rev3* 欠損に関しては、それぞれ、単独欠損および *rad52* との二重欠損のいずれの場合も *rad18* 欠損ほどには LOH に大きな影響を及ぼさなかった。以上の知見より、1) 相同組換えの場合と同様、複製後修復も染色体の崩壊や複製阻害の回避に寄与している、2) 一部の自然 DNA 傷害は複製後修復と相同組換えのいずれの経路でも回避可能であり、一方の欠損時にはもう一方が回避プロセスを代替できる、3) これらの回避プロセスの大半はエラーフリーに行われ、点突然変異や染色体再編など遺伝的变化を伴うものはごく一部である、4) *RAD18* 遺伝子下流の複数の経路に関しては、*RAD5*、*RAD30* および *REV3* 遺伝子のそれぞれが関与する経路が互いに補完して機能しているか、あるいは、本研究では調べていない第四の経路が寄与していることが示唆された。また、NHEJ に関しては *HDF1* 遺伝子の欠損による影響を調べた。この遺伝子がコードする Ku 蛋白は DNA 末端に結合し、末端同士の接合反応を促進することが知られている。この遺伝子は単独欠損および *rad52* との二重欠損のいずれの場合も LOH に対する影響は殆ど認められなかったことから、少なくとも自然 DNA 損傷の回避や LOH の発生には関与していないことが示唆された。

出芽酵母のゲノム安定性維持における
相同組換えと複製後修復の役割

吉田 純平
奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 原核生物分子遺伝学講座
(真木 寿治 教授)

平成15年1月7日提出

目次

	頁
I 序論	p7 - p22
I-1 出芽酵母二倍体細胞をモデルとしたLOH解析系	
I-2 野生株におけるLOH解析により得られた知見	
I-3 相同組換え反応の基質となるDNA傷害とその回避機構	
I-3-1 two-strand DNA傷害とは	
I-3-2 相同組換え機構	
I-3-3 複製後修復機構	
I-3-4 NHEJ (Non-homologous end joining) 機構	
I-4 本研究の概要	
II 材料と方法	p23 - p43
II-1 培地	
II-2 一般的な遺伝学的手法とDNA操作	
II-3 形質転換法	
II-4 プラスミドDNA	
II-5 菌株	
II-5-1 <i>rad52</i> 、 <i>rad51</i> および <i>rad50</i> 単独欠損株の作製	
II-5-2 <i>rad50 rad52</i> および <i>ad51 rad52</i> 二重欠損株の作製	
II-5-3 <i>rad18</i> 、 <i>rad5</i> 、 <i>rad30</i> および <i>rev3</i> 単独欠損株の作製	
II-5-4 <i>rad18 rad52</i> 、 <i>rad5 rad52</i> 、 <i>rad30 rad52</i> および <i>rev3 rad52</i> 二重欠損株の作製	
II-5-5 <i>hdf1</i> 単独欠損株の作製	
II-5-6 <i>hdf1 rad52</i> 二重欠損株の作製	
II-6 PCR法	
II-7 MMS感受性の検定、生育の調査	
II-8 LOH解析	
II-8-1 表現型による分類	
II-8-2 パルスフィールドゲル電気泳動	
II-8-3 サザンブロットィング法	
II-8-4 定量的PCRによる <i>URA3</i> 遺伝子マーカー挿入領域の構造解析	

- II-8-5 ゲノムスキヤニング法
- II-8-6 異常染色体融合部の解析
- II-8-7 DNAの塩基配列解析

III 結果

p44 - p103

III-1 相同組換え欠損株の解析

- III-1-1 相同組換え欠損がアルキル化剤感受性に及ぼす影響
- III-1-2 相同組換え欠損が生育に及ぼす影響
- III-1-3 LOH解析系の概略
- III-1-4 相同組換え欠損株では染色体喪失によるLOHが上昇する
- III-1-5 *rad52* 欠損はあらゆるタイプの組換えを減少させる
- III-1-6 *rad52* 欠損株に生じた異常染色体の解析
- III-1-7 *rad51* 欠損は異所性組換えを増加させる
- III-1-8 *rad50* 欠損はアレル間の組換えと異所性組換えの双方を増加させる
- III-1-9 *rad52* および *rad51* 欠損株では点突然変異の発生が上昇する

III-2 複製後修復欠損株の解析

- III-2-1 複製後修復欠損がアルキル化剤感受性に及ぼす影響
- III-2-2 *rad18* 欠損が生育に及ぼす影響
- III-2-3 *rad18* 欠損はLOHを上昇させる
- III-2-4 *rad18* 欠損株では相同組換えが上昇する
- III-2-5 *rad5*、*rad30* および *rev3* 欠損はLOHに大きな影響を及ぼさない

III-3 NHEJ欠損株の解析

- III-3-1 *hdf1* 欠損が温度感受性に及ぼす影響
- III-3-2 *hdf1* 欠損が生育に及ぼす影響
- III-3-3 *hdf1* 欠損はLOHに大きな影響を及ぼさない

IV 考察

p104 - p129

- IV-1 相同組換えによる染色体の安定な維持；姉妹染色分体間の組換えの関与
- IV-2 染色体の安定な維持には*RAD52*、*RAD51* および*RAD50* 遺伝子全てが必要であ

る

IV-3 染色体再編を生じる複数の相同組換え経路

IV-3-1 *RAD52* 遺伝子依存적および非依存적組換え経路

IV-3-2 *RAD51* 遺伝子は異所性組換えを抑制する

IV-3-3 *RAD50* 遺伝子は姉妹染色分体間の組換えを促進する

IV-4 相同組換えの代替経路としての複製後修復

IV-4-1 *rad52* および *rad51* 欠損株では点突然変異が上昇する

IV-4-2 *RAD18* 遺伝子は自然DNA傷害のエラーフリーな回避に寄与する

IV-4-3 *RAD18* 遺伝子下流の経路群のLOHへの関与

IV-5 NHEJはLOHの発生や抑制には寄与しない

IV-6 自然DNA傷害の実体とは？

IV-7 本研究のまとめ

IV-8 今後の展望

謝辞

p130

参考文献

p131 - p140

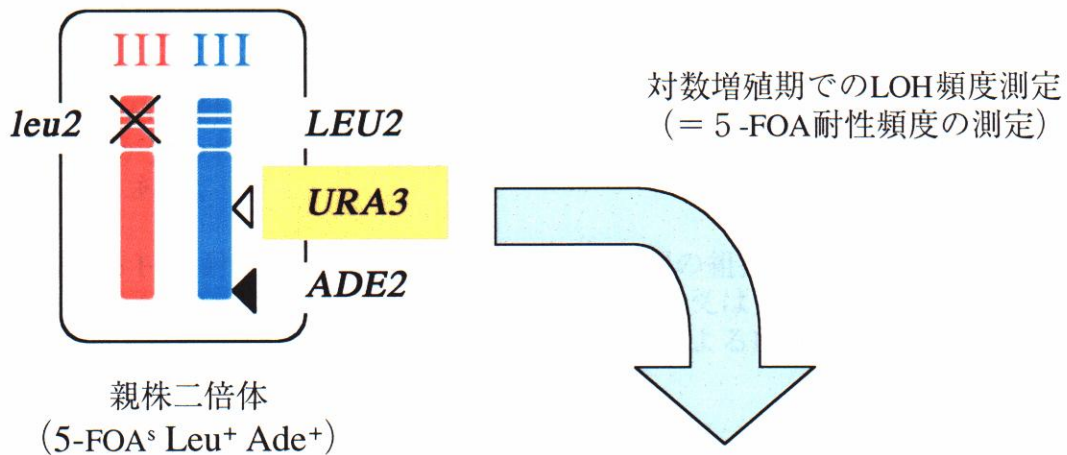
I 序論

ゲノム情報を正確に複製して次世代へ伝達することは、全ての生物にとって最も基本的で重要な課題である。しかし一方で、ゲノムは“動的”な存在であることもまた事実だ。例えば、細胞が分化する際には点突然変異や小規模なゲノムの再編が起きることが知られているし、また、比較生物学的な見地からは大規模なゲノムの再編が進化や種の分化に寄与している可能性が示唆されている。ゲノム情報の遺伝的変化は、点突然変異の様な「塩基配列レベルで生じる変化」と、転座や欠失といった「染色体レベルで生じる変化」の二種類に大別され、特に前者の発生メカニズムに関しては大腸菌をモデル生物としたアプローチにより *in vivo*、*in vitro* の両面から解明されつつある。一方で、染色体レベルの遺伝的変化に関してはその発生メカニズムを示唆するに足る知見があまり蓄積されていないのが現状だ。点突然変異の蓄積に比べ、転座や欠失の様な染色体の広範囲に渡って生じる変化は多数の遺伝子が同時に影響を受ける。この様な変化はゲノムの再編成を引き起こして進化や種・細胞の分化に貢献しているだけでなく、癌と言った遺伝性疾患にも関与していると考えられている。

I-1 出芽酵母二倍体細胞をモデルとしたLOH解析系

当研究室では、染色体レベルでの遺伝的変化の発生や制御のメカニズムを明らかにする目的で、出芽酵母二倍体をモデルとした解析系を用いた研究が進められてきた (Hiraoka et al. 2000 ; Umezu et al. 2002)。出芽酵母を用いた理由としては、1) ゲノムプロジェクトが完了しているため染色体の再編が生じた箇所を塩基配列レベルで解析できる、2) 細胞集団の扱いが容易であるため、定量的な測定を行うことができる、3) 各種変異株・欠損株を用いた遺伝学的解析が容易に行なえる、等が挙げられる。また、二倍体細胞では必須遺伝子を1コピー失っても生育できるため、一倍体細胞では死に至ってしまう様な遺伝情報の変化が検出可能である。この解析系では主として染色体レベルでの異常・再編に関して、第III染色体上に発生するものを検出する。この染色体を選んだ理由に関しては、複製開始点や減数分裂時の組換えのホットスポット等の染色体構造因子についての研究が進んでいる点が挙げられる。染色体異常・再編発生に関与する因子を考察する上で、これらの情報は非常に有利であると考えられる。

解析系の基本構想を図I-1に示した。親株となる二倍体細胞は、片方の第III染色体の右腕中央部、左腕末端から205 kbの領域 (以下III-205領域と表記する) に *URA3* 遺



		パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による解析	
		第III染色体 2コピー	染色体異常あり (数・サイズの異常)
表現型による解析	クラスA 5-FOA ^r Leu ⁻ Ade ⁻	 a 染色体喪失 + 複製	 a' 染色体喪失
	クラスB 5-FOA ^r Leu ⁺ Ade ⁻	 a 交叉	 a' 交叉 + 染色体喪失 b 不等交叉 又は転座
	クラスC 5-FOA ^r Leu ⁺ Ade ⁺	 a URA3 内変異 b 遺伝子変換	 b' 遺伝子変換 + 染色体喪失 c 染色体内欠失

図I-1 LOH解析系の概要

MAT_a一倍体株由来の第III染色体を青色で、MAT_α一倍体株由来の第III染色体を赤色で示した。二倍体株はこれら的一倍体株同士を接合することによって構築する。第III染色体以外の染色体については緑色で示した。第III染色体上のLEU2遺伝子座を白い二本線、第III染色体205 kb領域に挿入されたURA3遺伝子マーカーを白三角、314 kb領域に挿入されたADE2遺伝子マーカーを黒三角で示した。遺伝子マーカーの機能が失われている場合にはX印を表記した。

*URA3*マーカーの喪失 (LOH) に伴う様々な遺伝的変化の分類は、同じ染色体上の *LEU2* および *ADE2* 遺伝子マーカーの有無による表現型の分類と、PFGEやPCR法を用いた染色体構造変化の直接的同定を組み合わせることで行った。

クラスA) 5-FOA耐性Leu⁻Ade⁻クローンは染色体喪失によるLOHに分類される。単純に片方の染色体が失われるもの (a') に加え、*MAT α* 一倍体株由来の染色体が2本分になる場合 (a) もある。

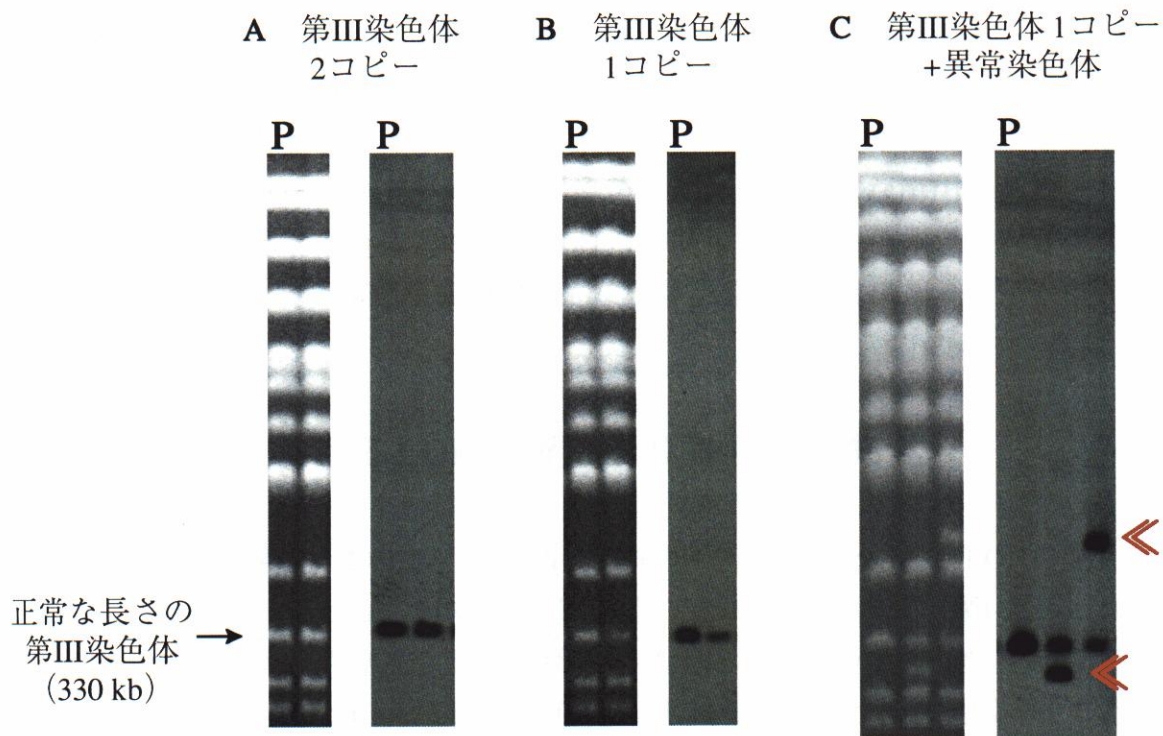
クラスB) 5-FOA耐性Leu⁺Ade⁻クローンは染色体間の組換えによるLOHに分類される。交叉 (a)、不等交叉又は転座 (b) が含まれる。交叉は染色体喪失を伴う場合 (a') がある。転座又は不等交叉といった異所性の組換えによるLOHを生じたクローンでは異常なサイズの第III染色体が検出される。

クラスC) 5-FOA耐性Leu⁺Ade⁺クローンは *URA3* 遺伝子マーカー内の変異 (a)、遺伝子変換 (b)、染色体内欠失 (c) のいずれかによるLOHに分類される。遺伝子変換は染色体喪失を伴う場合 (b') がある。aとbはPFGEで区別することは不可能であるが、*URA3* 遺伝子マーカー挿入領域の構造をPCR法によって解析することにより判別することが可能である。

伝子マーカーが挿入されている。この様に、相同染色体の相対立する位置に存在する対立遺伝子（アリル）が異なる状態になっていることをヘテロ接合性と呼ぶ。この *URA3* 遺伝子はウラシル生合成に関与する遺伝子の一つであるが、同時に5-FOA（5-フルオロオロチン酸）と呼ばれる薬剤も代謝して5-フルオロデオキシウリジンという細胞の生育を阻害する物質（具体的には、チミジル酸合成酵素を阻害する）に変えてしまう活性も持っている。このため、野生型 *URA3* 遺伝子を保持している細胞は5-FOAを含んだ培地では生育することが出来ない。しかし、この遺伝子機能が不活化された場合、細胞は5-FOA耐性の表現型を獲得する。*URA3* 遺伝子マーカーのヘテロ接合性が喪失すること、つまりLoss of heterozygosity ; LOHの発生は、*URA3* 遺伝子の遺伝子機能を損なう様な何らかの変化が生じたことの指標となる。従って、5-FOA耐性頻度の測定は、*URA3* 遺伝子マーカーにおけるLOHの発生頻度を測定することと同義である。しかし、一言に *URA3* 遺伝子マーカーのLOHと言ってもその内容（LOHイベント）は多種多様だ（図I-1）。そこでこの解析系では、*URA3* 遺伝子マーカーと同じ染色体上、左腕III-91領域に存在する *LEU2* 遺伝子、ならびに右腕末端部III-314領域に挿入された *ADE2* 遺伝子を補助マーカーとして利用し、その有無を表現型によって調べることで、LOHイベントを大まかに3つのクラスに分類するという工夫を施している。5-FOA耐性の表現型を獲得したクローンのうち、染色体喪失によって第III染色体上のマーカーを3つとも失ってしまったものは5-FOA耐性Leu⁻ Ade⁻の表現型を示す。5-FOA耐性Leu⁺Ade⁻の表現型を示すクローンは、セントロメア（III-114）から *URA3* 遺伝子マーカーの間で染色体間の組換えが生じ、右腕末端までの部分が別の染色体（*MAT α* 一倍体株由来の相同染色体や、第III以外の染色体）に置き換わったものが含まれる。交叉や不等交叉・転座はこのグループに分類される。また、5-FOA耐性Leu⁺ Ade⁺の表現型を示すクローンには、*URA3* 遺伝子マーカーの機能を失う様な塩基配列レベルの変異を生じたものや、遺伝子変換、染色体内の欠失を生じたものが含まれる。

以上の様な表現型による遺伝学的な分類に加え、パルスフィールドゲル電気泳動（以下PFGE）と第III染色体を特異的に認識するプローブを用いたサザンブロッティング法により第III染色体のコピー数やサイズを観察することで、各グループ内をより細かく分類することが可能である（図I-2）。正常な長さの第III染色体が2コピー分あるものは交叉、*URA3* 遺伝子マーカー内の変異、遺伝子変換に分類される。第III染色体が1コピー分のみのものは染色体喪失に、これに加え大小様々なサイズの異常染色体が認められるものは不等交叉・転座、染色体内欠失に分類される。また、*URA3* 遺伝子マーカー内の変異と遺伝子変換に関しては、*URA3* 遺伝子マーカー挿入断片の有無をPCR法で解析することにより区別が可能である。

この様に、表現型による分類と、PFGEやPCR法を用いた染色体構造変化の直接的同定を組み合わせることにより、*URA3* 遺伝子マーカーのLOHに伴う様々な遺伝的



図I-2 パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）と
サザンブロッティングによる染色体構造変化の解析

親株二倍体（LOHを生じていないクローン）をP、転座や不等交叉、染色体欠失等により生じた異常染色体の位置を◀で示した。A～Cではそれぞれ左側にPFGEの泳動像、右側に第III染色体を特異的に認識するプローブを用いたサザンブロッティングの結果を示した。

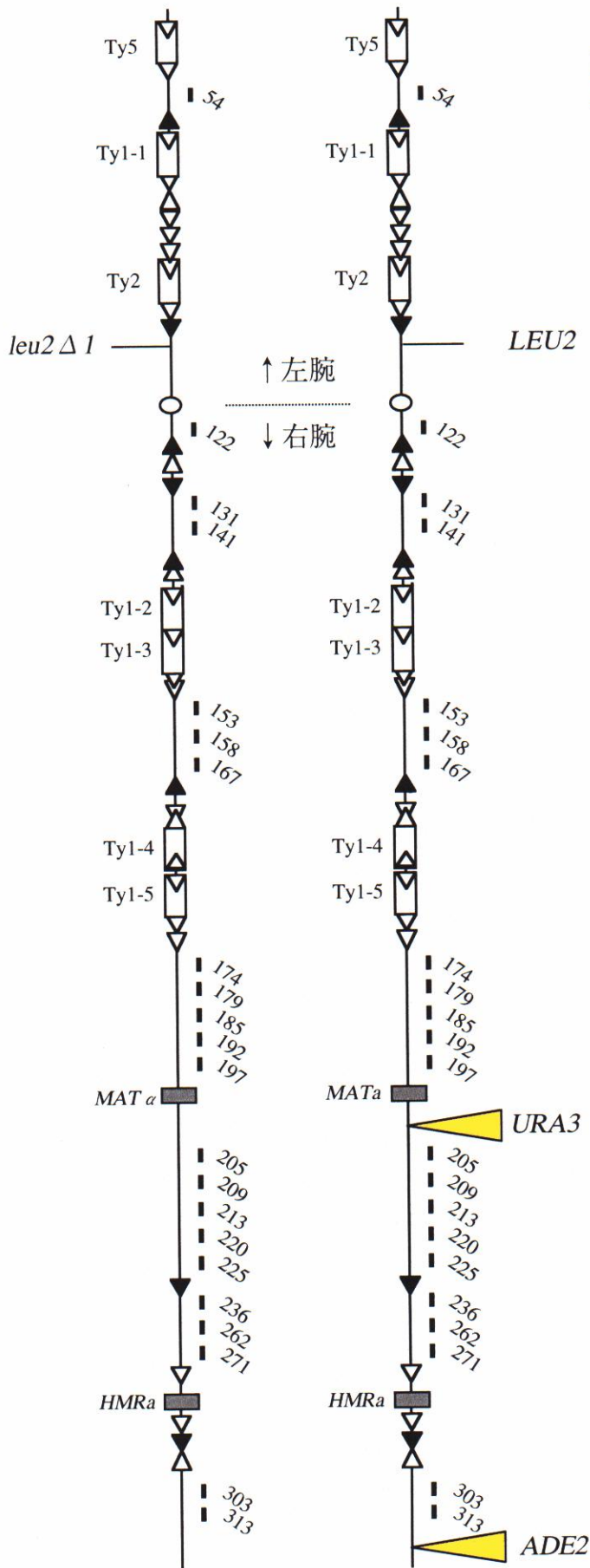
通常のアガロースゲル電気泳動法では20 kb以上の線状DNAを分離することは困難である。PFGEでは、アガロースブロックに埋包したDNA試料に対し、交差する二方向の電場を交互にかけることによりこの問題を解決している。この手法を用いた場合、第III染色体について泳動像のバンド濃度を定量することによりそのコピー数を決定することができる。AはLOHが生じて第III染色体のコピー数やサイズに変化がない例を示している。交叉、遺伝子変換、*URA3* 内変異などを生じたクローンはこのような泳動像を示す。Bは染色体喪失を生じたクローンの泳動像だが、親株やAなど第III染色体が2コピーのものに対してバンドの濃度が薄くなっている。また、CのPFGE像のようにサイズ変化を生じた異常染色体の存在を示すバンドが現れた場合には、サザンブロッティングを行うことにより、異常染色体が第III染色体由来のものか否かを判定することが可能である。

変化を分類することが可能である。染色体レベルでの遺伝的変化のうち、交叉と遺伝子変換は相同染色体アリル間の組換えで、転座・不等交叉や染色体内欠失は異所性の組換えにより形成されるが、本研究ではこれらの遺伝的変化が発生する過程をまとめて染色体再編と呼称する場合がある。また、異所性の組換えによる染色体再編を経て形成されたサイズ異常を示す染色体（つまり正常な第III染色体と異なる長さの染色体）を異常染色体と呼び、これらの発生過程を染色体異常と呼称する。これに加え、染色体喪失が発生する過程も染色体異常に含まれる。

I-2 野生株におけるLOH解析により得られた知見

このLOH解析系を用いて野生株に生じるLOHを解析した結果、LOHの発生頻度は 1.2×10^{-4} であり、そのうち34%が相同染色体アリル間の組換え（図I-1 B-a、C-b）、8%が染色体のサイズ異常を生じる異所性組換えによるものであった（図I-1 B-b、C-c、Hiraoka et al. 2000；Umezu et al. 2002）。平岡らは特にサイズ異常を生じた異常染色体に着目し、ゲノムスキニング法（詳細は本稿III-1-6に後述）によって異常染色体の融合部の構造解析を行った（森 1997年修士論文；平岡 2000年博士論文；Umezu et al. 2002）。その結果、サイズ異常を生じた異常染色体には、その融合部にゲノム中に散在する繰り返し配列が介在していることが判明した。例えば転座や不等交叉の場合、ほぼ全ての異常染色体の融合部にTy1因子やLTR配列（Long terminal repeat）が見い出された。出芽酵母のTy1は両端に約330 bpのLTR配列を持つ全長5.9 kbのレトロトランスポゾン的一种であり（Boeke 1991）、出芽酵母のゲノム中には約50コピーのTy1因子と約270コピーのLTR配列が存在することがゲノムプロジェクトによって判明している。本研究に用いている株の第III染色体上には5コピーのTy1因子と複数のLTR配列が存在していることが平岡の解析によって明らかになっている（図I-3、平岡 2000年博士論文）。染色体内欠失に関しては、その全てが第III染色体右腕に存在する*MATa*と*HMRa*という長さ1.6 kbの順方向に並んだ相同性の極めて高い繰り返し配列間（図I-3）で生じていた。これらの結果は、繰り返し配列の相同性を利用した異所性の相同組換えにより異常染色体が生じたことを示唆している。この様に、野生株では相同染色体アリル間の組換えに加え、異所性の組換えに関しても相同性が利用されていることが明らかとなった。また、交叉の6%が染色体喪失を伴ったものであったが（図I-1 B-a'）、この結果は相同染色体アリル間の相同組換えに付随して染色体喪失が生じたことを示唆している。

以上の様に、野生株におけるLOH解析では染色体再編や染色体喪失といった様々なLOHイベントの発生過程に相同組換え機構が関与していることが示唆された。多



図I-3
二倍体株における第III染色体の構造

第III染色体の配列を細い縦線、セントロメアを白丸、tRNAを黒四角、LTR配列を白三角、Ty因子を白三角と白四角、*MAT*および*HMR* 遺伝子座を灰色の四角で表した。また、*LEU2* 遺伝子座を細い横線、*URA3* 遺伝子マーカーおよび*ADE2* 遺伝子マーカーを黄色の三角で表した。第III染色体の右側にはゲノムスキニングに用いたプライマーセットのおおまかな結合位置を太い縦線と数字で表した。数字は第III染色体左腕（この図ではセントロメアより上側）末端からの距離 (kb) を示している。

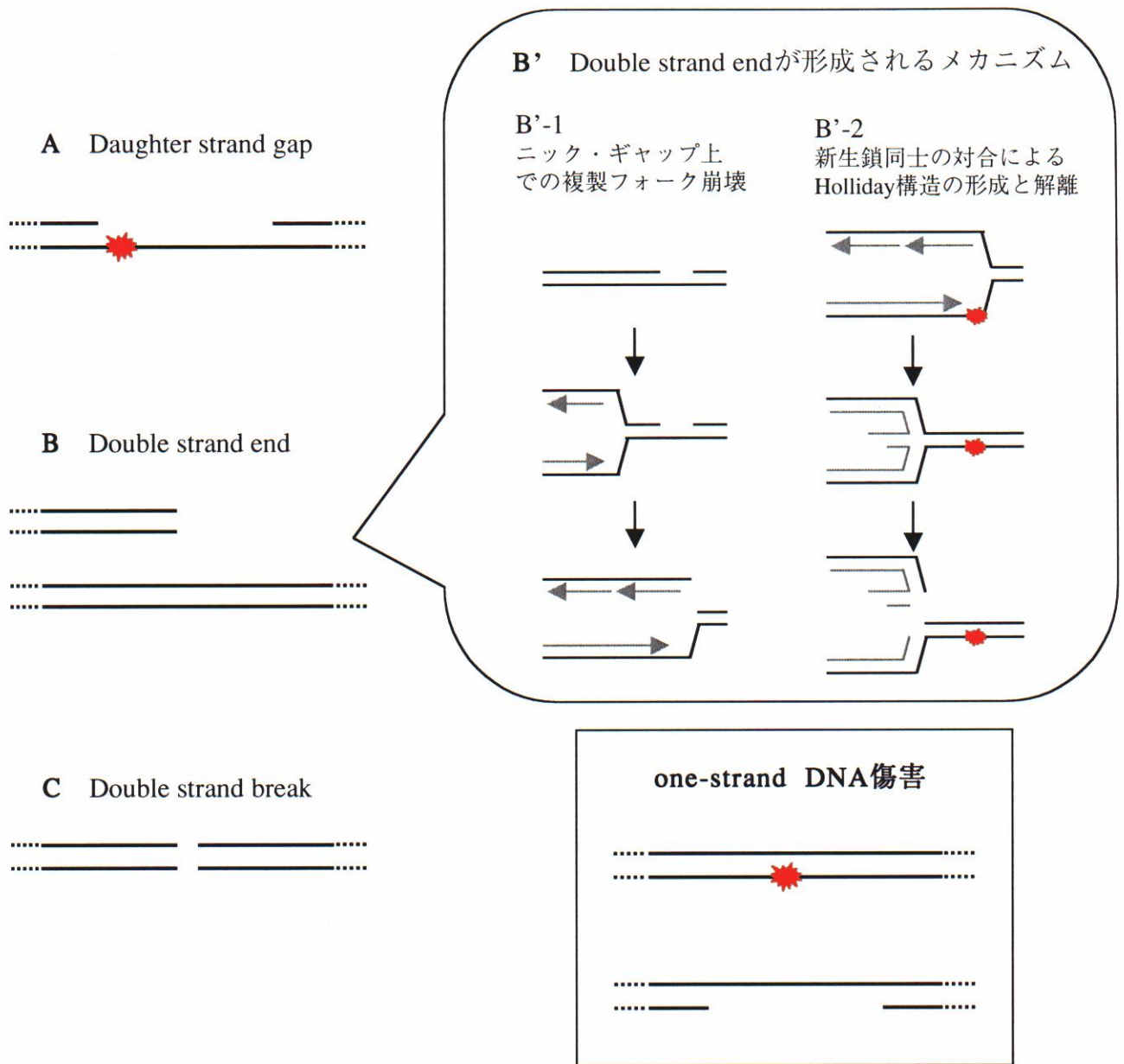
本研究で用いている親株は出芽酵母のゲノムプロジェクトに用いられたS288c株由来であるが、S288c株の第III染色体上にはTy1因子は存在していない。これらの因子は本研究で用いている株に特異的に存在しており、これらの存在は平岡によって行われた構造解析によって明らかになった（平岡2000年博士論文；Umezumi et al. 2002）。

くの研究により、出芽酵母では多様な局面で相同組換え機構が利用されることが知られている。研究が進んでいる代表的なものとしては、接合型変換、減数分裂時の組換え、放射線照射やUV照射・薬剤等によって生じたDNA損傷から誘発されるDNA傷害の回避といったケースが挙げられる。これらの研究で共通して示唆されているのは、どの様なケースであっても相同組換え反応は必ずDNA末端もしくは単鎖DNAを含むDNA傷害を基質として開始される、という点である。逆に言えば、「きれいな」状態である二本鎖DNA同士で相同組換え反応が行われることを証明する報告は今迄になされていない。野生株におけるLOH解析ではDNAに傷害を誘発する様な処理を行っていないので、野生株では相同組換え反応の基質となる様な何らかのDNA傷害が自然発生しており（以下これを自然DNA傷害と呼ぶ）、それらが相同組換えによるLOHの主要な原因となっていることが考えられる。

I-3 相同組換え反応の基質となるDNA傷害とその回避機構

I-3-1. two-strand DNA傷害とは

一般的に、DNA傷害はone-strand DNA傷害とtwo-strand DNA傷害の二種類に大別されるが、このうちtwo-strand DNA傷害と呼ばれるものが主として相同組換え反応の基質になると考えられている。two-strand DNA傷害はDaughter strand gapと呼ばれるギャップ状のもの（図I-4 A）、DNA末端が一つのDouble strand end（図I-4 B）、DNA末端が二つのDouble strand break（図I-4 C）の三種類に分類される。これらのDNA傷害の発生過程には以下の様なモデルが想定されている（詳細は本稿IV-6に後述する）。Daughter strand gapに関しては、DNA上に存在する化学的な修飾や変化・脱塩基などの損傷により複製フォークの進行が阻害が生じた結果として形成されると考えられている。このDaughter strand gap、もしくは一般的なニック・ギャップの上を複製フォークが通過してしまった場合にはその崩壊が生じ、Double strand endが形成される（図I-4 B'-1）。また、近年では複製フォークの進行阻害時に新生鎖同士が対合してHolliday構造をとるモデル（複製フォーク後退モデル）が提唱されているが、この構造をHolliday構造リゾルベースと呼ばれるエンドヌクレアーゼが解離した場合にもやはりDouble strand endが形成される（図I-4 B'-2）。以上の様に、Daughter strand gapとDouble strand endの発生にはDNAの複製が密接に関与していると考えられている。Double strand breakの発生メカニズムに関しては良く分かっていない。この種のDNA傷害は主として放射線の照射やエンドヌクレアーゼ、物理的な力によって形成されることが知られている。先に述べたDaughter strand gap、もしくは一般的なニッ



図I-4 two-strand DNA傷害の種類

DNA上の損傷（化学的な修飾や変化、脱塩基など）を★で、二本鎖DNAを二本の実線と点線で示した。

two-strand DNA傷害はDaughter strand gap (A)、Double strand end (B)、Double strand break (C)の三種類に分類される。Double strand endが形成されるメカニズムに関しては、ニック・ギャップ上での複製フォークの崩壊 (B'-1)、もしくは、新生鎖同士の対合によるHolliday構造の形成と解離 (B'-2)といったケースが考えられている。two-strand DNA傷害の特徴は、いずれもDNA合成の鋳型としての塩基配列情報を失っている点にある。一方、one-strand DNA傷害の場合は塩基情報の変化や欠落を伴うことなく同じDNA分子内だけで回避を完結することが可能である。

ク・ギャップの両側からやって来た複製フォークが共に崩壊した場合にも、Double strand breakの発生が引き起こされる可能性が考えられる。また、二本鎖DNAを切断するII型のトポイソメラーゼがDNA上で機能している最中、何らかの原因によって反応が中断された場合にも、やはりDouble strand breakを発生する可能性がある。

以上に述べてきたtwo-strand DNA傷害の最大の特徴は、one-strand DNA傷害に分類される一般的なDNA損傷やニック・ギャップと異なり、DNA合成の鋳型としての塩基配列情報を失っている点にある。two-strand DNA傷害では同じDNA分子内だけで塩基配列情報の変化や欠落を伴うことなく回避を完結することは容易ではない。従って、これらの傷害では主に相同組換え機構により、失われた塩基配列情報を姉妹染色分体や相同染色体等といったドナー配列（塩基配列情報を供与する配列）から補完する必要がある。相同組換え機構はDaughter strand gap、Double strand end、Double strand breakのいずれをも回避するポテンシャルを持つと考えられている。一方で、これらの傷害の一部は、相同組換え以外の機構、すなわち複製後修復機構やNHEJ（Non homologous end joining）機構の基質と共通であることが知られている。従って、これらの機構はそれぞれ相同組換え機構と相互に補完して作用している可能性が考えられる。

以下I-3-2～I-3-4に、two-strand DNA傷害の回避に関与する3つの機構の概要について、出芽酵母での情報を中心にまとめてみた。

I-3-2 相同組換え機構

出芽酵母では以前から相同組換えに関する遺伝学的、ならびに生化学的研究が盛んに行われてきた。その結果、相同組換えの基本的な機構は酵母からヒトまで共通に存在し、体細胞分裂時の相同組換えには複数の経路が存在することが判明している（Paques and Haber 1999；Sung et al. 2000）。図I-5のAとBに相同組換え機構の各経路のモデルを示した。経路によって要求される遺伝子は異なるが、これらの遺伝子は全てRAD52 遺伝子を頂点としたエピスタシス遺伝子群に属している。この遺伝子群に属する遺伝子は、その欠損株が放射線照射に感受性を示すことを指標に同定された（Game and Mortimer 1974）。

複数ある相同組換え経路のうち、最も多くの種類のDNA傷害の回避に対応できるのは鎖交換反応による経路であろう（図I-5 A）。この経路ではDaughter strand gap、Double strand break、Double strand endのいずれをも回避することが可能である。相同組換え反応の本質は、単鎖DNA部位へRad51pが結合し、このDNA-蛋白複合体によって相同性検索および鎖交換反応が行われることである。Double strand breakやDouble strand endがこの経路で回避される場合には、初期の段階でMre11p/Rad50p/Xrs2p

(MRX) 複合体がそのヌクレアーゼ活性によって5' → 3' プロセッシングを行い、3'突出末端を形成する。この様にして形成された末端やDaughter strand gapにおける単鎖DNA部位は二次構造の形成やヌクレアーゼ等の侵食を受ける可能性があるため、通常は単鎖DNA結合蛋白であるRPAによって保護されるが、このRPAの存在はRad51pが単鎖DNAへ結合するのを阻害してしまう。そこで、まずRad52pが単鎖DNAとRPA複合体に結合し、次いでRad52pによりRad51pが単鎖DNA上に導入されると考えられている。この様にして導入されたRad51pは、単鎖DNAの塩基配列情報をもとに相同領域の検索を行い、Dループの形成によるドナー配列への侵入、それに続く鎖交換反応を開始する。鎖交換反応はX字状の組換え中間体；Holliday構造の移動によって進行し、それに伴ってヘテロ二本鎖領域が拡大する。鎖交換反応は、Holliday構造がリゾルベースによって解離した時点で終了する。Daughter strand gapとDouble strand breakが反応の基質である際には二つのHolliday構造が形成され得るが、Holliday構造の解離の仕方によって組換え産物が非交叉型（遺伝子変換型）と交叉型のいずれになるかが決定する。Double strand endが反応の基質であった場合には一つのHolliday構造が形成され、それが解離するとY字型の構造が形成される。この構造はDNAの複製中間体に特徴的なものであるが、I-3-1で述べた様にそもそもDouble strand endはDNA複製の最中に生じ得るものなので、鎖交換反応はDNA複製フォークの再構築を補助する機構として働いていると考えられている。また、前述のMRX複合体のメンバー；Rad50pに関しては、DNA末端のプロセッシングに関与するだけでなく、SMCファミリーに属する蛋白と良く似た構造を持つことが近年の研究より明らかとなっている。このファミリーにはコンデンシンや姉妹染色分体接着因子コヒーシン等、染色体高次構造の制御に関わる蛋白が含まれていることから、Rad50pもこれらと類似した機能を担っている可能性が考えられる。

この他、鎖交換反応の亜種的な存在としてBIR (Break induced replication) が知られている。この経路では、相同領域への単鎖DNAの侵入までは鎖交換反応と同じ様式をとるが、その先はHolliday構造の移動と解消ではなく、Dループ中で開始されたDNA合成がそのまま染色体末端部まで行われることにより、失われた配列を回復する。この経路はRAD51 遺伝子に依存的なものと非依存的なもの二種類に分類されることが最近判明したが (Malkoba et al. 1996 ; Le et al. 1999 ; Signon et al. 2001) 、後者において相同領域の検索やDループの形成がRad51pに依存せず行われるメカニズムについてはあまりよく分かっていない。BIRによる回避が行われた場合には、非相互型の交叉を生じる。

また、この他にSSA (Single strand annealing ; 単鎖対合) と呼ばれる相同組換え経路が知られている (図I-5 B) 。この経路は鎖交換反応とは異なり、ドナー配列を必要としないのが特徴である。単鎖DNA部位に相同配列が存在する場合、主としてRad52pがそれらをアニーリングさせることによってDNA末端同士が繋ぎ合わされる

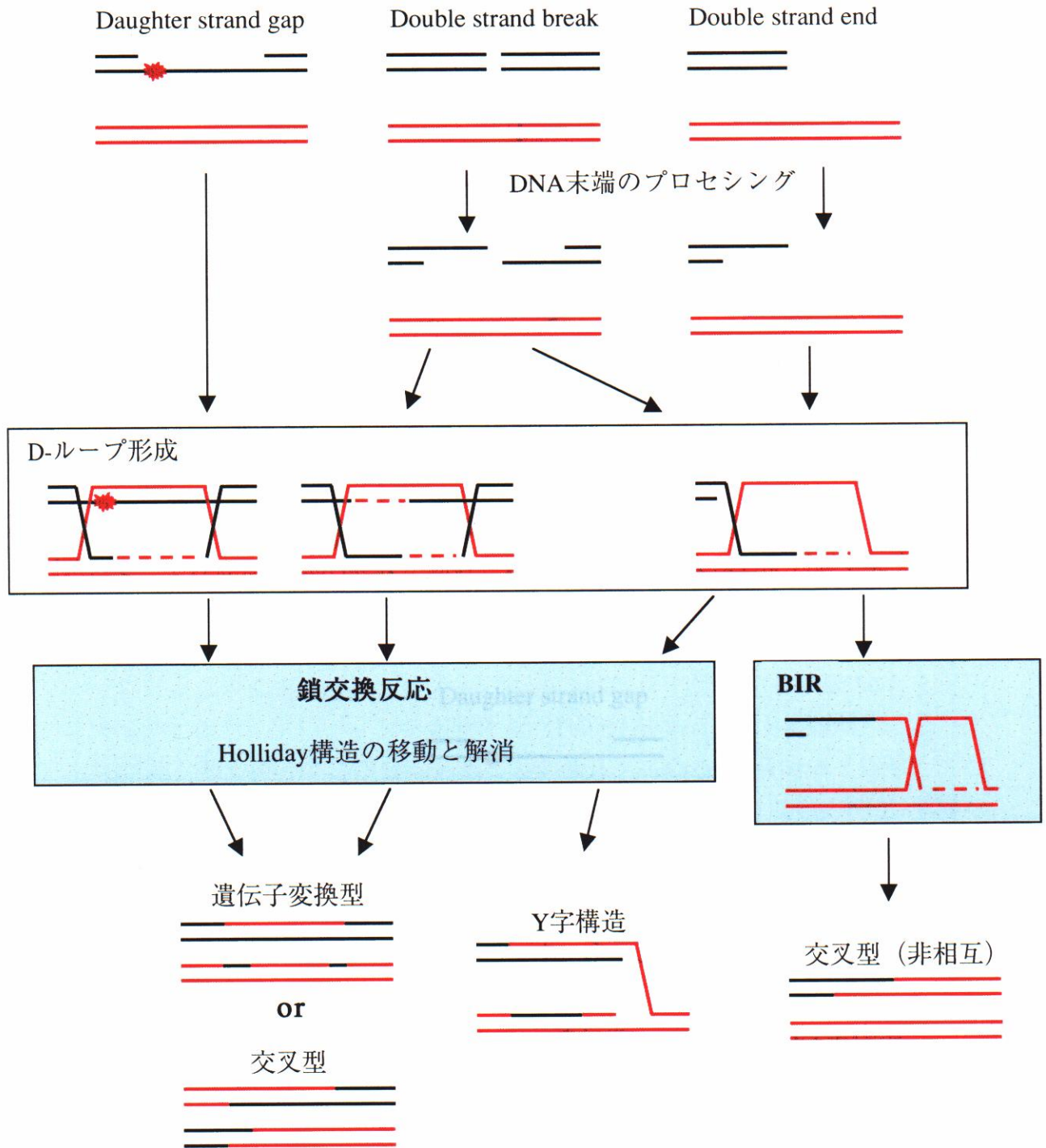
と考えられている。Rad52pはRad51pの単鎖DNA部位への誘導のみならず、それ自身に相同的な単鎖DNA同士をアニーリングする活性があることが知られている (Mortensen et al. 1996)。その機構上、SSA経路によってDouble strand breakが回避された場合には、SSAに用いられる繰り返し配列間で欠失が生じる場合が多い。

I-3-3 複製後修復機構

複製後修復機構は、損傷等によりDNA複製が阻害された結果形成される単鎖DNAのギャップ (Daughter strand gap) を、損傷を除去することなく二本鎖DNAに変換する。出芽酵母の複製後修復機構はRAD6-RAD18 遺伝子に依存しており、これらの遺伝子を頂点としたエピスタシス遺伝子群が様々な形でこの機構に関与している。

複製後修復機構は単一の経路ではなく、RAD6-RAD18 遺伝子の下流にRAD5、RAD30、REV3遺伝子がそれぞれ関与する複数の経路が存在していると考えられており (図I-6)、これらの遺伝子を欠損した株はいずれもUV照射に感受性を示すことが知られている。しかし、UV照射誘発性の突然変異の発生に関してはそれぞれ異なった挙動を示す。rev3 欠損株では自然突然変異やUV照射により誘発される突然変異が減少する (Lemontt 1971) が、rad30 欠損株ではUV照射誘発性の突然変異が上昇する (Johnson et al. 1999a)。rad5 欠損株では自然突然変異が上昇する他、UV照射誘発性の突然変異に関しては影響を受けないことが判明している (Johnson et al. 1992)。これらの知見より、UV照射により生じるDNA損傷や傷害の回避に際し、REV3 遺伝子はエラーを生じるタイプの経路、RAD30 およびRAD5 遺伝子はエラーフリーなタイプの経路として機能すると考えられている。REV3 遺伝子は損傷乗り越え型DNAポリメラーゼであるpol ζ の触媒サブユニットをコードし (Morrison et al. 1989)、RAD30 遺伝子はやはり損傷乗り越え型DNAポリメラーゼであるpol η をコードしている (Johnson et al. 1999a)。これらのDNAポリメラーゼは通常複製に用いられるポリメラーゼと異なり、*in vitro* DNA合成系において損傷が存在する鋳型DNA上で効率的にDNA合成を行うことが知られている (Nelson et al. 1996; Johnson et al. 1999b)。RAD5 遺伝子産物は、RAD6およびRAD18 遺伝子産物と同じくユビキチン結合を介した蛋白質分解に関与していることが判明しているが (Hoegge et al. 2002; Pickart 2002) この遺伝子産物がどのようなメカニズムでDNA傷害の回避に寄与しているのかは現在の所明らかになっていない。以上に述べてきたエラーフリーな経路やエラーを生じる経路という分類は、あくまでUV照射等により生じるDNA損傷や傷害に対しての評価であり、通常細胞活動におけるこれらの遺伝子産物の役割は余り良く分かっていない。

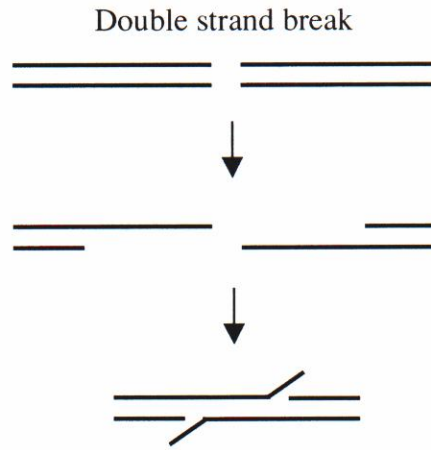
RAD6 およびRAD18 遺伝子産物がどのような分子機構でこれらの経路を制御しているのかは不明な点が多いが、これらの遺伝子はそれぞれユビキチン共役酵素E2



図I-5A 相同組換え機構の各経路；鎖交換反応と BIR

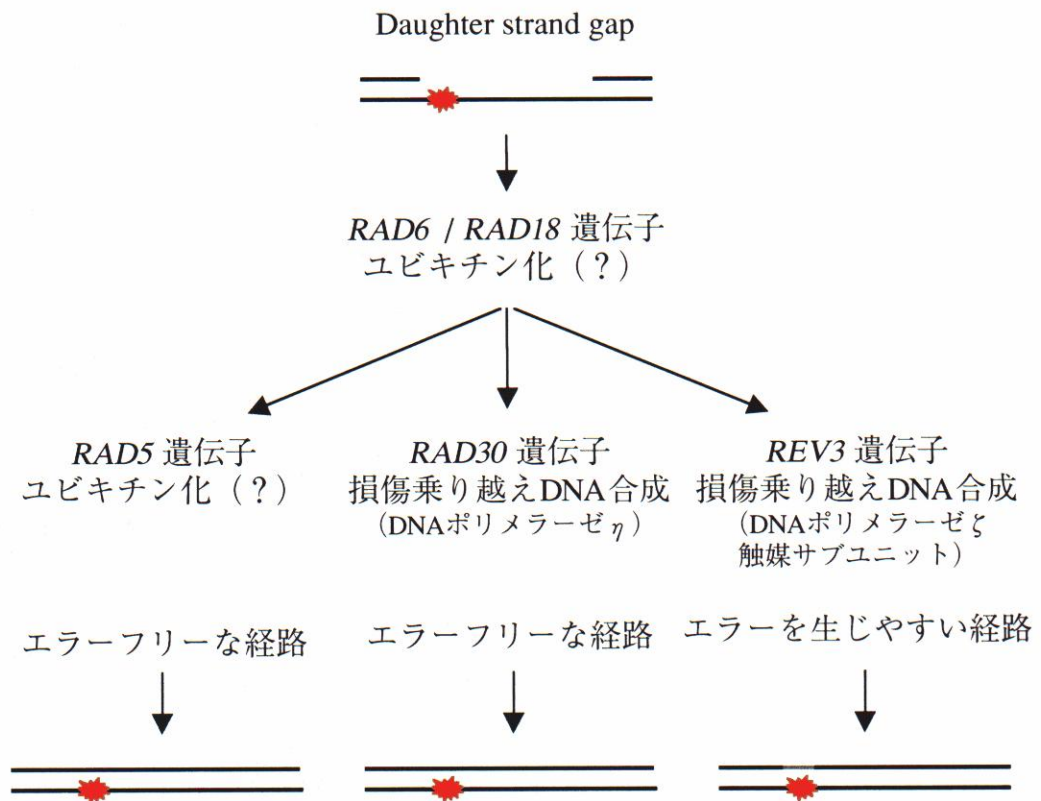
二本鎖DNAを二本の実線で示した。two-strand DNA損傷が発生したDNA分子を黒色で、それらに相同なDNA分子（姉妹染色分体や相同染色体、異所性の相同配列）を赤色で示した。

鎖交換反応は3種類のtwo-strand DNA傷害のいずれも回避する能力を持つ。BIRも鎖交換反応の一種として知られているが、Holliday構造の移動と解消ではなく、D-ループ中で開始されたDNA合成がそのまま染色体末端部まで行われることにより、失われた配列を回復する。



図I-5B 相同組換え機構の各経路； SSA

二本鎖DNAを二本の実線で示した。
 単鎖DNA部位に相同性が存在する場合、DNA末端同士がアニーリングされる。この経路によってDouble strand breakが回避される場合には、繰返し配列間で欠失を生じる。



図I-6 複製後修復機構の各経路

複製後修復機構はRAD6/RAD18 遺伝子に依存する。この機構は単純な一反応ではなく、RAD5、RAD30、REV3などいくつかの遺伝子がそれぞれ関与する複数の経路が存在している。RAD5やRAD30 遺伝子がそれぞれ関与する経路はエラーフリー、REV3 遺伝子が関与する経路はエラーを生じやすい経路と考えられている。

(Rad6p) とユビキチン付加酵素E3 (Rad18p) をコードしており、複合体を形成して損傷が存在する単鎖DNAに結合し、ユビキチン結合を介した蛋白質分解に関与していると考えられている。近年、この複合体がDNAポリメラーゼのスライディングクランプであるPCNAにユビキチン一分子を連結し、さらにその後のポリユビキチン化にRad5pが関与することが報告されている (Hoegge et al. 2002)。Hoeggeらは、DNA上の損傷で複製フォーク装置が停止した状態から複製後修復機構による回避への移行や回避経路の選択に、Rad6p-Rad18p複合体やRad5pによるPCNAのユビキチン化が何らかの形で関与しているのではないかと考察している。

I-3-4 NHEJ (Non-homologous end joining) 機構

NHEJ機構は主にDouble strand breakの回避に利用されるが、その様式は鎖交換反応やSSAとは全く異なる。この経路では、*HDF1* および*HDF2* 遺伝子にそれぞれコードされたKu70pとKu80pが複合体を形成してDNA末端に結合し、末端同士の離散やヌクレアーゼ等による侵食を防ぐ。その後、この複合体はライゲースであるDnl4pを呼び込み、末端同士のライゲーションを促進する (Critchlow and Jackson 1998)。この反応にもMRX複合体が関与する場合があることが知られているが (Haber 1998)、相同組換えの場合と異なり広範囲に渡るssDNA部位の形成は行われぬ。NHEJ機構におけるMRX複合体の役割はあまりよく分かっていないが、DNA末端に何らかの処理を施すことによりライゲーション反応に寄与しているのではないかと考えられている。NHEJはいくつかの種類に分類され (simple religation、small insertion、small deletion)、修復の行われる時期 (細胞周期) や要求される因子も微妙に異なることが知られている (Moore and Haber 1996)。

I-4 本研究の概要

本研究では、第一の目標として染色体異常・再編の発生における相同組換え機構の役割を明確にするため、相同組換え関連遺伝子である*RAD52*、*RAD51* および*RAD50* 遺伝子を欠損した株に生じるLOHを詳細に解析した。I-3-2でも述べた様に、*RAD52* 遺伝子は鎖交換反応やSSAといった相同組換え経路全般に、*RAD51* 遺伝子は鎖交換反応に要求される。また、*RAD50* 遺伝子は主に組換え初期過程のDNA末端のプロセッシングに関与している。それぞれの欠損株では、失われている相同組換え経路や反応が異なるため、それに対応して三つの欠損株間で生じる染色体異常・再編の解析結果に違いが表れることが予想される。これらの欠損株に生じるLOHイベン

トの種類、発生頻度、割合を求めて野生株と比較することにより、染色体異常・再編の発生に関与する組換え経路とその寄与度を推測することができると考えた。また、相同組換えを欠損した株で上昇するLOHイベントや異常染色体の融合部を同定することにより、自然DNA傷害が相同組換えを欠損した状況下で受けるプロセスについて明らかになることが期待された。

また、第二の目標として複製後修復機構やNHEJ機構の役割を明らかにするために、これらの機構に関連する遺伝子を欠損した株でLOH解析を行った。I-3でも述べた様に、これらの機構の基質は相同組換え機構と部分的に共通であることが知られており、それぞれ相同組換え機構と相互に補完している可能性が考えられる。複製後修復機構やNHEJ機構に関して、関連する遺伝子の単独欠損株や*RAD52* 遺伝子との二重欠損株で生じるLOHを解析・比較することで、LOHの発生や抑制におけるこれらの機構の寄与度や、相同組換え機構との相互関係を明らかにできるのではないかと考えた。

以上の様々な欠損株におけるLOH解析結果を比較検討することで、本稿IVでは出芽酵母の細胞内に自然発生するDNA傷害の種類や量、それらの回避経路の相互関係について考察し、ゲノム安定性がどのようなメカニズムによって維持されているかを検証する。

II 材料と方法

II-1 培地

出芽酵母の培養に用いる培地については、*Methods in Yeast Genetics* (Rose et al. 1990) の記載に従った。出芽酵母の一般的な培養にはYPD培地 (1% Bacto yeast extract, 2% Bacto pepton, 2% Glucose) を用い、必要に応じて特定のアミノ酸や核酸を含まない完全合成培地 (0.67% Bacto yeast nitrogen base without amino acids, 0.2% Drop out mix, 2% Glucose) (以下SC-drop out培地; 例えばウラシルを含まないDrop out mixを用いた場合にはSC-Ura培地と表記する) や α -AA培地 (0.16% Bacto yeast nitrogen base without amino acids, 2% Glucose, 0.2% α -AA) を用いた。YPD培地、SC-drop out培地、 α -AA培地共に、寒天培地として使用する際にはBacto agarを2%の濃度で加えた。SC-drop out寒天培地を作製する際には、オートクレーブ滅菌する前に5N NaOHを用いてpH 7.0に調節した。 α -AA培地には、トリプトファンとリジンをそれぞれ終濃度20 μ g/mlと30 μ g/mlになるように加えた。 α -AAは2.5%となるように滅菌水に溶解し、5N KOHを用いてpH 7.0に調節したものを使用した。*URA3* 遺伝子マーカーを失ってUra^rの表現型を獲得したクローンの選択、および、*URA3* 遺伝子マーカーLOH頻度の測定には5-フルオロオロチン酸 (以下5-FOA) を含有する寒天培地 (0.67% Bacto yeast nitrogen base without amino acids, 0.2% uracil drop out mix, 50 μ g/ml Uracil, 0.1% 5-FOA, 2% glucose, 2% Bacto agar) を使用した。ロイシンを含まない5-FOA培地 (以下5-FOA-Leu培地) を作製する際にはDrop out mixにウラシルとロイシンを含まないものを、ロイシンとアデニンを含まない5-FOA培地 (以下5-FOA-Leu-Ade培地) を作製する際にはDrop out mixにウラシルとロイシンを含まないものを用いた。5-FOAを含む寒天培地を作製する場合、寒天以外の試薬を1/2容量の水に溶解したものを0.22 μ mのメンブレンフィルター (CORNING社) で濾過滅菌し、オートクレーブ滅菌した1/2容量の4%寒天液と混合した。LOHの発生頻度を測定する際には、ウラシルを終濃度20 μ g/ml、アデニンを終濃度20 μ g/mlになるように加えた。トリプトファンとウラシルは2 mg/ml、アデニンは5 mg/mlとなるように滅菌水に溶解し、0.22 μ mのメンブレンフィルター (CORNING社) で濾過滅菌したものを使用した。必要に応じて、YPD培地にはメチルメタンスルホン酸 (以下MMS) を0.01%、もしくはGeneticin (以下G418, GIBCO BRL社) を500 μ g/mlとなるように加えた。G418は80mg/mlとなるように滅菌水に溶解し、0.22 μ mのメンブレンフィルター (CORNING社) で濾過滅菌したものを使用した。

大腸菌の培養に用いる培地については*Molecular Cloning* (Sambrook et al. 1989) の記載に従った。大腸菌の一般的な培養にはLB培地 (1% Bacto trypton, 0.5% Bacto

yeast extract, 0.5% NaCl) を用い、必要に応じてアンピシリンを終濃度100 μ g/mlとなるように加えた。LB培地を寒天培地として用いる場合にはBacto agarを1.5%の濃度で加えた。エレクトロポレーション後の大腸菌の培養にはSOC培地 (2% Bacto trypton, 0.5% Bacto yeast extract, 0.05% NaCl, 0.25 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM Glucose) を用いた。

II-2 一般的な遺伝学的手法とDNA操作

酵母の一般的な遺伝学的手法は*Methods in Yeast Genetics* (Rose et al. 1990) に、大腸菌の一般的な遺伝学的手法は*Molecular Cloning* (Sambrook et al. 1989 ; Sambrook and Russell 2001) の記載に従った。特に記述のない限り、出芽酵母の培養は30°Cで、大腸菌の培養は37°Cで行った。一般的なDNA操作に関しては*Molecular Cloning* (Sambrook et al. 1989 ; Sambrook and Russell 2001) に従った。プラスミド保有大腸菌からのプラスミドの調整は、アルカリSDS法 (Sambrook et al. 1989) を用いるか、またはQIAGENカラム (QIAGEN社) を製造元の指示に従って使用した。出芽酵母からのゲノムDNAの調整はGenとるくん (酵母・グラム陽性菌用、TAKARA社) を用い、製造元の指示に従って使用した。パルスフィールドゲル電気泳動に用いるアガロースプラグからのゲノムDNAの調製、および、ゲルから切り出したDNAの調製はQIA Quick Gel Extraction Kit (QIAGEN社) を用い、製造元の指示に従って使用した。PCR産物の精製にはQIA Quick PCR Purification Kit (QIAGEN社) を用い、製造元の指示に従って使用した。

II-3 形質転換法

出芽酵母へのプラスミドDNA、および、DNAフラグメントの形質転換には、酢酸リチウム法 (Gietz et al. 1992 ; <http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/biochem/gietzTrafo.html>) を利用した。

大腸菌へのプラスミドDNAの形質転換には、塩化カルシウム法 (Sambrook et al. 1989 ; Sambrook and Russell 2001) もしくはGene Pulser (Bio-Rad社) を用いたエレクトロポレーション法 (Sambrook et al. 1989 ; Sambrook and Russell 2001) を利用した。

II-4 プラスミドDNA

pNKY83 (Alani et al. 1989) は、pBR322の*Pvu* II-*Eco*R I部位に*RAD50* 遺伝子破壊断片が挿入されているプラスミドである。*RAD50* 遺伝子破壊断片は、*hisG-URA3-hisG* カセット3.8 kb (Alani et al. 1987) の前後に、*RAD50* 遺伝子ORF開始点より上流の領域1.8 kb、終止点より下流の領域0.8 kbがそれぞれ連結された6.4 kbの断片である。この断片はpNKY83を*Eco*R I、*Bgl* IIで切断することで得られ、*RAD50* 遺伝子の破壊に用いた。

p Δ RAD51 (Shinohara et al. 1992) は、pBluescript II KS+の*Bam*HI部位に*RAD51* 遺伝子破壊断片が挿入されているプラスミドである。*RAD51* 遺伝子破壊断片は、*hisG-URA3-hisG* カセットの前後に、*RAD51* 遺伝子ORF開始点上流領域0.6 kb、下流領域1.9 kbがそれぞれ連結された6.4 kbの断片である。この断片はp Δ RAD51を*Bam*HIで切断することで得られ、*RAD51* 遺伝子の破壊に用いた。

pHT19は、pBR322の*Eco*R I-*Sal* I部位に*RAD52* 遺伝子破壊断片が挿入されているプラスミドである (Ogawa et al. 1993)。*RAD52* 遺伝子破壊断片は、*hisG-URA3-hisG* カセットの前後に*RAD52* 遺伝子ORF上流領域1.2 kb (ORF 5' 領域0.3 kbを含む)、下流領域1.4 kb (ORF 3' 領域0.5 kbを含む) がそれぞれ連結された6.4 kbの断片である。この断片はpHT19を*Eco*RI、*Sal*Iで切断することで得られ、*RAD52* 遺伝子の破壊に用いた。

pNKY83、p Δ RAD51、pHT19は国立遺伝学研究所細胞遺伝部門の小川智子博士より分与を受けた。

pMH116は、pUC19の*Xma* I-*Xba* I部位に出芽酵母の第III染色体205 kb付近の領域926 kbをクローニングし、クローニングされた領域のほぼ中央部分に位置する*Bss*H II部位にpRS416由来の*URA3* 遺伝子マーカーが挿入されているプラスミドである。pMH116は当研究室平岡により分与を受けた (平岡、1996年度修士論文)。pMH116を*Sma* I-*Xba* Iで切断することにより出芽酵母第III染色体の205 kb領域に相同な配列を前後に約460 bpずつ持つ*URA3* 遺伝子マーカー断片が得られる。この断片は第III染色体205 kb領域への*URA3* 遺伝子マーカーの挿入に用いた。

pRS316は、pBluescript由来の大腸菌のレプリコン、アンピシリン耐性遺伝子および出芽酵母の自律複製配列、セントロメア、*URA3* 遺伝子を持つ大腸菌と出芽酵母のシャトルベクタープラスミドである。

pRS317はpRS316の*URA3* 遺伝子マーカーの代わりに*LYS2* 遺伝子マーカーを持つプラスミドである。

ScRAD52pRS316は、pRS316の*Eco*R I-*Xho* I部位に、プラスミドYpSL1 (Adzuma et al. 1984) 由来の*RAD52* 遺伝子を含む*Eco*RI - *Sal*II断片3.2 kbが挿入されているプラス

ミドであり、大阪大学理学部の篠原彰博士より分与を受けた。

pMO317は、pRS317の *Bsa* I-*Eag* I部位に、ScRAD52pRS316由来の *RAD52* 遺伝子を含む4.6 kbの *Bsa* I-*Eag* I断片が挿入されたプラスミドであり、本研究において作製した。pMO317は、*rad52* 欠損株における *RAD52* 遺伝子機能の相補に用いた。

pU6H2MYC (De Antoni and Gallwitz 2000) は大腸菌のレプリコン、アンピシリン耐性遺伝子を持つプラスミドで、6His-2MYC-loxP-*kanMX*-loxPカセットが挿入されている。オリゴマーを用いた遺伝子破壊断片の作製に用いた (図II-1 A)。pU6H2MYCは理研ゲノム科学総合研究センターの白髭克彦博士より分与を受けた。

II-5 菌株

本研究においてLOH解析に用いた出芽酵母の菌株は全て出芽酵母ゲノムプロジェクトに用いられたS228c株由来である。本研究で使用した菌株の遺伝子型や入手方法を表II-1に記載した。染色体上の位置に関しては出芽酵母のゲノムデータベース (SGD、<http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>) の塩基配列情報に従い、染色体番号と左腕テロメアからの距離 (kb) として表記した (例; III-205)。また、第III染色体の205 kb領域に挿入された *URA3* 遺伝子マーカーをIII-205::*URA3*、第III染色体の314 kb領域に挿入された *ADE2* 遺伝子マーカーをIII-314::*ADE2* と表記した。

LOH解析に用いる二倍体株は、第III染色体上に3つの遺伝子マーカー、*ADE2*、*LEU2*、*URA3* を持つ一倍体株 (*MATa* 株) と、それらを持たない一倍体株 (*MATα* 株) を接合させることにより構築する。野生株では、前者がYKU34、後者がYKU23に相当する。各遺伝子の破壊は *MATa* と *MATα* それぞれの一倍体株で行い、それらを接合することで二倍体の欠損株を構築した。

II-5-1 *rad52*、*rad51* および *rad50* 単独欠損株の作製

rad52、*rad51* および *rad50* 単独欠損株の作製は、*hisG-URA3-hisG* カセットによる遺伝子破壊法 (Alani et al. 1987) を用いてYIY1とYKU23の各遺伝子を破壊することにより行った。YIY1はIII-205に *URA3* 遺伝子マーカーがないこと以外は全てYKU34と同じ株である。*hisG-URA3-hisG* カセットを用いた遺伝子破壊法では *URA3* 遺伝子マーカーを使用する。そのため、既に *URA3* 遺伝子マーカーが第III染色体上に存在するYKU34ではこのカセットを用いた遺伝子破壊を行うことはできない。そこで、YIY1株で遺伝子破壊を行った後に *hisG* 配列間の *URA3* 遺伝子マーカーを失わせ、最

終段階で第III染色体上への*URA3* 遺伝子マーカーの挿入を改めて行う、という方法をとった（詳細は後述）。

遺伝子破壊断片が挿入されているプラスミド（pNKY83、p Δ RAD51、pHT19；本稿II-4を参照）をそれぞれ制限酵素で切断した後、その反応溶液を酢酸リチウム法によりYIY1とYKU23に導入した。遺伝子破壊断片は、*hisG-URA3-hisG*断片の前後にそれぞれ標的遺伝子ORFの上流と下流に相同な配列を持った断片である。細胞内に取り込まれた遺伝子破壊断片は、出芽酵母の細胞が本来持っている相同組換え活性によって染色体上の標的部位に導入される。導入によって表現型がUra⁺に形質転換したクローンは、SC-Ura培地で選択した。次に、このクローンをYPD液体培地で培養することにより、2コピーの*hisG* 配列間で欠失を生じるような相同組換えを促して*URA3* 遺伝子マーカーのpop out（切り出し）を行った（Alani et al. 1987）。*URA3* 遺伝子マーカーのpop outによって表現型がUra⁻となったクローンは5-FOA寒天培地上で選別した。このようにして得られたクローンでは、結果として標的遺伝子のORFが1コピーの*hisG* 配列に置換されることになり、*URA3* 遺伝子を繰り返しマーカーとして利用することができる。この*hisG-URA3-hisG* カセットを用いた方法によって作製したYKU23由来の*rad52* 欠損株、*rad51* 欠損株、*rad50* 欠損株をそれぞれYMO2、YMO6、YMO4とし、YIY1由来の*rad52* 欠損株、*rad51* 欠損株、*rad50* 欠損株をそれぞれYMO1、YMO5、YMO3と命名した（表II-1）。

標的遺伝子ORFの*hisG* 配列への置換、すなわち*RAD52*、*RAD51* および*RAD50* 遺伝子破壊の確認については、PCR法による標的遺伝子アレルの構造解析とアルキル化剤であるMMSに対する感受性の検定によって行った。PCRに用いるプライマーは*hisG* 配列内と標的部位の外側に設定し、標的遺伝子ORFが*hisG* 配列に置換された場合のみPCR産物が得られることを遺伝子破壊の指標とした。使用したプライマーのリストを表II-2に示した。MMSは細胞に放射線を照射した場合とよく似た効果をもたらすことから、放射線照射時に誘発されるようなDNA傷害を直接、もしくは間接的に発生させると考えられており、*rad52*、*rad51*、*rad50* 欠損株は放射線照射と同様にMMSに感受性を示すことが知られている。本研究では、作製した欠損株を0.01% MMSを含むYPD寒天培地（本稿II-1を参照）にスポットし、これに感受性を示すことを遺伝子破壊の指標とした（本稿III-1-1を参照）。

さらに、YIY由来であるYMO1、YMO5、YMO3について第III染色体205 kb領域への*URA3* 遺伝子マーカーの挿入を行った。この操作はYKU34を作製する際にとられた手法と同じものを利用した（Hiraoka et al. 2000；平岡 2000年度博士論文）。具体的には、標的部位、すなわち第III染色体205 kb領域と相同な配列を両端に持つ*URA3* 遺伝子マーカー断片が挿入されているプラスミド、pMH116（本稿II-4を参照）を*Sma* I-*Xba* Iで切断し、その反応溶液を酢酸リチウム法によりYMO1、YMO5、YMO3に導入した。*rad50* 欠損株であるYMO3、*rad51* 欠損株であるYMO5に関してはUra⁺に形質転

表II-1 菌株リスト

菌株	遺伝子型	入手方法
一倍体		
YKU1	<i>MATa lys2Δ202 leu2Δ1 ura3-52 trp1Δ63</i>	梅津桂子助手より分与
YKU23	<i>MATα lys2Δ202 leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 ade2Δ::hisG</i>	梅津桂子助手より分与
YKU34	<i>LEU2 ade2Δ::hisG III-205::URA3¹⁾ III-314::ADE2²⁾</i> であること以外はYKU1と同じ	梅津桂子助手より分与
YIY1	<i>LEU2 ade2Δ::hisG III-314::ADE2</i> であること以外はYKU1と同じ	与那嶺育子氏より分与
YMO1	<i>rad52Δ::hisG</i> であること以外はYIY1と同じ	本研究
YMO2	<i>rad52Δ::hisG</i> であること以外はYKU23と同じ	本研究
YMO3	<i>rad50Δ::hisG</i> であること以外はYIY1と同じ	本研究
YMO4	<i>rad50Δ::hisG</i> であること以外はYKU23と同じ	本研究
YMO5	<i>rad51Δ::hisG</i> であること以外はYIY1と同じ	本研究
YMO6	<i>rad51Δ::hisG</i> であること以外はYKU23と同じ	本研究
YMO7	<i>rad50Δ::hisG</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究
YMO8	<i>rad51Δ::hisG</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究
YMO9	<i>rad52Δ::hisG</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究
YMO12	<i>rad18Δ::kanMX</i> であること以外はYKU23と同じ	本研究
YMO13	<i>rad18Δ::kanMX</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究
YMO14	<i>hdf1Δ::kanMX³⁾</i> であること以外はYKU23と同じ	本研究
YMO15	<i>hdf1Δ::kanMX³⁾</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究
YMO20	<i>rad18Δ::kanMX rad52Δ::hisG</i> であること以外はYKU23と同じ	本研究
YMO21	<i>rad18Δ::kanMX rad52Δ::hisG</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究
YMO22	<i>hdf1Δ::kanMX³⁾ rad52Δ::hisG</i> であること以外はYKU23と同じ	本研究
YMO23	<i>hdf1Δ::kanMX³⁾ rad52Δ::hisG</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究
YMO42	<i>rad5Δ::kanMX rad52Δ::hisG</i> であること以外はYKU23と同じ	本研究
YMO43	<i>rad5Δ::kanMX rad52Δ::hisG</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究
YMO44	<i>rad30Δ::kanMX rad52Δ::hisG</i> であること以外はYKU23と同じ	本研究
YMO45	<i>rad30Δ::kanMX rad52Δ::hisG</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究
YMO46	<i>rev3Δ::kanMX rad52Δ::hisG</i> であること以外はYKU23と同じ	本研究
YMO47	<i>rev3Δ::kanMX rad52Δ::hisG</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究
YMO50	<i>rad51Δ::kanMX rad52Δ::hisG</i> であること以外はYKU23と同じ	本研究
YMO51	<i>rad51Δ::kanMX rad52Δ::hisG</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究
YMO52	<i>rad50Δ::kanMX rad52Δ::hisG</i> であること以外はYKU23と同じ	本研究
YMO53	<i>rad50Δ::kanMX rad52Δ::hisG</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究
YMO54	<i>rad5Δ::kanMX</i> であること以外はYKU23と同じ	本研究
YMO55	<i>rad5Δ::kanMX</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究
YMO56	<i>rad30Δ::kanMX</i> であること以外はYKU23と同じ	本研究
YMO57	<i>rad30Δ::kanMX</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究
YMO58	<i>rev3Δ::kanMX</i> であること以外はYKU23と同じ	本研究
YMO59	<i>rev3Δ::kanMX</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究
#870	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 hdf1Δ::kanMX³⁾</i>	白髭克彦博士より分与

二倍体

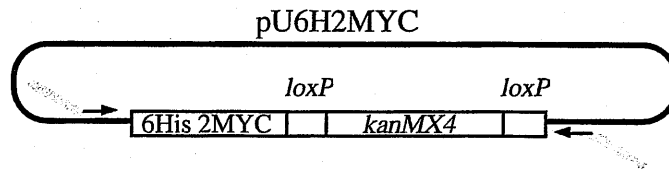
RD301	<i>MATa/MATα lys2Δ202/lys2Δ202 LEU2/leu2Δ1 ura3-52/ura3-52 trp1Δ63/TRP1 HIS3/his3Δ200 ade2Δ::hisG/ade2Δ::hisG III-205::URA3/III-205 III-314::ADE2/III-314</i>	YKU23 x YKU34
RD304	<i>rad52Δ::hisG/rad52Δ::hisG</i> であること以外はRD301と同じ	YMO2 x YMO9
RD305	<i>rad51Δ::hisG/rad51Δ::hisG</i> であること以外はRD301と同じ	YMO4 x YMO7
RD306	<i>rad50Δ::hisG/rad50Δ::hisG</i> であること以外はRD301と同じ	YMO6 x YMO8
RD308	<i>rad52Δ::hisG/rad52Δ::hisG rad51Δ::kanMX/rad51Δ::kanMX</i> であること以外はRD301と同じ	YMO50 x YMO51
RD309	<i>rad52Δ::hisG/rad52Δ::hisG rad50Δ::kanMX/rad50Δ::kanMX</i> であること以外はRD301と同じ	YMO52 x YMO53
RD310	<i>hdf1Δ::kanMX³/hdf1Δ::kanMX³</i> であること以外はRD301と同じ	YMO14 x YMO15
RD311	<i>rad18Δ::kanMX/rad18Δ::kanMX</i> であること以外はRD301と同じ	YMO12 x YMO13
RD312	<i>rad5Δ::kanMX/rad5Δ::kanMX</i> であること以外はRD301と同じ	YMO54 x YMO55
RD313	<i>rad30Δ::kanMX/rad30Δ::kanMX</i> であること以外はRD301と同じ	YMO56 x YMO57
RD314	<i>rev3Δ::kanMX/rev3Δ::kanMX</i> であること以外はRD301と同じ	YMO58 x YMO59
RD316	<i>rad52Δ::hisG/rad52Δ::hisG hdf1Δ::kanMX³/hdf1Δ::kanMX³</i> であること以外はRD301と同じ	YMO22 x YMO23
RD317	<i>rad52Δ::hisG/rad52Δ::hisG rad18Δ::kanMX/rad18Δ::kanMX</i> であること以外はRD301と同じ	YMO20 x YMO21
RD318	<i>rad52Δ::hisG/rad52Δ::hisG rad5Δ::kanMX/rad5Δ::kanMX</i> であること以外はRD301と同じ	YMO42 x YMO43
RD319	<i>rad52Δ::hisG/rad52Δ::hisG rad30Δ::kanMX/rad30Δ::kanMX</i> であること以外はRD301と同じ	YMO44 x YMO45
RD320	<i>rad52Δ::hisG/rad52Δ::hisG rev3Δ::kanMX/rev3Δ::kanMX</i> であること以外はRD301と同じ	YMO46 x YMO47

- 1) *III-205::URA3* は、第III染色体の左腕テロメアから205 kbの位置に *URA3* 遺伝子マーカー断片が挿入されていることを示している。
- 2) *III-314::ADE2* は、第III染色体の左腕テロメアから314 kbの位置に *ADE2* 遺伝子マーカー断片が挿入されていることを示している。
- 3) *hdf1* 欠損に用いた *kanMX* マーカーは、*Saccharomyces genome deletion project* において様々な遺伝子の破壊に用いられたものである（詳細は本稿II-5-5を参照）。その他の *kanMX* マーカーに関しては、pU6H2MYC (De Antoni and Gallwitz 2000) 由来の 6His-2MYC-loxP-KanMX-loxPカセットを使用した。

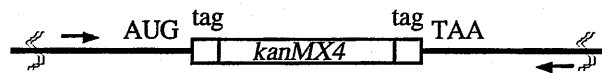
換したクローンが得られた。ところが、YMO1に関しては*rad52* 欠損による影響のため染色体上への線状DNA断片の挿入が難しく (Schiestl et al. 1994)、Ura⁺に形質転換したクローンを得ることはできなかった。そこで、この株については*URA3* 遺伝子マーカー断片の導入に際し、クローニングされた*RAD52* 遺伝子と*LYS2* 遺伝子マーカーを持つARS-CENプラスミドであるpMO317 (本稿II-4を参照) を同時に導入することによって、*RAD52* 遺伝子機能の相補を試みた。その結果、SC-Lys-Ura寒天培地にてLys⁺、Ura⁺に形質転換したクローンを得ることができた。このクローンをYPD液体培地という富栄養条件下で培養し、その間にpMO317を失い表現型がLys⁻になったクローンを α -AA寒天培地によって選択した。その際、YMO1はトリプトファン要求性 (*trp1* Δ 63, 表II-1) であることを考慮し、 α -AA寒天培地にトリプトファンを20 μ g/mlとなるように加えた。標的部位への*URA3* 遺伝子マーカーの挿入はPCR法によって確認した。この確認に用いるプライマーは*URA3* 遺伝子マーカー内と標的部位の外側に設定し、標的部位に*URA3* 遺伝子マーカーが挿入された場合にのみPCR産物が得られることを挿入の指標とした。使用したプライマーのリストを表II-2に示した。YMO3、YMO5、YMO1の第III染色体205 kb上へ*URA3* 遺伝子マーカーが挿入された株を、それぞれYMO7、YMO8、YMO9と命名した (表II-1)。YMO2とYMO9を接合させて構築される*rad52* 欠損二倍体株をRD304、YMO6とYMO8を接合させて構築される*rad51* 欠損二倍体株をRD305、YMO4とYMO7を接合させて構築される*rad50* 欠損二倍体株をRD306、とそれぞれ命名した (表II-1)。

II-5-2 *rad50 rad52* および*rad51 rad52* 二重欠損株の作製

rad50 rad52 および*rad51 rad52* 二重欠損株の作製に関しては、既に作製した*rad52* 欠損株であるYMO2とYMO9について、*RAD50* 遺伝子もしくは*RAD51* 遺伝子の破壊を追加するという手順をとった。この際用いた遺伝子破壊断片には、先に述べた*hisG-URA3-hisG*カセットは使用せず、6His-2MYC-loxP-*KanMX-loxP*カセットを使用した。*KanMX*マーカーが導入された細胞は抗生物質G418に耐性の表現型を示す。遺伝子破壊断片は、標的遺伝子ORFの上流または下流に相同な配列 (数十bp) を持つプライマー (表II-2) を用いてpU6H2MYCを鋳型としたPCRを行い、その産物を精製することによって得た (図II-1 A, De Antoni and Gallwitz 2000)。結果として得られる遺伝子破壊断片は、*kanMX*マーカーの前後にそれぞれ標的遺伝子ORFの上流と下流に相同な配列を持つことになる。II-5-1でも述べた様に、*rad52* 欠損株であるYMO2とYMO9では線状DNA断片を染色体上に挿入することは難しいため、まずpMO317を形質転換して*RAD52* 遺伝子機能を相補した後、改めて*RAD50* 遺伝子もしくは*RAD51* 遺伝子破壊断片を形質転換する手法をとった。形質転換によってG418耐性の表現型を



A プラスミド pU6H2MYCを鋳型とした場合



B *hdf1* 欠損株ゲノムDNAを鋳型とした場合 (*HDF1* 遺伝子破壊)

図II-1 PCR法を用いた遺伝子破壊断片の作製

PCRの鋳型となるプラスミド又はゲノムDNAを実線で記した。また、プライマーを矢印で表記し、プライマーに標的遺伝子ORFに相同な配列が連結されている場合には、その配列を灰色で示した。

遺伝子破壊断片は、標的遺伝子ORFの上流と下流にそれぞれ相同な配列を両端に持つ断片である。この断片は様々な方法で作製することが可能であるが、ここでは特にPCR法を用いた作製方法について示した。Aはプラスミド pU6H2MYCを鋳型とした場合で、標的遺伝子ORFの上流または下流に相同な配列 (数十bp) を持つプライマーを用いて6His-2MYC-loxP-KanMX-loxPカセットを増幅する。Bは *Saccharomyces genome deletion project* で作製された *hdf1* 欠損株 (#870) より抽出したゲノムDNAを鋳型とし、*hdf1* $\Delta::kanMX$ 部位を周辺領域を含む形で増幅する。この場合、*HDF1* 遺伝子ORFの上流または下流に相同な配列の長さは共に約1 kbとなる。

表II-2 プライマーリスト

プライマー名	使用目的	配列 (5'→3')
dRAD51pU6HF	<i>RAD51</i> 遺伝子破壊断片 ¹⁾ の作製	CCATATACTAGTAGTTGAGTGTAGCGACA AAGAGCAGACGTAGTTATTTGTTAAAGGC CTACTAATTTGTTATCGTCATtcccaccaccatc atcatcac ³⁾
dRAD51pU6HR	<i>RAD51</i> 遺伝子破壊断片 ¹⁾ の作製	GTACGGAACGCAACCTAAGAAAAAGAGG AGAATTGAAAGTAAACCTGTGTAAATAAA TAGAGACAAGAGACCAAATACactatagggaga ccggcagatc
dRAD50pU6HF	<i>RAD50</i> 遺伝子破壊断片 ²⁾ の作製	CTTTAAATGGAAATCTTTAATTCTAAGAA GTGGTAGCAACCATTGAGAGGCCAAAAAC AAGGGAACGACGGAAAGCAGGCtcccaccacc atcatcatcac
dRAD50pU6HR	<i>RAD50</i> 遺伝子破壊断片 ²⁾ の作製	AAACTCGTCGACGAAGTATTTTCAGCACCT CTAATTAATCAATCAAAGTCTATCCCTTC GTAGATATTATGGGGTCTTTactatagggagacc ggcagatc
dRAD18pU6HF	<i>RAD18</i> 遺伝子破壊断片の作製	AAGTGAAAACTAAGTACCACTTGAGCAA TGCCACATTAGAAGAAAAACCATCCGCAA GTGAGCATCACAGCTACTAAGAAAAGGCC ATTTTTACTACTtcccaccaccatcatcatcac
dRAD18pU6HR	<i>RAD18</i> 遺伝子破壊断片の作製	TGTCATCTTTTATGCATTTATATTTTGCCC ATTTTTAAATAAATTATTAATTAACAAAT GTGCACAAGCTAACAAACAGGCCTGATTA CATATACACACCactatagggagaccggcagat
dRAD5pU6HF	<i>RAD5</i> 遺伝子破壊断片の作製	CACTTGAAAGTAAATTATCTACAAAGTTA CATTATCAAAGGCCTTAGAAACACACCT AAAGTCTTACAGTATCACAATtcccaccaccatc atcatcac
dRAD5pU6HR	<i>RAD5</i> 遺伝子破壊断片の作製	AAGTAGCTGAAGAATAATTAGTTCTTTTCG GGTTGAAAATAATAATAAATAAAGTCTTT ATATATGAGTATGTGGTAtgactatagggagaccg gcagatc

dRAD51pU6HF	RAD30 遺伝子破壊断片の作製	AAAAGTATAAACCACTTATTGTAGTCTTC TAGCGCAGGCCTGCTCATT TTTTGAACGGC TTTGATAAAACAAGACAAAGCtcccaccacca tcatcatcac
dRAD51pU6HR	RAD30 遺伝子破壊断片の作製	TCATTTAGAAATTTTGGAAAAGCAATATT ATCAGGACGTTTTAGTTGCTGAAGCCAT ATAATTGTCTATTTGGAATAGactatagggaga cggcagatc
dREV3pU6HF	REV3 遺伝子破壊断片の作製	TGTAATAGAAGCACAAAACAAGAGAAAG TATTTGAGTCAATACAAAAC TACAAGTT GTGGCGAAATAAAATGTTTGGAA tcccacca ccatcatcatcac
dREV3pU6HR	REV3 遺伝子破壊断片の作製	TTCTTTCTTGTATATAACAACGTTATACA TAGAAACAAATAACTACTCATCATT TTTGC GAGACATATCTGTGTCTAGA actatagggagac cggcagatc
d13W837-2	HDF1 遺伝子破壊断片の作製	TTCCAAGAAGTAATGGAAGGCATAGC
d13C841	HDF1 遺伝子破壊断片の作製	TCACCAGGTTGACAAAATGCTAATCG
d13RAD52F2	RAD52 遺伝子破壊の確認	GCCAGATTACAAGTTAGCACCATC
d13RAD52R2	RAD52 遺伝子破壊の確認	ATACGCTAGTTCCTGGTAGGCAG
d5RAD51R	RAD51 遺伝子破壊の確認	CGAGCGTCTTCTAGTATTCTTGC
d5RAD51F	RAD51 遺伝子破壊の確認	CTGGAGATAAGCCTCATGGTAATC
d14RAD50F	RAD50 遺伝子破壊の確認	TGATCTGGTGGCAATGTAGAGTC
d14RAD50R	RAD50 遺伝子破壊の確認	GATTCCGTGAGAACTGCATCTAAG
d3W231	RAD18 遺伝子破壊の確認	GCTCTTCTATGGTATAATCAATTGC
d3C233	RAD18 遺伝子破壊の確認	AGTGAAGTTATTT CAGCACTTAACG
d12W205	RAD5 遺伝子破壊の確認	TCAGTTCCAGTAACTCCTATTATGC
d12C209	RAD5 遺伝子破壊の確認	TCTACTACATGACATTT CACAGAGG
d4W1302	RAD30 遺伝子破壊の確認	TCAGGCAGGTTTCTAGTATTTGACC
d4C1306	RAD30 遺伝子破壊の確認	TGTCGTCGTCACACTAATA TACTGG
d16W232	REV3 遺伝子破壊の確認	CAAAGTAGCAATCCACTCTTAGAGG
d16C237	REV3 遺伝子破壊の確認	TTCATAATCATGAAAGTCAAGTAGG

d13W836	<i>HDF1</i> 遺伝子破壊の確認	ACGGATATACTAAACTGTACTCTGG
d13C841-2	<i>HDF1</i> 遺伝子破壊の確認	TAATTGCTTGGCGCAAGCTCTAATCC
dhisGF	<i>hisG</i> フラグメントを使った 遺伝子破壊の確認	TCTGAACCGGTCTGTATCGC
dkanB	<i>KanMX</i> マーカーを使った 遺伝子破壊の確認	CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT
dkanC	<i>KanMX</i> マーカーを使った 遺伝子破壊の確認	TGATTTTGACGAGCGTAAT
d3FL739	<i>LEU2</i> 遺伝子座の構造解析	TCTAAGGCGCCTGATTCAAG
d3RL2213	<i>LEU2</i> 遺伝子座の構造解析	CCAGTTCTGATACCTGCATCC
d3W205	<i>URA3</i> 遺伝子マーカー 挿入領域の構造解析	AACCCCACTTACCCCTCTGTC
d3C205	<i>URA3</i> 遺伝子マーカー 挿入領域の構造解析	GGCAACAGTAGGCAGTGAAAGC
d3W312	<i>ADE2</i> 遺伝子マーカー 挿入領域の構造解析	CTCATACGATGGAGCTCGTTC
d3C314	<i>ADE2</i> 遺伝子マーカー 挿入領域の構造解析	CGTACGGGCTACGTTAATATGTC
d3W84	転座融合部の決定 (クローン #145、#152)	CGTGTACATTGATCACATCGACTG
d3W84-2	転座融合部の決定 (クローン #145、#152)	GATAATACACCCTCCATTGATACGG
dTF150.3	転座融合部の決定 (クローン #145、#152)	GGCACTGTACTTGCACCTATCG
d3W168	転座融合部の決定 (クローン #145、#152)	CCACCAGTAGCATTCTTCTGTATCTG
d3W200- α	転座融合部の決定 (クローン #153、#154)	GCACGGAATATGGGACTACTTCG
d3W200-a-2	転座融合部の決定 (クローン #153、#154)	GGCATTACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTGG
d3C200	転座融合部の決定 (クローン #153、#154)	AGTCACATCAAGATCGTTTATGG
d3C201	転座融合部の決定 (クローン #153、#154)	GGTAGTTTGGATACCATAAGTGACG
d3C202	転座融合部の決定 (クローン #153、#154)	GCGTGCGAAGCGCTTAGTAAATACG
d3C203	転座融合部の決定 (クローン #153、#154)	AGGAAGAGGATGGTTATAGAACTGG
d3C204	転座融合部の決定 (クローン #153、#154)	TATCCTTTCACTTGTTACTCTATGG
d3C204-1-1	転座融合部の決定 (クローン #153、#154)	ACCTCCAAGTGTTGATGCCGAGGACG
d3C204-1-2	転座融合部の決定 (クローン #153、#154)	CGGAATATTGAGGAAAGCAACAATCC

d3C204-2	転座融合部の決定 (クローン #153、#154)	ATCTACATGGGAGTTAGAATTCAGC
d3W204-2	転座融合部の決定 (クローン #153、#154)	TTATAACTGTAACTCATCTGTTTCCTGC
アンカープライマー (RACE adapter)	転座融合部の決定 (クローン #153、#154)	GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGGIIGG GIIGGGIIG ⁴⁾
RACE UAP	転座融合部の決定 (クローン #153、#154)	GGCCACGCGTCGACTAGTACG

- 1) この場合のRAD51 遺伝子破壊断片とは、プラスミド pU6H2MYCを鋳型としたPCRによって作製したものを指す。
- 2) この場合のRAD50 遺伝子破壊断片とは、プラスミド pU6H2MYCを鋳型としたPCRによって作製したものを指す。
- 3) 遺伝子破壊に用いたプライマーに関しては、標的遺伝子ORFの上流あるいは下流領域に相同な配列を大文字で、プラスミド pU6H2MYCに相同な配列を小文字で表記した。
- 4) このプライマーの後半部分のGの連続する配列はdCTPホモポリマーに結合する部分であるが (図III-13)、Tm値が高くなり過ぎないように所々イノシンが挿入されている。

獲得したクローンは、G418を含むYPD寒天培地で選択した。さらに、これらのクローンを滅菌水に溶解してYPD寒天培地に塗布後、pMO317を失い表現型がLys⁻になったクローンをSC-Lys寒天培地にレプリカすることによって同定し、それらをYPD寒天培地から回収した。標的部位へのkanMXマーカの挿入はPCR法によって確認した。この確認に用いるプライマーはkanMXマーカ内と標的部位の外側に設定し、標的部位にkanMXマーカが挿入された場合にのみPCR産物が得られることを挿入の指標とした。使用したプライマーのリストを表II-2に示した。YMO2とYMO9にrad51欠損が導入された株はそれぞれYMO50とYMO51、rad50欠損が導入された株はそれぞれYMO52とYMO53と命名した(表II-1)。YMO50とYMO51を接合させて構築されるrad51 rad52二重欠損二倍体株をRD308、YMO52とYMO53を接合させて構築されるrad50 rad52二重欠損二倍体株をRD309とそれぞれ命名した(表II-1)。

II-5-3 rad18、rad5、rad30 およびrev3 単独欠損株の作製

rad18、rad5、rad30 およびrev3 単独欠損株の作製に関しては、YKU23とYKU34にそれぞれ各遺伝子破壊断片を形質転換することにより行った。この際に用いた遺伝子破壊断片の作製、断片が導入されたクローンの選択および遺伝子破壊確認の手法は、rad50 rad52 およびrad51 rad52 二重欠損株の作製時と同様のもの(本稿II-5-2を参照)を用いた。YKU23とYKU34にrad18 欠損が導入された株はそれぞれYMO12とYMO13、rad5欠損が導入された株はそれぞれYMO54とYMO55、rad30欠損が導入された株はそれぞれYMO56とYMO57、rev3欠損が導入された株はそれぞれYMO58とYMO59、と命名した(表II-1)。YMO12とYMO13を接合させて構築されるrad18欠損二倍体株をRD311、YMO54とYMO55を接合させて構築されるrad5欠損二倍体株をRD312、YMO56とYMO57を接合させて構築されるrad30欠損二倍体株をRD313、YMO58とYMO59を接合させて構築されるrev3欠損二倍体株をRD314、とそれぞれ命名した(表II-1)。

II-5-4 rad18 rad52、rad5 rad52、rad30 rad52 およびrev3 rad52 二重欠損株の作製

rad18 rad52、rad5 rad52、rad30 rad52 およびrev3 rad52 二重欠損株の作製に関しては、YMO2とYMO9にそれぞれ各遺伝子破壊断片を形質転換することにより行った。この際に用いたRAD52 遺伝子の相補、遺伝子破壊断片の作製、断片が導入されたクローンの選択および遺伝子破壊確認の手法は、rad50 rad52 およびrad51 rad52 二重欠損株の作製時と同様のもの(本稿II-5-2を参照)を用いた。YMO2とYMO9にrad18欠

損が導入された株はそれぞれYMO20とYMO21、*rad5* 欠損が導入された株はそれぞれYMO42とYMO43、*rad30* 欠損が導入された株はそれぞれYMO44とYMO45、*rev3* 欠損が導入された株はそれぞれYMO46とYMO47、と命名した（表II-1）。YMO12とYMO13を接合させて構築される*rad18 rad52* 二重欠損二倍体株をRD317、YMO54とYMO55を接合させて構築される*rad5 rad52* 二重欠損二倍体株をRD318、YMO56とYMO57を接合させて構築される*rad30 rad52* 二重欠損二倍体株をRD318、YMO58とYMO59を接合させて構築される*rev3 rad52* 二重欠損二倍体株をRD320、とそれぞれ命名した（表II-1）。

II-5-5 *hdf1* 単独欠損株の作製

hdf1 単独欠損株の作製に関しては、YKU23とYKU34に*HDF1* 遺伝子破壊断片を形質転換することにより行った。この際用いた遺伝子破壊断片は、*Saccharomyces genome deletion project*で作製された*hdf1 Δ::kanMX*株（#870、理研ゲノム科学総合研究センターの白髭克彦博士より分与を受けた、表II-1）より抽出したゲノムDNAを鋳型とし、*hdf1 Δ::kanMX*部位を周辺領域を含む形でPCR増幅を行うことにより得た（図II-1 B）。この断片が導入されたクローンの選択および遺伝子破壊確認の手法は、*rad50 rad52* および*rad51 rad52* 二重欠損株の作製時と同様のもの（本稿II-5-2を参照）を用いた。YKU23とYKU34に*hdf1* 欠損が導入された株はそれぞれYMO14とYMO15と命名した（表II-1）。YMO14とYMO15を接合させて構築される*hdf1* 欠損二倍体株をRD310と命名した（表II-1）。

II-5-6 *hdf1 rad52* 二重欠損株の作製

hdf1 rad52 二重欠損株の作製に関しては、YMO2とYMO9に*HDF1* 遺伝子破壊断片（本稿II-5-5を参照）を形質転換することにより行った。この際に用いた*RAD52* 遺伝子の相補、断片が導入されたクローンの選択および遺伝子破壊確認の手法は、*rad50 rad52* および*rad51 rad52* 二重欠損株の作製時と同様のもの（本稿II-5-2を参照）を用いた。YMO2とYMO9に*hdf1* 欠損が導入された株はそれぞれYMO22とYMO23と命名した（表II-1）。YMO22とYMO23を接合させて構築される*hdf1* 欠損二倍体株をRD316と命名した（表II-1）。

II-6 PCR法

PCR法に関しては、特に記載のない限り *rTaq* polymerase (TAKARA社)、*Ex Taq* polymerase (TAKARA社)、*Z-Taq* polymerase (TAKARA社) のいずれかを用い、それぞれに添付された 10 x buffer と dNTP を使用した。反応には PERKIN ELMER 社 Model 9600 サーマルサイクラーを使用した。反応系は 25 μ l とし、反応液の最終濃度は 200 μ M dNTP、0.4 μ M primer、0.02 unit/ μ l *Taq* DNA polymerase とした。反応には PERKIN ELMER 社 Model 9600 サーマルサイクラーを使用した。*rTaq* および *Ex Taq* を用いる場合には 95°C 1 分の DNA 変性の後、92°C 1 分、52°C 2 分、72°C 2 分の三段階を 30 サイクルの反応条件で行った。また、*zTaq* を用いる場合には 95°C 1 分の DNA 変性の後、98°C 5 秒、55°C 10 秒、72°C 1 分の三段階を 30 サイクルの反応条件で行った。鋳型 DNA に関しては反応液 25 μ l あたり 100~200 ng の量で使用した。PCR法に用いたプライマーの一覧を表 II-2 にまとめた。

II-7 MMS感受性および温度感受性の検定、生育の調査

MMS感受性および温度感受性の検定は一倍体株で行い、終夜培養液もしくはYPD寒天培地上に生育したコロニーを滅菌水に溶解したものを希釈して用いた。希釈は滅菌水で行い、 1×10^7 cfu/ml、 5×10^6 cfu/ml、 1×10^6 cfu/ml、 2×10^5 cfu/ml、の4種類の濃度に調整したものをそれぞれ 5 μ l ずつ寒天培地にスポットした。MMS感受性を検定する場合には通常のYPD寒天培地および 0.01% MMSを含むYPD寒天培地にスポットし、30°C で3日間培養を行った。温度感受性を検定する場合には通常のYPD寒天培地にスポットしたものを3枚用意し、それぞれ 23°C、30°C、37°C で3日間培養を行った。

本研究では各種遺伝子の欠損が生育に及ぼす影響を調べるため、二倍体株の生育を調査した。二倍体細胞の構築の詳細に関しては本稿 II-8-1 で後述する。二倍体細胞は 3 ml の SC-Ade-Leu-Ura 液体培地にて予備培養し、この予備培養液を 60 ml の YPD 液体培地に 0.05 O.D./ml となるように接種した。この際、YPD 液体培地にはアデニンを 40 μ g/ml、ウラシルを 20 μ g/ml となるように加えた。この培養液を振盪培養し、経時的に培養液を採取して O.D. および生菌数の測定と、細胞数の測定および細胞周期分布の観察を行った。O.D. は BECKMAN 社製 DU640 を用いて波長 600 nm で測定した。生菌数に関しては、採取した培養液を適当に希釈して YPD 寒天培地に 100~200 cfu (Colony forming unit) となるように塗布し、3~5 日後に形成されるコロニーを数えることで測定した。細胞数の測定および細胞周期分布の観察に関しては、採取した

培養液を適当に希釈して血球計算盤（サンリード硝子社）に注入し、光学顕微鏡下で実施した。細胞数を計測する際は、出芽の程度により「出芽していない細胞」、あるいは「出芽前期」と「出芽後期」の三種類に細胞を分類した。また、複数の出芽を生じる様な異常な形態を示す細胞については、「形態異常」として分類した。

II-8 LOH解析

II-8-1 表現型による分類

接合型が a 型 ($MATa$) と α 型 ($MAT\alpha$) の一倍体細胞同士をYPD寒天培地上で混合し、4時間以上培養して二倍体細胞を構築した。これをSC-Ade-His-Leu-Trp-Ura寒天培地に画線培養して二倍体細胞の選択を行った。一倍体細胞を完全に除外するため、この画線培養は二度行った。二倍体細胞は、3つの遺伝子マーカーの保持を保証するため3 mlのSC-Ade-Leu-Ura液体培地にて予備培養した。この培養液から100 cfuをとり、5 mlのYPD液体培地に接種した。この際、YPD液体培地にはアデニンを40 μ g/ml、ウラシルを20 μ g/mlとなるように加えた。これは培養中、染色体異常・再編によって表現型がUra⁻あるいはAde⁻ Ura⁻となった細胞に対し、負の選択圧がかからないようにするための対策である。この培養液を 5×10^7 cfu/mlになるまで培養したのち集菌し、滅菌水による洗浄を行った後適当に希釈して、YPD、5-FOA、5-FOA-Leu、5-FOA-Ade-Leuの各寒天培地に塗布した。このプレートを3~5日間培養し、生育してきたコロニーを数えて頻度の測定を行った。解析を行った実験区数に関しては以下の通りである。*rad52* 欠損株；16区、*rad51* 欠損株；20区、*rad50* 欠損株；18区、*rad50 rad52* 二重欠損株；16区、*rad51 rad52* 二重欠損株；16区、*rad18* 欠損株；20区、*rad5* 欠損株；16区、*rad30* 欠損株；4区、*rev3* 欠損株；4区、*rad18 rad52* 二重欠損株；23区、*rad5 rad52* 二重欠損株；8区、*rad30 rad52* 二重欠損株；8区、*rev3 rad52* 二重欠損株；8区、*hdf1* 欠損株；4区、*hdf1 rad52* 二重欠損株；11区。各欠損株で得られた頻度の中間値（メディアン値）を最終的な頻度とした。頻度の統計学的な評価は、主にヒンジ散布度（頻度の最低値より25%~75%の範囲）と「内堀」（25%ヒンジの-1.5倍の値から75%ヒンジの1.5倍の値までの範囲）を求めることによって行った。一般的に、N数が多い場合には98%が内堀の範囲に収まると言われている。中間値を元に、5-FOA耐性頻度から5-FOA耐性 Leu⁺頻度を減ずることで5-FOA耐性Leu⁺頻度を、5-FOA耐性 Leu⁺頻度から5-FOA耐性Leu⁺ Ade⁺頻度を減ずることで5-FOA耐性Leu⁺ Ade⁺頻度を算出した。

II-8-2 パルスフィールドゲル電気泳動

通常のアガロースゲル電気泳動法では20 kb以上の線状DNAを分離することは困難である。1984年、SchwartzとCantorが開発したパルスフィールドゲル電気泳動法（以下PFGE）は、アガロースブロックに埋包したDNA試料に交差する二方向の電場を交互にかけることでこの問題を解決した。PFGEは最大10Mbpまで線状DNAの分離が可能である。本研究では、完全長第III染色体のクローン数を測定するのに用いた。

PFGEに用いるDNA試料は巨大なDNA分子であるため、調整の際物理的な力による切断を避ける必要がある。そのためまず細胞をアガロースに包埋し、ブロックの状態で溶菌、並びに除蛋白処理を行う。このようにして調整したDNA試料をプラグと呼称する。

プラグの作製は、アガロースブロック法 (Carle and Olson, 1987) に従って行った。2.5mg/mlのZymolyase-100T (生化学工業) を含む1.0%のAgarose Low Melt Preparative Grade (BIO RAD社) に試料細胞 6×10^7 cfuを包埋し、溶菌処理ののち1mg/ml Proteinase K (TAKARA社) にて除蛋白処理を行った。一回の泳動につき、プラグの約1/3量 (2×10^7 cfu分) を使用した。

泳動にはCHEF Mapper™ XA Pulsed Field Electrophoresis System (BIO RAD社) を使用した。アガロースゲルはPulsed Field Certified Agarose (BIO RAD社) を1%の濃度で使い、緩衝液にはTBE溶液 (45mM Tris-borate, 1mM EDTA; pH=8.5) を用いた。泳動は常時14℃で行い、電圧6.0 V/cm、泳動時間29.57時間、角度120°、パルス時間に関しては24.03秒の開始パルス時間と1分33.69秒の終了パルス時間の間を直線状に変化させる、という条件で行った。泳動後はゲルを0.5 μg/mlエチジウムブロマイド溶液に30分間浸漬してDNAを染色した後、蒸留水で20分間リンスして撮影を行った。UVトランスイルミネーターで撮影を行ったゲルの写真はDensito GRAPH (アトー社) の画像として取り込み、第I染色体 (230 kb)、第VI染色体 (270 kb)、第III染色体 (330 kb)、第IX染色体 (440 kb) のDNA量をNIH image解析ソフトを用いて定量した。

II-8-3 サザンブロッティング法

サザンブロッティング法の基本的な操作に関しては全て *Molecular Cloning* (Sambrook et al. 1989) の記載に従った。ナイロン膜についてはHybond-N+ (Amersham社) を使い、ゲルからナイロン膜へのDNAの転写はVacuum Blotter (Bio-

Rad社) を使用した。DNAプローブの調整に関しては以下のように行った。まず親株二倍体のゲノムDNAを鋳型とし、表 にあるプライマーを用いてPCRによるDNA断片の増幅を行った。PCR産物はQIA Quick PCR Purification Kit (QIAGEN社) を用いて精製し、その後ECL direct nucleic acid labeling and detection system (Amersham社) を用いて標識を行った。第III染色体を特異的に検出するためのプローブには、第III染色体左腕上の2箇所の領域、III-54 および III-102を同時に用いた。ナイロン膜上でのプローブDNAの検出に関してはGene Images labeling and detection system (Amersham社) を用いて行った。

II-8-4 定量的PCRによる*URA3* 遺伝子マーカー挿入領域の構造解析

URA3 遺伝子マーカーが挿入された領域、すなわちIII-205領域の構造を解析するため、平岡らは定量的PCRによる*URA3* 遺伝子マーカー挿入領域の構造解析法を確立しており、本研究においても同様の方法を利用した (Hiraoka et al. 2000 ; 平岡 2000年度博士論文)。この方法を用いると、*URA3* 内変異と遺伝子変換を区別することが可能である。第III染色体左腕III-102領域に設計されたプライマーセットと、第III染色体右腕III-205領域の*URA3* 遺伝子マーカー挿入部位を挟むように設計したプライマーセットでのPCR反応を共存させて行い、そのPCR産物の長さおよび分子数を比較することによりそれぞれの領域のコピー数を決定する。この方法で*URA3* 内変異を生じたクローンを解析した場合には、III-102領域が2コピー分、III-205およびIII-205::*URA3* 領域がそれぞれ1コピー分増幅される。一方で遺伝子変換を生じたクローンを解析した場合、III-102領域とIII-205領域がそれぞれ2コピー分増幅される。このPCRに用いる鋳型DNAにはPFGE用に作製したプラグの3分の1量 (2×10^7 cfu分) から精製したDNAを0.5 μ l (およそ 3.3×10^5 cfu分に相当する) 用い、反応条件としては95°C1分のDNA変性の後、92°C1分、58°C2分、72°C2分の三段階を18サイクルか20サイクルの反応条件で行った。PCR産物のうち10 μ lについて電気泳動を行った後、ゲルを0.5 μ g/mlエチジウムブロマイド溶液に30分間浸漬してDNAを染色した後、撮影を行った。UVトランスイルミネーターで撮影を行ったゲルの写真はDensito GRAPH (アトー社) の画像として取り込み、III-102領域とIII-205領域のPCR産物量をNIH image解析ソフトを用いて定量した。

II-8-5 ゲノムスキャニング法

ゲノムスキャニング法とは、定量的なPCRを利用した第III染色体の欠失・増幅領域同定法のことを指す（森 1997年度修士論文；平岡 2000年度博士論文；Umezu et al. 2002）。反応条件の若干の変更を除いて、基本的な実験操作と用いたプライマーについては全て森の修士論文の記述に従った。まず、第III染色体上の22箇所のマーカー領域および第VI染色体上の2箇所のコントロール領域、計24領域を別々の反応液としてPCR増幅した。このPCRでは、鋳型としてPFGE用に作成したプラグの3分の1量から精製したDNAを0.2 μ l（およそ 1.3×10^5 cfu分に相当する）用い、反応液の全量を25 μ lとした。PCRの反応条件としては、95°C 1分の変性の後、92°C 1分、60°C 1分、72°C 1分の3段階を22サイクル行った。PCR反応の後、あらかじめ10 μ lの滅菌水を分注しておいたチューブに24種類のPCR産物を10 μ lずつ加えた。この溶液250 μ lのうち2 μ lを、0.5 μ lのサイズマーカー（GENESCAN-500 ROX、PE Applied Biosystems社）および10 μ lのホルムアミド（Amresco社）と混合した。この混合溶液を94°Cで4分間熱処理した後、氷上で冷却することによってPCR産物を一本鎖にし、ABI PRISM310（PE Applied Biosystem社）を用いて電氣的に分離し、PCR産物の量と大きさが決定された。以上の一連の操作は、再現性を確認するため少なくとも2回繰返して行った。

II-8-6 異常染色体融合部の解析

野生株では多くの異常染色体が検出されており、異所性組換えの相手や融合部が既に同定済みである（平岡 2000年博士論文；Umezu et al. 2002）。相同組換え関連遺伝子の各欠損株に生じた異常染色体融合部を解析する際は、異常染色体のサイズから異所性組換えの相手を予測して融合部を挟んだPCRを行った。このPCRで融合部の増幅が行えなかったクローン、もしくは野生株には検出されていないサイズの異常染色体を持つクローンに関しては、本稿II-8-5で述べたゲノムスキャニング法を用いて融合部が存在する第III染色体上の領域を絞り込んだ。

クローン#153および#154の異常染色体融合部のクローニングは、以下の方法で行った。1) *Ex Taq* polymeraseによって、*MATa* 特異的なプライマーであるd3W200-a-2から右腕テロメア方向の配列を単鎖DNAとして合成した。鋳型にはこれらのクローンのPFGE用に作製したプラグの3分の1量から調整したゲノムDNAを用いた。反応系は基本的に本稿II-6で示したものと同一であるが、反応条件としては95°C 1分のDNA変性の後、92°C 30秒、59°C 30秒、72°C 4分の三段階を80サイクルで行った。2) 合成

した単鎖DNAの3'末端に、TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase, GIBCO BRL社) という酵素を用いてdCTPホモポリマーを重合した。反応系は25 μ lとし、反応液の最終濃度は170 pgの単鎖DNA、0.1 M potassium cacodylate(pH 7.2)、2 mM CoCl₂、200 μ M dithiothreitol、200 μ M dCTP、0.4 μ M primer、10 unit TdTとし、30°Cで30分インキュベートした。3) dCTPホモポリマーの付加された単鎖DNAを精製して鑄型とし、*rTaq* polymeraseを用いたPCR法によって二本鎖DNAの増幅を行った。反応系ならびに反応条件は基本的に本稿II-6で示したのと同じである。プライマーにはd3W204-2とアンカープライマー (RACE adapter) を用いた。4) その結果得られるPCR産物を鑄型とし、再度PCR法による増幅を行った。反応系および反応条件は3)と同じであるが、プライマーにはd3W204-2とRACE UAPを用いた。

II-8-7 DNAの塩基配列解析

PCR法によって増幅されたDNA断片をポリエチレングリコール法によって精製した後 (Sambrook and Russell 2001)、BigDye terminator cycle sequencing kits (PE Applied Biosystems社) を用い、製造元の指示に従って一本鎖DNAを調整した。準備したサンプルについては、ABI PRISM310 (PE Applied Biosystem社) を用いてその塩基配列を決定した。DNA配列間の相同性解析にはGeneWorks解析ソフトウェア (version 2.5.1、Oxford Molecular Group) を使用した。

結果

III-1 相同組換え欠損株の解析

本研究では、染色体異常・再編の発生における相同組換え機構の役割を明確にするため、相同組換え関連遺伝子である*RAD52*、*RAD51* および*RAD50* 遺伝子を欠損した株を作製し、それらに生じるLOHを詳細に解析した。*RAD52* 遺伝子は鎖交換やSSAといった相同組換え経路全般に、*RAD51* 遺伝子は主に鎖交換反応に要求される。また、*RAD50* 遺伝子は主に組換え初期過程のDNA末端のプロセッシングに関与している。それぞれの欠損株では、失われている相同組換え経路や反応が異なるため、それに対応して三つの欠損株間で生じる染色体異常・再編に違いが表れることが予想された。

III-1-1 相同組換え欠損がアルキル化剤感受性に及ぼす影響

本研究では相同組換え関連遺伝子の欠損株として*rad52*、*rad51* および*rad50* それぞれの単独欠損株を作製したが（株作製の詳細については本稿II-5-1を参照）、まず最初にこれらの株で遺伝子破壊がきちんと行われているかを確認するため、DNAのアルキル化剤であるメチルメタンサルホン酸（以下MMS）への感受性を検定した。MMSはRadio mimic agentとも呼ばれ、細胞に放射線を照射した時と同様の効果をもたらすことから、放射線照射時に誘発されるDNA上の損傷や傷害とよく似た状況を発生させると考えられている。また、*rad52*、*rad51* および*rad50* 欠損株は放射線照射と同様MMSにも感受性を示すことが知られている（Adzuma et al. 1984 ; Kupiec and Simchen 1984 ; Shinohara et al. 1992）。このことを利用して、本研究で作製した相同組換え欠損株が0.01%のMMSを含むYPD寒天培地上で生育できないことを遺伝子破壊の指標とした。結果を図III-1に示した。本研究で作製した一倍体の相同組換え欠損株はいずれも0.01%のMMSに感受性を示したことから、それぞれの標的遺伝子；*RAD52*、*RAD51*、*RAD50* 遺伝子が破壊され、いずれの欠損株でもその機能が失われていることが確認された。

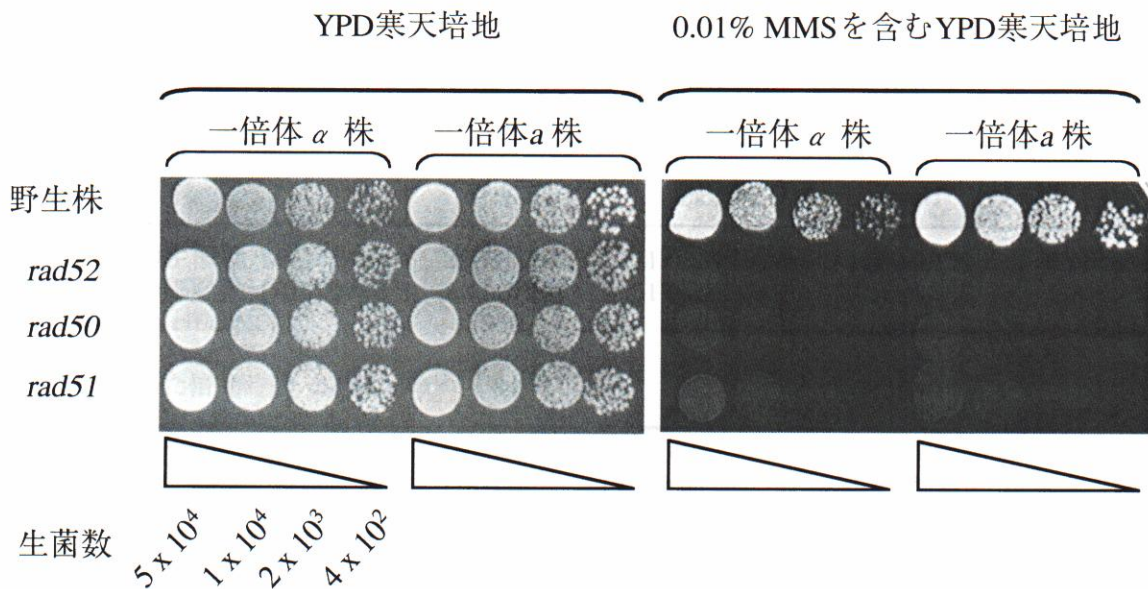
III-1-2 相同組換え欠損が生育に及ぼす影響

次に、相同組換え関連遺伝子の欠損が生育に及ぼす影響を調べるため、各株の生

菌数、ならびに細胞の出芽状況について経時的に測定を行った。測定に際してはLOH解析時と同じ二倍体株で行い、培地についてもLOH解析時に使用するものと同じ、YPD液体培地にアデニンとウラシルを添加したものを使用した（LOH解析条件の詳細については本稿III-1-4で後述）。経時的に採取した培養液1 mlあたりのO.D.と生菌数・細胞数を計測し、生菌数をもとに作製した生育曲線を図III-2に、O.D.あたりの生菌数 (cfu ; Colony forming unit) と細胞数、ならびにそれらから算出したplating efficiency (細胞数あたりの生菌数)、生菌数より算出した倍加時間を株毎に表III-1にまとめた。ここでいう生菌数とはYPD寒天培地上でコロニーを形成する能力のある細胞の数であり、細胞数とは光学顕微鏡下で数えた培養液中の細胞粒子の数を指す。培養液中の細胞が全てコロニー形成能を持つと仮定した場合、plating efficiencyは100%となる。細胞数を計測する際は、出芽の程度により「出芽していない細胞」、あるいは「出芽前期」と「出芽後期」の三種類に細胞を分類した（図III-3）。この分類は、それぞれ細胞周期のG₁期、S期、G₂-M期に対応している。従って、図III-3の分布パターンは採取を行った時点での細胞集団中の細胞周期分布の状態を反映している。また、複数の出芽等の異常な形態を示す細胞については、「形態異常」として分類した。

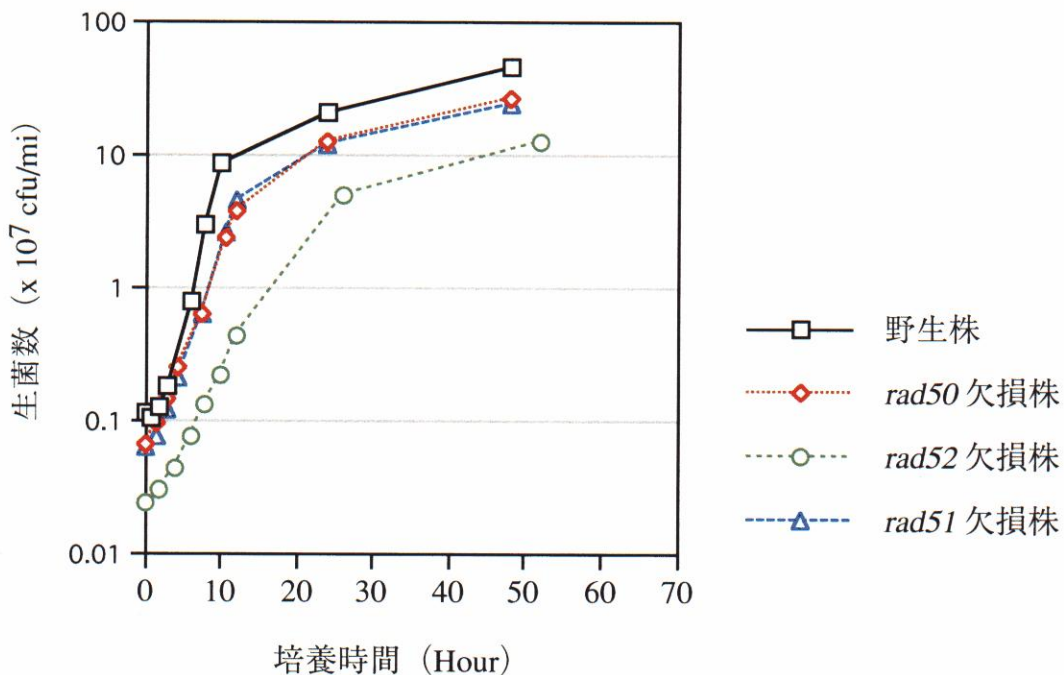
相同組換え欠損株の生育特性を調べた結果、表III-1にある様に*rad51* 欠損株、*rad50* 欠損株、*rad52* 欠損株の順で野生株に対し倍加時間が遅延し、O.D.あたりの生菌数・細胞数が少なくなっていく傾向が観られた。O.D.あたりの生菌数・細胞数の低下は、野生株に対し細胞が肥大化していることを示唆している。実際、相同組換え欠損株の細胞を光学顕微鏡下で観察すると、図III-3にある様に、対数増殖期においてG₂-M期の細胞と形態異常を示す細胞の割合が野生株に対して増大しており、逆にS期の細胞の割合が減少していた。加えて、各欠損株のG₂-M期の細胞は野生株に比べ細胞の大きさ自体も肥大化する傾向があった。これらの知見は、相同組換え機構が欠損した場合にはゲノムDNAの複製過程で何らかの問題が生じ、その問題が順調に解決されずG₂-M期で細胞周期の一時的な停止が起きていることを示唆している。また、どの欠損株も野生株に比べてplating efficiencyが低下していた。このことは、成育中に細胞が死んだり細胞周期停止の解除が行われなかった結果、コロニー形成能を失ってしまった細胞が出現していることを示唆している。

以上の結果をまとめると、相同組換え欠損株ではG₂-M期で細胞周期が一時的に停止したり形態異常を生じる細胞の割合が増加し、加えて、分裂できなくなってしまう細胞が出現していることが示唆された。倍加時間の遅延には、これらの現象が複合的に関与していると考えられる。



図III-1 相同組換え関連遺伝子を欠損した株はMMS感受性を示す

一倍体細胞株をYPD寒天培地および0.01% MMSを含むYPD寒天培地にスポットして30℃で3日間培養し、コロニー形成の有無を指標とすることによりMMS感受性を検定した。



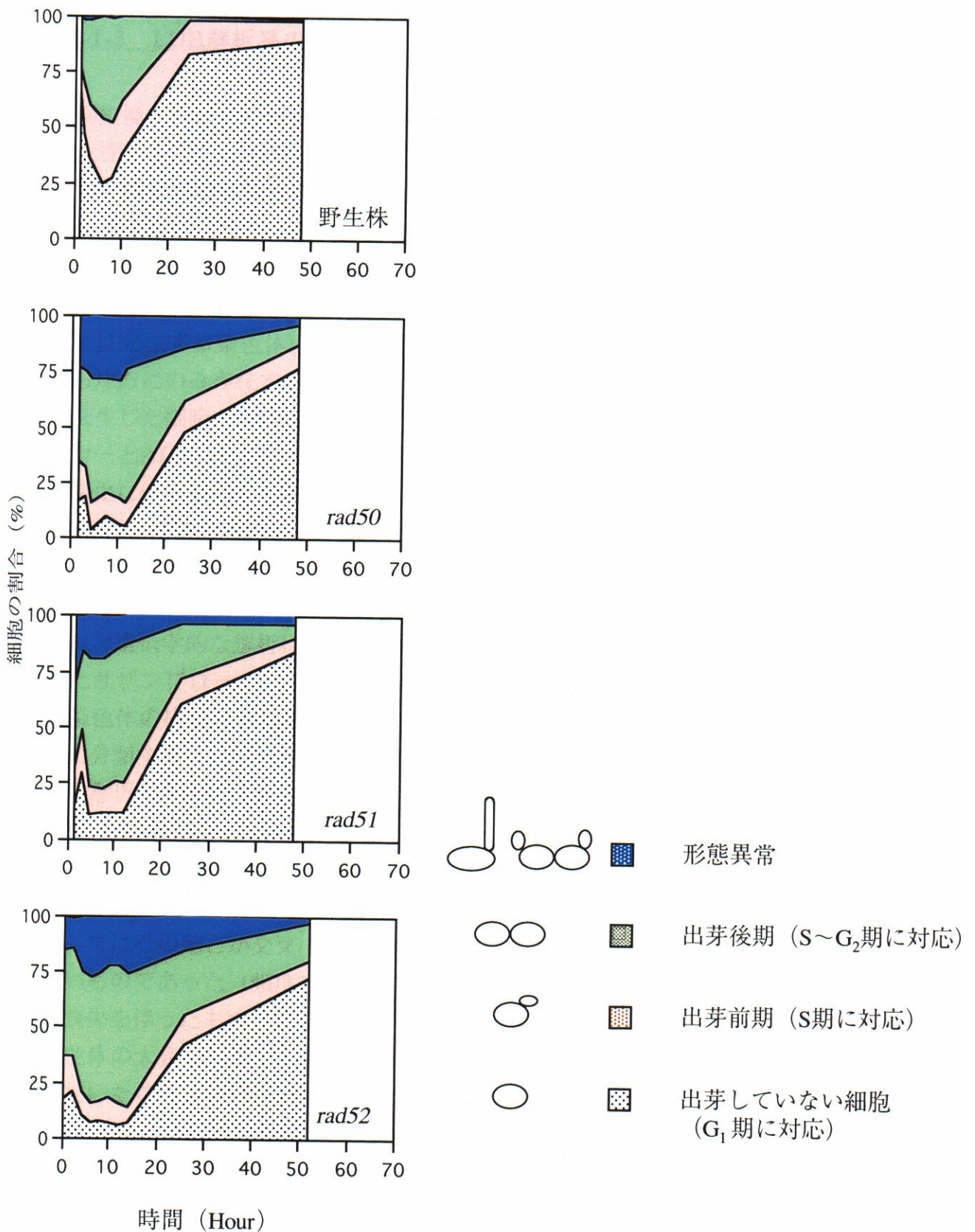
図III-2 相同組換え関連遺伝子の欠損が生育に及ぼす影響

経時的に採取した培養液1 mlあたりの生菌数を計測し、その値をもとに生育曲線を作製した。生育の調査に関してはLOH測定時と同じ二倍体株で行い、培地についてもLOH測定時に使用するものと同じ、YPD液体培地にアデニンとウラシルを添加したものを使用した。

表III-1 相同組換え関連遺伝子欠損株の plating efficiencyと倍加時間

株	野生株	<i>rad50</i>	<i>rad51</i>	<i>rad52</i>
O.Dあたりの生菌数 ($\times 10^7$)	2.33 \pm 0.382	1.05 \pm 0.197	1.27 \pm 0.150	0.748 \pm 0.158
O.Dあたりの細胞数 ($\times 10^7$)	2.43 \pm 0.197	1.85 \pm 0.278	2.50 \pm 0.707	1.51 \pm 0.284
Plating efficiency	96%	57%	51%	50%
生菌数より求めた倍加時間 (Min)	84	123	96	146

生菌数および細胞数は、図III-2において対数増殖期の直線性のある範囲の平均を求めて算出した。倍加時間に関してもその範囲より算出した。



図III-3 相同組換え関連遺伝子欠損株における細胞周期の経時的変化

III-1-3 LOH解析系の概略

相同組換え欠損株のLOH解析結果の詳細に触れる前に、LOH解析系の概略、並びに野生株で生じたLOHの解析結果について軽く述べておくことにする。当研究室では、出芽酵母二倍体細胞をモデル生物とし、染色体レベルでの再編や異常を効率的に検出・分類し、さらにそれらを定量的に比較することを目的とした解析系を構築してきた (Hiraoka et al. 2000 ; Umezu et al. 2002)。解析系の基本構想を図I-1に示した。この系では親株となる二倍体細胞を富栄養条件下で培養し、その過程で第III染色体上に発生する染色体再編・異常を検出する。この検出は、二本ある第III染色体のうち片方にのみ存在する *URA3* 遺伝子マーカーの機能が失われた細胞、つまりLOHを生じた細胞が5-FOA耐性を示すことを指標としている。同時に、*LEU2* 遺伝子マーカーと *ADE2* 遺伝子マーカーの有無を調べることにより、*URA3* 遺伝子マーカーの不活化に伴う染色体再編・異常をもたらしたメカニズムについて、クラスA；「染色体喪失」(5-FOA耐性 *Leu⁻ Ade⁻*)、クラスB；「染色体間の組換え」(5-FOA耐性 *Leu⁺ Ade⁻*)、クラスC；「*URA3* 遺伝子マーカー内の変異」・「遺伝子変換」・「染色体内欠失」(5-FOA耐性 *Leu⁺ Ade⁺*) の三つのクラスに分類することが可能である。この様な遺伝学的な解析に加え、PFGEと第III染色体を特異的に認識するプローブを用いたサザンブロッティング法、および、PCR法を用い、LOHを生じたクローンの第III染色体の構造を直接的に観察することで、各グループ内のLOHイベントを更に詳細に分類することが可能である。

この解析系を用いて野生株に生じるLOHを解析した結果、LOHの発生頻度は 1.2×10^{-4} であり、その内訳は56%が染色体喪失 (図I-1 A-a')、34%が相同染色体アレル間の組換え (図I-1 B-a、C-b)、8%が染色体のサイズ異常を生じたもの (図I-1 B-b、C-c) であった (Hiraoka et al. 2000 ; Umezu et al. 2002)。相同染色体アレル間の組換えに関してはその殆どが交叉 (頻度 4.3×10^{-5}) によるものであり、遺伝子変換の割合は小さいものであった (頻度 3.2×10^{-7})。交叉に関しては、その6%が一方の第III染色体の喪失を伴ったものであることが判明した (図I-1 B-a')。サイズ異常を生じた異常染色体の大きな特徴として、その融合部にゲノム中に散在する繰り返し配列が介在していたことが挙げられる。例えば転座や不等交叉の場合ほぼ全ての異常染色体融合部にレトロトランスポゾンTyやLTRが見い出され、染色体内欠失はその全てが第III染色体上に特異的に存在する *MAT-HMR* 間の欠失であった。また、極めて頻度は低かったものの *URA3* 遺伝子マーカー内の点突然変異が検出された (図I-1 C-a)。

以上の様に、本研究で用いているLOH解析系は様々な染色体再編や異常のみならず塩基配列レベルでの変化も含めた様々なLOHイベントを網羅的に検出・分類し、それらの発生頻度や割合を定量的に比較することが可能である。本研究では野生株におけるLOHの解析データを基準とし、様々な欠損株との比較・検討を行った。

III-1-4 相同組換え欠損株では染色体喪失によるLOHが上昇する

序論でも述べた様に、野生株では染色体再編や一部の染色体喪失などLOHの発生過程において相同組換え機構が多面的に関与していることが明らかになった。また、これらの知見からLOHの主要な原因は通常の細胞増殖時に発生する、相同組換え反応の基質となる様な自然DNA傷害 (two-strand DNA傷害) であることが推測された。まず最初に本研究では、相同組換えの欠損がLOHにどのような影響を及ぼすのかを調べるため、*rad52*、*rad51* および*rad50* それぞれの単独欠損株で生じるLOHを解析した。

解析に供する二倍体株は、YKU23由来 (α 株) とYKU34由来 (a 株) の相同組換え関連遺伝子欠損株一倍体同士を接合させて形成した (表II-1)。この二倍体を予めSC-Leu-Ura-Ade液体培地 (ロイシン、アデニン、ウラシルを含まない完全合成培地) で予備培養し、その培養液から100 cfuをとり、アデニンとウラシルを加えた5 mlのYPD液体培地に植菌して 5×10^7 cfu/mlの濃度に達するまで本培養した。理論上、この間に細胞は平均約21世代前後分裂することになる。本研究ではこの本培養中に生じたLOHを観察している。予備培養液にSC-Leu-Ura-Ade培地を用いるのは予備培養液中でLOHが生じるのを抑制するためであり、また、本培養の際アデニンとウラシルを加えるのは、LOHによってUra⁻やAde⁻の表現型となったクローンに負の選択圧がかからない様にするための処置である。本培養の終了後、培養液を5-FOA寒天培地、5-FOA-Leu寒天培地 (ロイシンを含まない5-FOA培地) および5-FOA-Leu-Ade (アデニンとロイシンを含まない5-FOA培地) 寒天培地に塗布し、それぞれの頻度を測定した。頻度の測定は複数の実験区で行い、その中間値 (メディアン値) を最終的な頻度とした (表III-2A)。平均値 (mean) ではなく中間値を使用したのは、まれにジャックポット効果と呼ばれる極端に頻度の高くなる実験区が出現するためである (Hiraoka et al. 2000 ; 平岡 2000年博士論文)。ジャックポットが存在した場合、平均値を用いると頻度を過大評価することになってしまう。また、一般的に変異や染色体再編等の測定を行う場合には率 (rate ; 細胞分裂あるいは世代あたりの発生確率) を使用するが、その場合には測定の対象となる細胞が全て同じスピードで増殖することが前提となる。本研究であえて頻度を採用したのは、LOHを生じたクローンでは親株に対して増殖スピードが遅くなるケースがあるからである (Hiraoka et al. 2000)。

図III-4に各相同組換え欠損株における5-FOA耐性頻度、5-FOA耐性 Leu⁺頻度、5-FOA耐性Leu⁺ Ade⁺頻度の散布図を示した。この図におけるプロット一個は一つの実験区での頻度を反映している。頻度の統計学的な評価は、主にヒンジ散布度 (頻度

の最低値より25%~75%の範囲) (図III-4中の細い縦線) と「内堀」 (25%ヒンジの1.5倍の値から75%ヒンジの1.5倍の値までの範囲) を求めることによって行った。一般的に、N数が多い場合には98%が内堀の範囲に収まると言われている。ヒンジ散布度は中間値に対して頻度がばらつく度合いを反映しており、平均値における標準偏差 (SD) に相当する。表III-2Aには中間値と一緒に散布度に関するまとめもまとめた。これらの中間値を元に、5-FOA耐性頻度から5-FOA耐性 Leu⁺頻度を減ずることで5-FOA耐性Leu⁻頻度を、5-FOA耐性 Leu⁺頻度から5-FOA耐性Leu⁺ Ade⁻頻度を減ずることで5-FOA耐性Leu⁺ Ade⁻頻度を算出した (表II-2B)。5-FOA耐性Leu⁻頻度は染色体喪失の頻度 (クラスA)、5-FOA耐性Leu⁺ Ade⁻頻度は交叉・転座等の染色体間の組換えによるLOH頻度の合計 (クラスB)、5-FOA耐性Leu⁺ Ade⁺頻度は遺伝子変換・点突然変異・欠失によるLOH頻度の合計 (クラスC) を反映している (図I-1)。理論上、染色体喪失を生じたクローンは5-FOA耐性Leu⁻ Ade⁻の表現型を示すが、5-FOA耐性Leu⁻の表現型を示すクローンは全て染色体喪失であることが確認されているので (Hiraoka et al. 2000)、本研究では5-FOA耐性Leu⁻頻度を染色体喪失の頻度として使用した。

図III-5のグラフは各相同組換え欠損株の全LOH頻度を比較したもので、さらに染色体喪失とそれ以外のLOHイベントの割合を示している。図III-5にある様に、*rad52*、*rad51* および*rad50* 単独欠損株はいずれもLOH頻度が $2.5\sim 3.6 \times 10^3$ と野生株の20倍から30倍にまで著しく上昇していた。さらに、LOHを生じたクローンの80%から99%は染色体喪失を生じたものであることが判明した。これらのクローンが本当に染色体を失っているかを確認するため、各単独欠損株から5-FOA耐性Leu⁻の表現型を示すクローンを20ずつ回収し、PFGEとサザンブロットング法によって第III染色体のコピー数やサイズを調査した。PFGEとサザンブロットング法を用いると、第III染色体に関して、1) 正常な長さの第III染色体2コピー、2) 正常な長さの第III染色体1コピーとサイズ異常を生じた第III染色体 (1~複数本)、3) 正常な長さの第III染色体1コピー、という分類を行うことが可能である (図I-2)。

これらの方法を用いて解析を行った結果、*rad52* 欠損株の1クローンを除いた全てのクローンは完全長の第III染色体を1本しか保持していないことが判明した。*rad52* 欠損株の1クローンについては完全長の第III染色体を2本保持していた。PCR法により第III染色体のLEU2 遺伝子座とURA3 遺伝子マーカー・ADE2 遺伝子マーカー挿入部位の構造を調べた所、このクローンの第III染色体にはいずれも存在していないことが確認された。従って、このクローンは染色体喪失を生じた後、残った第III染色体が再度複製されたか、あるいは細胞が分裂する際に染色体が不均等に分離したのではないかと考えられる。この1クローンは「染色体喪失+複製」として分類した。

以上の様に、相同組換えを欠損した株では染色体が非常に不安定になっており、喪失しやすくなっていることが示された。これらの結果は、増殖中の細胞内で染色体の崩壊をもたらす様な自然DNA傷害がかなり頻繁に生じ、それらの回避に相同組

表III-2

A. 相同組換え関連遺伝子欠損株の 5-FOA耐性頻度、 5-FOA耐性Leu⁺頻度、 5-FOA耐性Leu⁺Ade⁺頻度の中間値

表現型	中間値 (25%-75%ヒンジ) × 10 ⁻⁵					
	野生株 ¹⁾	<i>rad50</i>	<i>rad51</i>	<i>rad52</i>	<i>rad50 rad52</i>	<i>rad51 rad52</i>
5-FOA耐性	12 (8.8-18.6)	362 (341-413)	245 (172-369)	332 (295-473)	559 (461-687)	474 (452-507)
5-FOA耐性Leu ⁺	5.2 (2.7-8.3)	78 (75-83)	14 (9.4-16)	0.86 (0.53-2.5)	9.1 (6.2-11)	1.1 (0.76-2.0)
5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁺	0.35 (0.15-0.57)	4.6 (3.1-8.9)	2.9 (2.5-6.2)	0.29 (0.11-0.39)	0.31 (0.18-0.60)	0.33 (0.20-0.74)

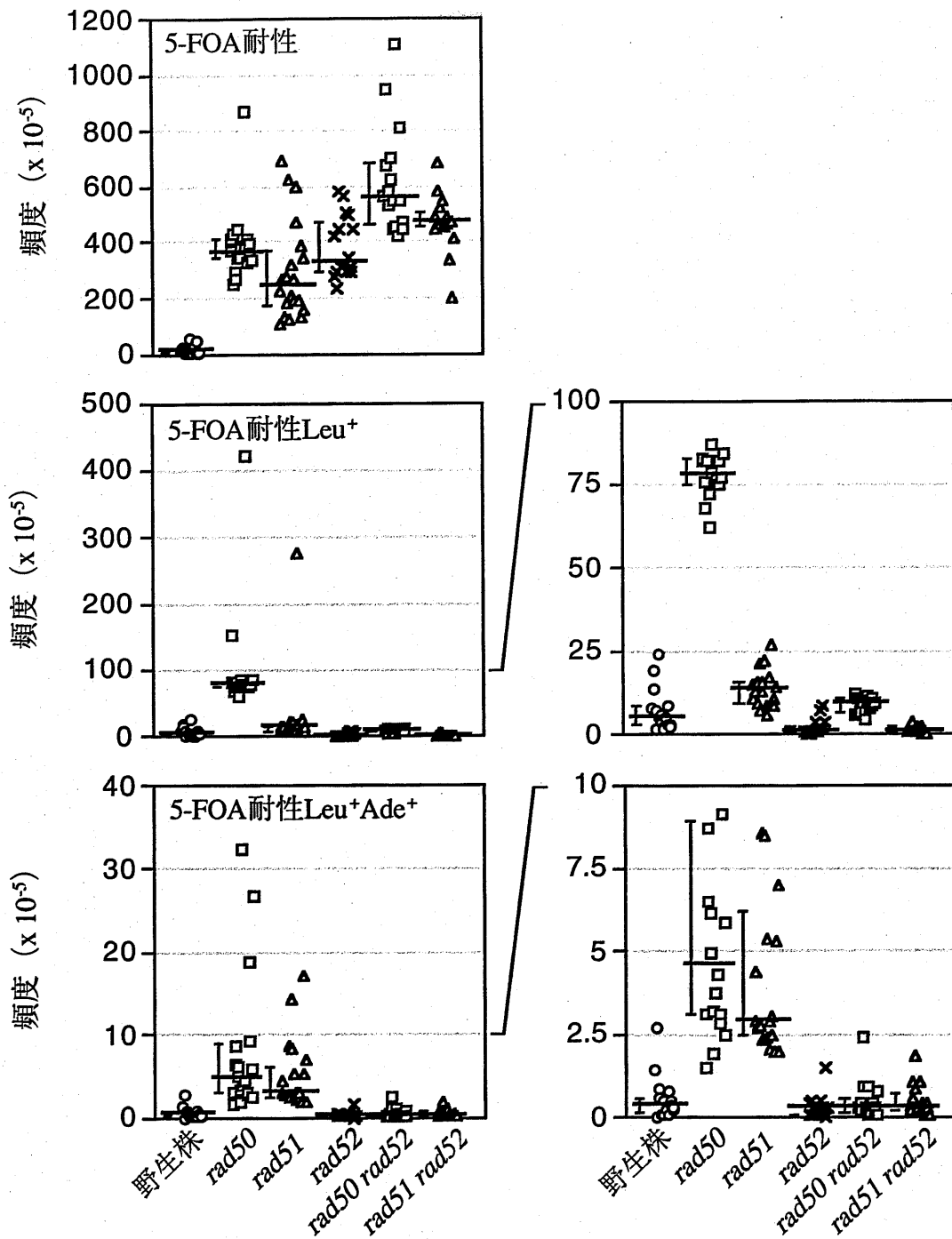
B. 中間値より算出したクラス A~Cの頻度

クラス ²⁾	表現型	頻度 (5-FOA耐性頻度中の割合、%) × 10 ⁻⁵					
		野生株	<i>rad50</i>	<i>rad51</i>	<i>rad52</i>	<i>rad50 rad52</i>	<i>rad51 rad52</i>
A	5-FOA耐性Leu ⁻	6.8 (57)	284 (78)	231 (94)	331 (99.7)	550 (98.3)	472 (99.5)
B	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁻	4.9 (41)	73 (20)	11 (4.5)	0.56 (0.17)	8.8 (1.6)	0.81 (0.17)
C	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁺	0.35 (2.9)	4.6 (1.3)	2.9 (1.2)	0.29 (0.087)	0.31 (0.056)	0.33 (0.069)
合計	5-FOA耐性	12 (100)	362 (100)	245 (100)	332 (100)	559 (100)	474 (100)

A 解析を行った実験区数に関しては以下の通りである。*rad52* 欠損株；16区、*rad51* 欠損株；20区、*rad50* 欠損株；18区、*rad50 rad52* 二重欠損株；16区、*rad51 rad52* 二重欠損株；16区。

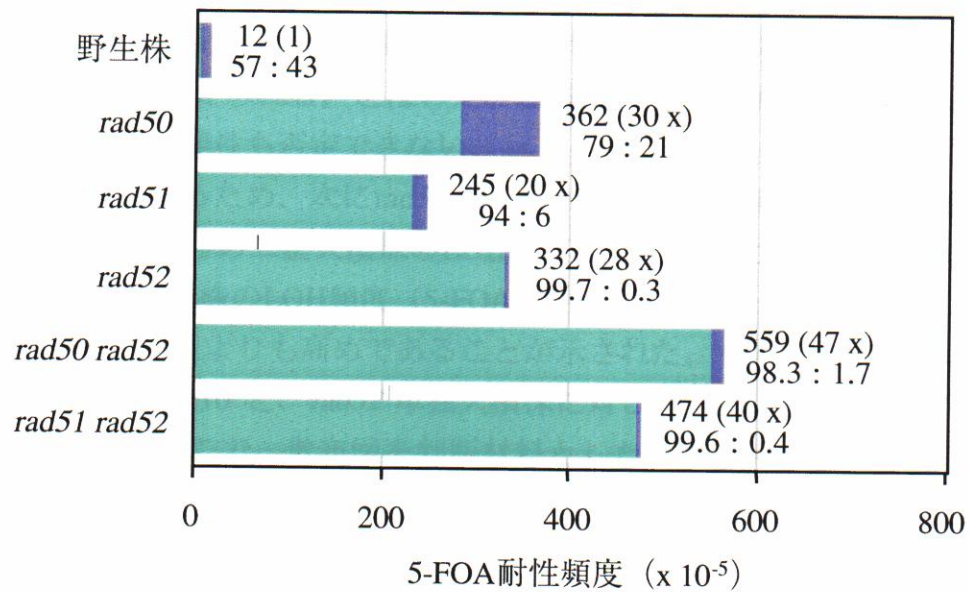
B Aの中間値を元に、5-FOA耐性頻度から5-FOA耐性 Leu⁺頻度を減ずることで5-FOA耐性Leu⁻頻度を、5-FOA耐性 Leu⁺頻度から5-FOA耐性Leu⁺ Ade⁺頻度を減ずることで5-FOA耐性Leu⁺ Ade⁻頻度を算出した。()内の値は5-FOA耐性頻度を100%とした場合の割合を示している。

- 1) 野生株二倍体 (RD301) のデータはHiraokaらの研究によるものである (Hiraoka et al. 2000)。
- 2) 5-FOA耐性クローンの表現型によるクラス分類は図I-1と同様のものである。



図III-4 相同組換え関連遺伝子欠損株における 5-FOA耐性頻度、5-FOA耐性Leu⁺頻度、5-FOA耐性Leu⁺Ade⁺頻度の散布図

図中のプロット一個は一実験区での頻度を表している。頻度の中間値を太い実線で表し、その左に細い縦線でヒンジ散布度を表した。ヒンジ散布度とは、最低値より25%~75%の範囲のことを指す。野生株二倍体 (RD301) のデータはHiraokaらの研究によるものである (Hiraoka et al. 2000)。



図III-5 相同組換え関連遺伝子の欠損が LOH頻度に及ぼす影響

■は染色体喪失（クラスA）、■はその他のLOHイベント（クラスB、C）の頻度を表している。また、バーの右上には5-FOA耐性頻度を、右下には染色体喪失の割合:その他のLOHイベントの割合 (%)を示した。

換え機構が大きく寄与している；言い換えれば、野生株では自然DNA傷害が相同組換え機構によってエラーフリーに、つまりLOHを伴わない形で回避されていることを示唆している。つまり、相同組換え機構はLOHの抑制に大きく寄与しているということが判明した。この様なエラーフリーな回避プロセスの実体は姉妹染色分体間の組換えであると推測される。*rad52*、*rad51* および *rad50* いずれの単独欠損株でも同程度染色体喪失が上昇したことを考慮すると、姉妹染色分体間の組換えは、*RAD52*、*RAD51* および *RAD50* 遺伝子機能全てが要求される一つの「主要経路」により行われていることが考えられる。とはいえ、これらの遺伝子がそれぞれ独立して別々の経路に関与する可能性も否定できない。

この点に関して検討するため、次に *rad50 rad52*、*rad51 rad52* 二重欠損株を作製し、LOH解析を行った。これらの二重欠損株のLOH頻度を中間値で比較した場合（図III-5）、*rad50 rad52* 二重欠損株のLOH頻度（5-FOA耐性頻度）は 5.6×10^{-3} と、*rad52* 単独欠損株の 3.3×10^{-3} という値よりも高めであることが示された。一方、*rad51 rad52* 二重欠損株のLOH頻度は 4.7×10^{-3} と、*rad52* 単独欠損株に対し有意に上昇しているのか判断を下すのが難しい。そこで、散布図を判断材料とした（図III-4）。図III-4では図III-5と異なり中間値だけでなく全実験区の頻度の分布状況が反映されている。*rad52* 単独欠損株の5-FOA耐性頻度は $2.0 \sim 6.0 \times 10^{-3}$ に集中しているが、*rad50 rad52* 二重欠損株では分布範囲が $4.0 \sim 12 \times 10^{-3}$ と *rad52* 単独欠損株よりも明らかに高い傾向があった。*rad51 rad52* 二重欠損株に関しては、どちらかと言えば5-FOA耐性頻度の分布状況が *rad52* 単独欠損株に近い様に見受けられる。この株の5-FOA耐性頻度は *rad52* 単独欠損株と同じか、もしかしたら若干高めな程度なのかも知れない。いずれにしても、どちらの二重欠損株でも相乗的な効果は観られなかったことから、*RAD52*、*RAD51* および *RAD50* 遺伝子の全てが要求される主要経路として姉妹染色分体間の組換えに作用しているという仮説が裏付けられた。*rad50 rad52* 二重欠損株の5-FOA耐性頻度が *rad52* 単独欠損株よりも高めになった理由に関しては考察で述べる。

染色体喪失以外のLOH、すなわちクラスBとクラスCのLOHイベントに関しては以下の様に分類を行った。まず、5-FOA耐性Leu⁺クローンは *ADE2* 遺伝子マーカーが失われている場合にはクラスB（図I-1）に、保持されている場合にはクラスC（図I-1）に分類した。さらに、5-FOA-Leuプレートから5-FOA耐性Leu⁺ Ade⁻の表現型を示すクローン（クラスB）を、5-FOA-Leu-Adeプレート5-FOA耐性Leu⁺ Ade⁺の表現型を示すクローン（クラスC）を各クラス40～55クローンずつ単離し、PFGE、サザンブロッティング、PCRによって第III染色体の構造を調べ、より詳細な分類を行った（表III-3）。5-FOA-LeuプレートにはクラスBとクラスCのクローン双方が生育するが、クラスBのクローンは *ADE2* 遺伝子を失っている為、赤いコロニーを形成するので判別することができる（*ade2* 欠損株は赤いコロニーを形成することが知られている）。クラスCでは、遺伝子変換と *URA3* 遺伝子マーカー内の変異は第III染色体の数や長さが

同一であるためPFGEやサザンブロット法で区別することは不可能である（図I-1）。この場合、PCR法によってURA3 遺伝子マーカー挿入領域の構造を解析することにより、両者を区別することが可能となる（本稿II-8-4、Hiraoka et al., 2000；平岡 2000年博士論文）。これらの解析結果に基づいて各LOHイベントの割合を決定し、A～Cの各クラスの頻度に乗じることで最終的な頻度を算出した。各相同組換え欠損株のLOHイベントの頻度を表III-7にまとめ、図III-6に野生株に対する各LOHイベント頻度の増減を示した。以下に述べる様に、染色体喪失以外のLOHイベントに関しては、*rad52*、*rad51* および*rad50*それぞれの欠損株で異なる傾向が観られた。

III-1-5 *rad52* 欠損はあらゆるタイプの組換えを減少させる

出芽酵母の相同組換え機構には、鎖交換やBIR、SSAといったいくつかの経路があることが知られている。*RAD52* 遺伝子はこれらの経路全てに関与すると考えられることから、この遺伝子を欠損した場合には相同組換えによるLOHイベントが全般的に低下することが予想された。

実際*rad52* 欠損株では、野生株に対しあらゆる組換えイベントが減少していた。相同染色体アリル間の組換えに関しては交叉の頻度が野生株の10%まで減少した（図III-6）。ただし、遺伝子変換の頻度については90%と交叉程の影響は観られなかった。また、異所性の組換えに関しても減少が観られ、転座・不等交叉の頻度が野生株の17%に、染色体内欠失の頻度が30%まで減少した。従って、これらの染色体再編によるLOHの発生には*RAD52* 遺伝子依存的な相同組換えが寄与していることが示された。

III-1-6 *rad52* 欠損株に生じた異常染色体の解析

rad52 欠損株では、多くのタイプの染色体再編が減少こそするものの、それらが完全に消滅してしまう訳ではなかった。逆に言えばこれらの結果は、*RAD52* 遺伝子に依存しない何らかの染色体再編の経路、例えばNHEJ機構などが寄与している可能性を示唆している。この*RAD52* 非依存的な経路の実体を掴む為、この欠損株で生じた染色体内欠失や転座・不等交叉により生じた異常染色体融合部の解析を行った。

野生株では、全ての染色体内欠失が第III染色体右腕に存在する*MATa* と*HMRa* という長さ1.6 kbの順方向に並んだ繰返し配列（図I-3）間で生じており、その結果第III染色体は80 kb短縮化することが判明している（Hiraoka et al. 2000）。*MATa* のセントロ

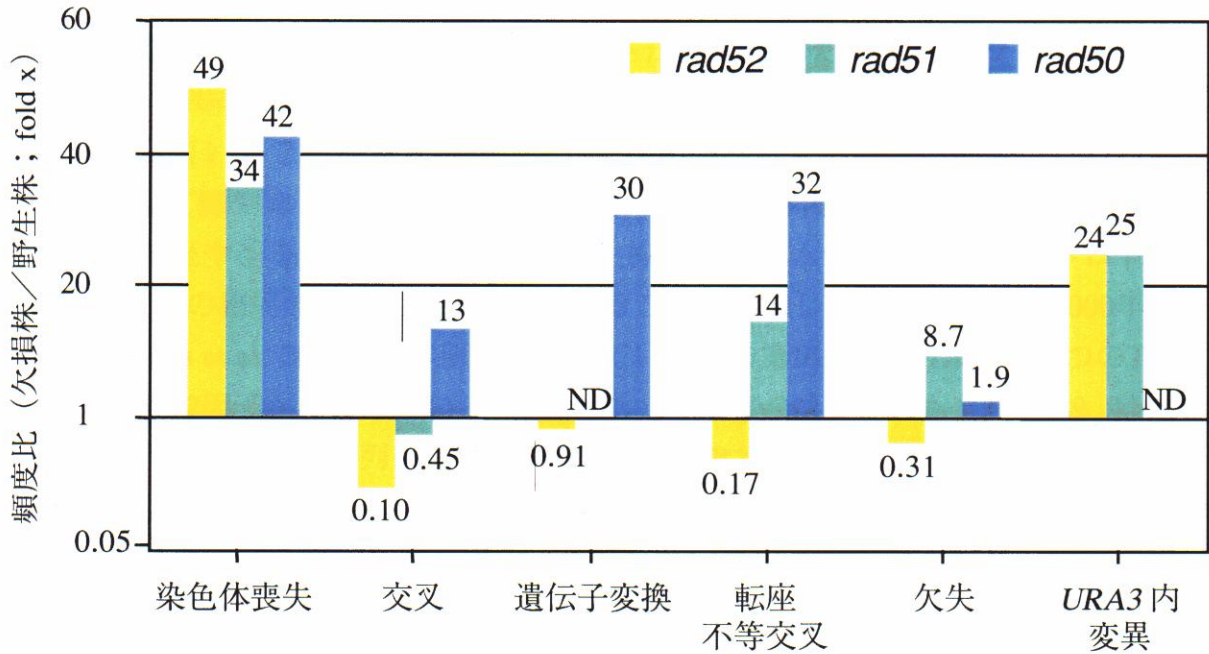
表III-3 第III染色体のコピー数と異常染色体のサイズに基づいた
相組換え関連遺伝子欠損株の LOHクロンの分類

頻度 (検出クローン数 / 解析クローン数) × 10 ⁻⁵							
完全長第III染色体コピー数: サイズ異常を生じた第III染色体コピー数 ²⁾							
株	表現型	クラス	頻度 (× 10 ⁻⁵)	2:0	1:1 (<i>MAT-HMR</i> Δ ³⁾)	1:≥1 (non <i>MAT-HMR</i> Δ ⁴⁾)	1:0
野生株 ¹⁾	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁻	B	4.9	4.0 (115/140=0.82)	<0.035 (0/140<0.0071)	0.63 (18/140=0.13)	0.25 (7/140=0.05)
	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁺	C	0.35	0.039 (11/98=0.11)	0.31 (87/98=0.89)	<0.0036 (0/98<0.010)	<0.0036 (0/98<0.010)
<i>rad52</i>	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁻	B	0.56	0.38 (27/40=0.68)	0.014 (1/40=0.025)	0.11 (8 ⁵⁾ /40=0.20)	0.056 (4/40=0.10)
	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁺	C	0.29	0.19 (26/40=0.65)	0.095 (13/40=0.33)	<0.0073 (0/40<0.025)	0.0073 (1 ⁶⁾ /40=0.025)
<i>rad51</i>	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁻	B	11	1.6 (8/55=0.15)	<0.19 (0/55=<0.018)	8.8 (45/55=0.82)	0.39 (2/55=0.036)
	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁺	C	2.9	0.18 (3/50=0.060)	2.7 (46/50=0.92)	0.058 (1/50=0.020)	<0.058 (0/50<0.020)
<i>rad50</i>	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁻	B	73	45 (31/50=0.62)	1.5 (1/50=0.02)	18 (12/50=0.24)	8.8 (6 ⁷⁾ /50=0.12)
	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁺	C	4.6	2.8 (30/50=0.60)	0.65 (7/50=0.14)	0.93 (10/50=0.20)	0.28 (3/50=0.060)

5-FOA耐性Leu⁺Ade⁻頻度もしくは5-FOA耐性Leu⁺Ade⁺頻度に検出クローン数 / 解析クローン数より算出した割合を乗じ、第III染色体のコピー数と異常染色体のサイズに基づいたLOHクロンの分類を行った。解析に供したクローンは、各欠損株とも4~5の独立した実験区からランダムに回収した。5-FOA耐性Leu⁺Ade⁺の表現型を示すクローンで完全長の第III染色体を2コピー保持しているものに関しては、さらにPCR法によって*URA3* 遺伝子マーカー挿入領域の構造を解析することにより、遺伝子変換と*URA3* 遺伝子マーカー内の変異とを区別した(本稿II-8-4)。*URA3* 遺伝子マーカー内の変異として分類されたクローン数は以下の通りである。野生株; 98クローン中2クローン、*rad52* 欠損株; 26クローン中22クローン、*rad51* 欠損株; 3クローン全て、*rad50* 欠損株; 未検出。これらのイベントの頻度は表III-6と表III-7にまとめた。

- 1) 野生株二倍体 (RD301) のデータはHiraokaらの研究によるものである (Hiraoka et al. 2000)。
- 2) 完全長第III染色体のコピー数 および サイズ異常を生じた第III染色体コピー数はPFGEとサザンブロッティング法により解析した。
- 3) *MAT-HMR* 間の欠失はPCR法により検出した (本稿II-8-6、III-1-6を参照)。
- 4) *MAT-HMR* 間の欠失以外の異常染色体のことを示す。

- 5) 8クローン中1クローンの異常染色体に関しては、第III染色体のセントロメアは存在せず、テロメアを含む左腕の一部のみを保持していることが判明した。LOH解析系では、第III染色体のセントロメアを保持しているものを異常染色体として定義している。この1クローンの異常染色体は定義からはずれているため、表III-4や表III-7からは除外した。同様の異常染色体はUmezuらの研究でも検出されている (Umezu et al. 2002)。
- 6) このクローンの第III染色体上には点突然変異を生じた*URA3* 遺伝子マーカが存在していた (*URA3* 遺伝子ORF開始点より260番目のATがCGに塩基置換を生じていた)。従って、このLOHイベントは*URA3* 内変異として分類した。
- 7) 8クローン中1クローンは、完全長の第III染色体が1コピーにもかかわらず*LEU2* および *leu2* 遺伝子座の双方を保持していたため、LOHイベントを決定することが出来なかった。従って、表III-7にはこのクローンは含めなかった。



図III-6 相同組換え関連遺伝子の欠損が各 LOH イベントに及ぼす影響

このグラフは野生株に対する各LOHイベントの増加・減少を示している。バーの上の数字は頻度比を、NDは未検出であることを表している。

例えばrad52 欠損株の場合、野生株に対して染色体喪失の頻度は49倍に上昇し、交叉の頻度は10%まで低下したことを示している。

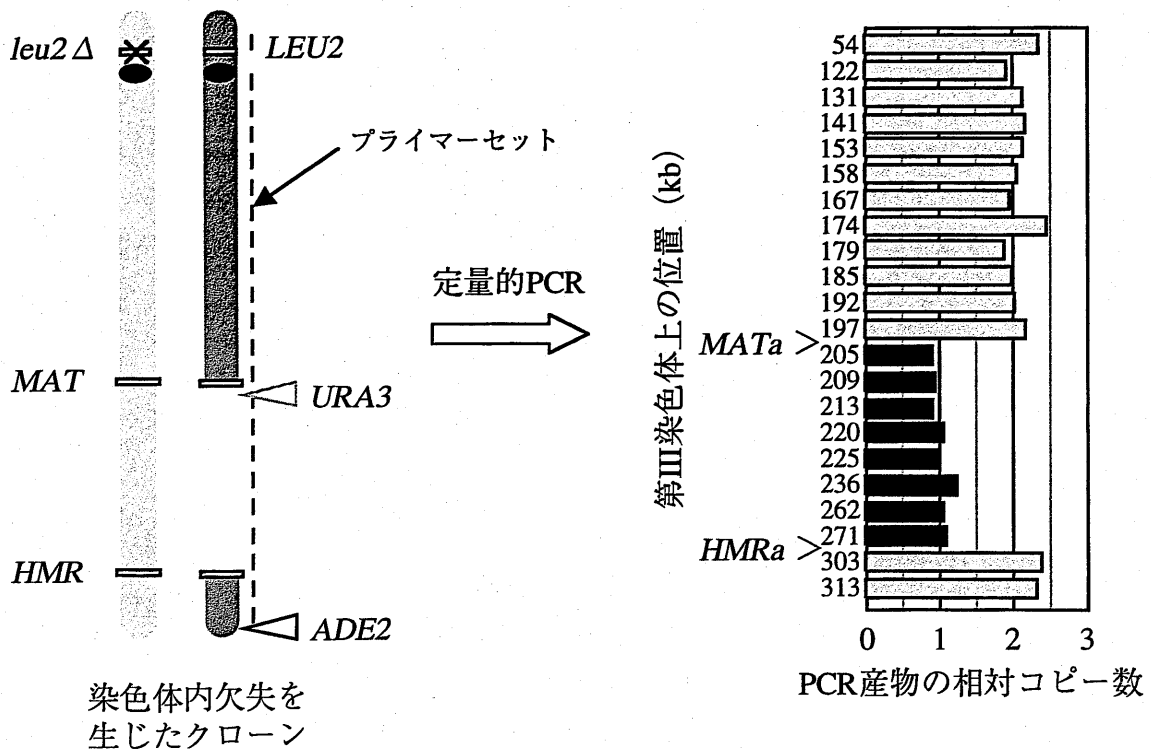
メア側に設計したプライマーと*HMRa* のテロメア側に設計したプライマーを用いてPCRを行うと、この種の欠失を生じたクローンでは3.0 kbのPCR産物が検出される。*MAT-HMR* 間の欠失を生じていないクローンでは、これらのプライマーの位置は80kb以上離れていることから、この様なPCR産物が検出されることはありえない。クラスCから40クローンを単離し、PFGEとサザンプロットングによって第III染色体の状態を調査した結果、第III染色体の長さが短くなったものは13クローンあり（表III-3）、PFGEによる解析からこれらは全て-80 kbのサイズ変化を生じた第III染色体を保持していることが示された。さらに、PCR法による解析の結果、これらのクローンは全て野生株と同様に*MATa* と*HMRa* 間の染色体内欠失を生じていることが判明した。転座や不等交叉に関しては、野生株ではゲノム中に散在するレトロトランスポゾンTy1の相同性を利用して生じていることが判明している（平岡 2000年博士論文；Umezumi et al. 2002）。本研究に用いている株の第III染色体上には、5つのTy1因子と1つのTy2因子が存在している（図I-3）。Ty1とTy2はいずれも全長が5.9 kbあり、両端に0.3 kbのLTR配列を有している。クラスBでは転座・不等交叉によって第III染色体のサイズ変化を生じたものが全部で8クローンあり（表III-3）、それらに検出された異常染色体の解析結果を表III-4に示した。クローン#151と#328、#146の第III染色体はそれぞれ-60 kb、+370 kbのサイズ変化を生じていたが、これらと同様のサイズ変化は野生株でも検出されており染色体再編の相手や融合部が既に同定済みである（平岡 2000年博士論文；Umezumi et al. 2002）。そこで、これらのクローンに関しては、野生株での情報を元に融合部を挟んだPCRを試みた。その結果、クローン#151と#328は、第III染色体右腕のTy1-4から右腕テロメアまでの染色体断片が、第III染色体左腕のTy1-1から左腕テロメアまでの断片に置き換わる転座を生じていること、また、クローン#146は第III染色体右腕のTy1-2と第VII染色体上のTy1-1を介した転座を生じていることが判明した。また、クローン#342は80 kb短くなった第III染色体を持っていたことから、*MATa* と*HMRa* を介した相同染色体間の組換え、すなわち不等交叉を生じているのではないかと予想した。染色体内欠失の時と同様にPCR法で解析を行った所、予想通り融合部がPCR法により増幅された。この様な*MATa* と*HMRa* を介した不等交叉は野生株では検出されていない。

転座・不等交叉に分類されたクラスBの残りの4クローンは、野生株のデータを元にPCRを行っても産物が得られないか（クローン#145、#152）、野生株では見いだされなかったサイズ変化を生じていた（クローン#153、#154）。これら4クローンの異常染色体の構造解析にはゲノムスキニング法と呼ばれる方法を用いた。ゲノムスキニング法は当研究室の森により確立された手法で（森 1998年修士論文；平岡 2000年博士論文；Umezumi et al. 2002）、第III染色体上に設計された22箇所のプライマーセットで定量的なPCRを行うことでその領域のコピー数を決定し、欠失あるいは増幅の生じた領域を同定することが可能である（図III-7）。ゲノムスキニング

表III-4 *rad52* 欠損株に生じた異常染色体

クローン名	サイズ変化 (kb) PFGE/マップ ¹⁾	再編の種類	検出クローン数 (検出実験区数)	再編に関与した 因子 ²⁾
#151、#328	-60/-72	転座	2 (2)	Ty1-4、Ty1-1
#146	+370/+380	転座	1 (1)	Ty1-2、(VII) Ty1-1
#342	-80/-94	不等交叉	1 (1)	<i>MAT</i> 、 <i>HMR</i>
#145、#152	-50/-64	転座	2 (1)	Ty1-4、Ty2
#153、#154	+1200—+2200 /~+2000	転座	2 (1)	III-204 異常染色体 XII-368 ATGAATTAAGGCGCTATAGCCC ATGAATTAAGGCGTCCCCTGTGG CTAAATCATCGGCGTCCCCTGTGG

- 1) 完全長の第III染色体 (330 kb) に対するサイズ変化を示した。/の前の値はPFGEで測定された異常染色体のサイズ変化を、/の後ろの値はSGDデータベースの塩基配列情報に基づいた異常染色体のサイズ変化を表している。
- 2) 再編に関与した因子を示した。第III以外の染色体上に存在するTy1因子に関しては () 内に染色体の番号を記した。クローン#153と#154に関しては再編に関与した塩基配列を示した。異常染色体融合部周辺の配列を中段に示し、その上下にそれぞれIII-204領域とXII368領域の配列を示した。異常染色体融合部の相同配列4 bpを太字で示した (GGCG)。



図III-7 ゲノムスキャニング法による異常染色体融合部の同定

第III染色体上に設計された22箇所のプライマーセットでPCRを行ってそのコピー数を決定し、欠失・増幅領域を同定する。PCR産物の相対コピー数の変化する境界領域から、染色体の融合に寄与する因子を絞り込むことが可能である。

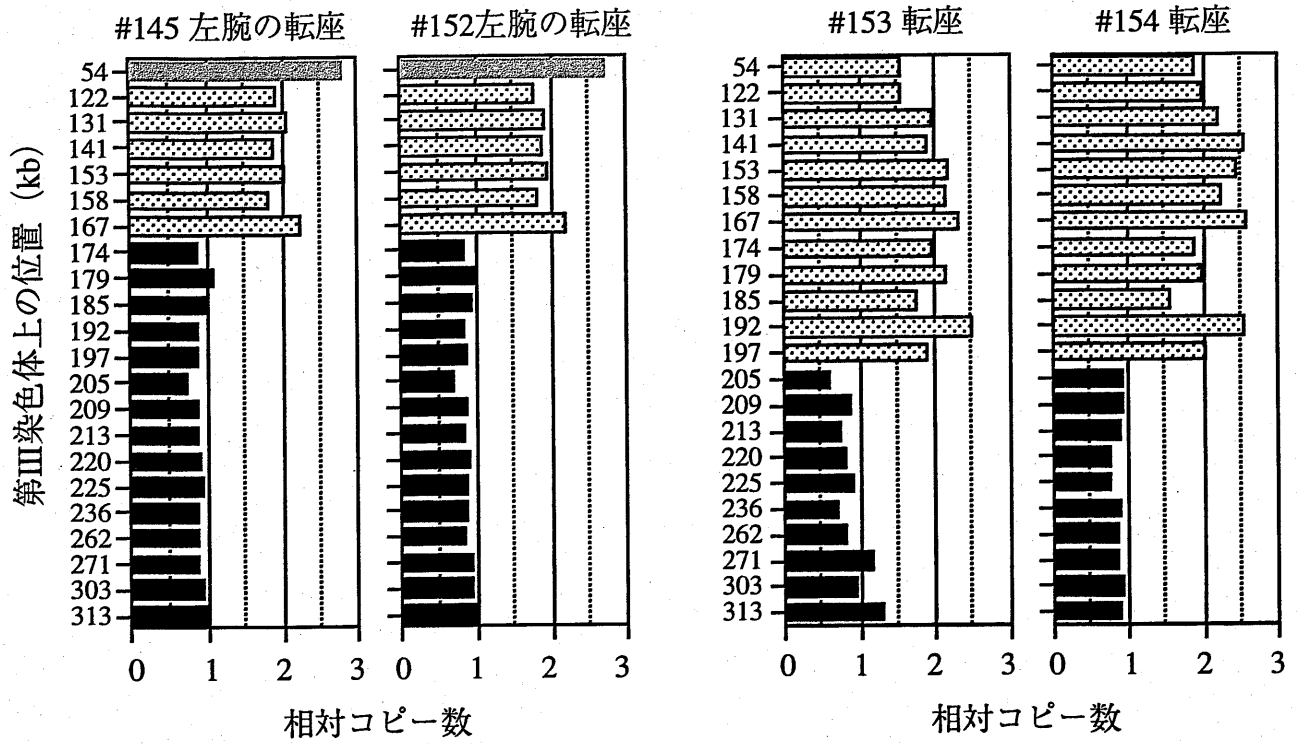
に用いるプライマーは蛍光ラベルしてあり、PCR産物量を指標として定量的にコピー数を決定することができる。LOHを生じていない親株では理論上全ての領域が2コピー分検出される。LOHを生じたクローンでは、コピー数の変化する境界領域から染色体再編に関与した因子を推定することができる。図III-7では、分かりやすい例として*MAT-HMR* 間の染色体欠失の場合を挙げた。*MAT-HMR* 間で欠失が生じている場合、欠失によって失われた領域、すなわち第III染色体の205 kb~271 kb領域（以下III-205~III-271領域と表記する）のPCR産物は1コピーとなる。コピー数が変化するのはIII-197~III-205領域とIII-271~III-303領域であるが、これらの領域にはそれぞれ*MATa*と*HMRa*が存在する。従って、欠失はこれらの繰り返し配列間で生じていることが推測できる訳である。このゲノムスキニング法によってクローン#145、#152、#153、#154を解析した結果を図III-8 Aに示した。

まず、クローン#145と#152に関しては、いずれもIII-54が3コピー、III-122~III-167が2コピー、III-174から左腕末端までが1コピーのパターンを示した（図III-8 A）。このパターンは前述のクローン#151、#328と同じ様に第III染色体の左腕に右腕の一部が転座していることを示している。コピー数が変化する領域には、右腕-左腕間の転座に寄与する可能性のある因子としてIII-54~III-122の間にTy1-1、Ty2、いくつかのLTR配列が、また、III-167~III-174の間にTy1-4が存在している（図1-3）。転座の融合部を決定するため色々プライマーの組み合わせを変えてPCRを行った結果、Ty2内に設計したプライマー（d3W84-2）とTy1-4外側のセントロメア側に設計したプライマー（d3W168）との間でPCR産物が検出された（図III-9）。一方で、Ty1-4内に設計したプライマー（dTF150.3）とTy2外側の左腕テロメア側に設計したプライマー（d3W84）の間ではPCR産物は得られなかった。Ty1-4とTy2の配列をアライメントにかけると、LTRを含めた約1 kbの領域に98%という非常に高い相同性が認められる。これらの結果より、クローン#145と#152の転座は左腕Ty1-4と右腕Ty2の約1 kbの相同性を利用して生じていることが判明した。

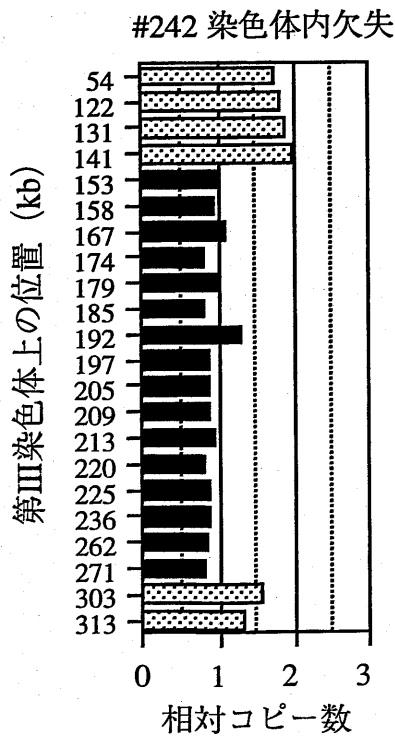
以上の様に、*rad52* 欠損株に生じる転座や不等交叉の大部分は野生株で観られるものと同じ、繰り返し配列の相同性を介したものであった。ゆえに、出芽酵母には*RAD52* 遺伝子に依存しないマイナーな相同組換え経路が存在することが判明した。*rad50 rad52* および*rad51 rad52* 二重欠損株におけるクラスBとクラスCの頻度は*rad52* 単独欠損株以下にはならなかったことから、*RAD52* 遺伝子に非依存的な相同組換えには*RAD50* 遺伝子や*RAD51* 遺伝子は寄与していない様である。

一方で、*rad52* 欠損株では以下に述べる様に相同性を介さない染色体再編も見い出された。同じ実験区由来のクローン#153と#154は、いずれもIII-197~III-205の間から右腕末端までが1コピーと、別の染色体との転座を示唆するパターンを示した（図III-8 A）。興味深いことに、コピー数が変化するIII-197~III-205の間にはTy因子やLTRなどの繰り返し配列は存在しない（図III-10）。このため、当初は繰り返し配列

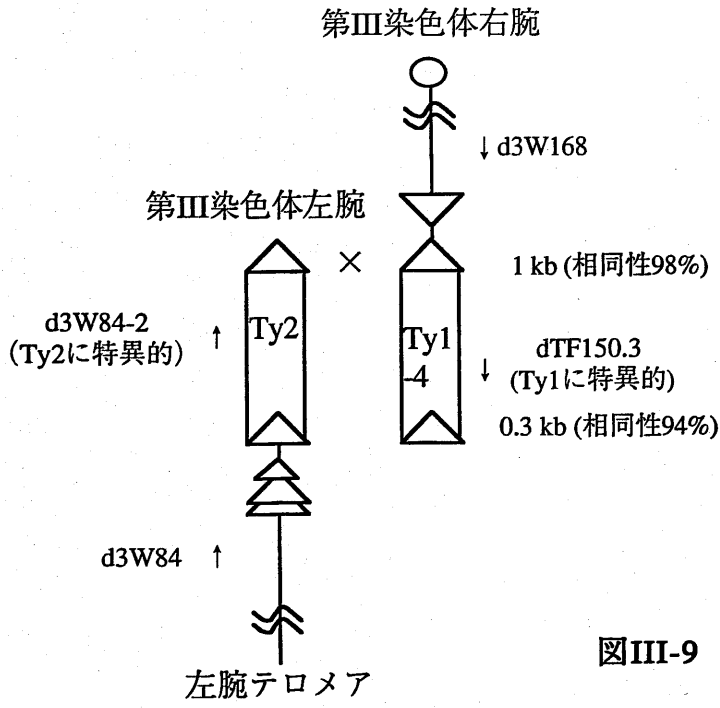
A *rad52* 欠損株に生じた異常染色体



B *rad51* 欠損株に生じた異常染色体

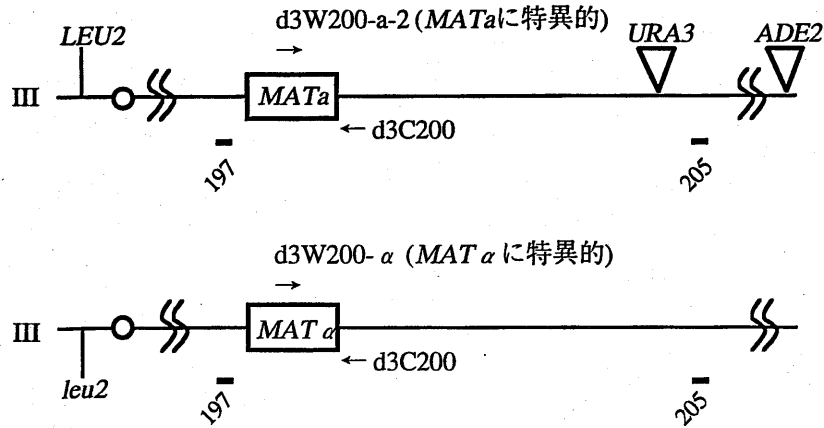


図III-8 ゲノムスキニング法による解析結果



図III-9 Ty2とTy1-4の構造

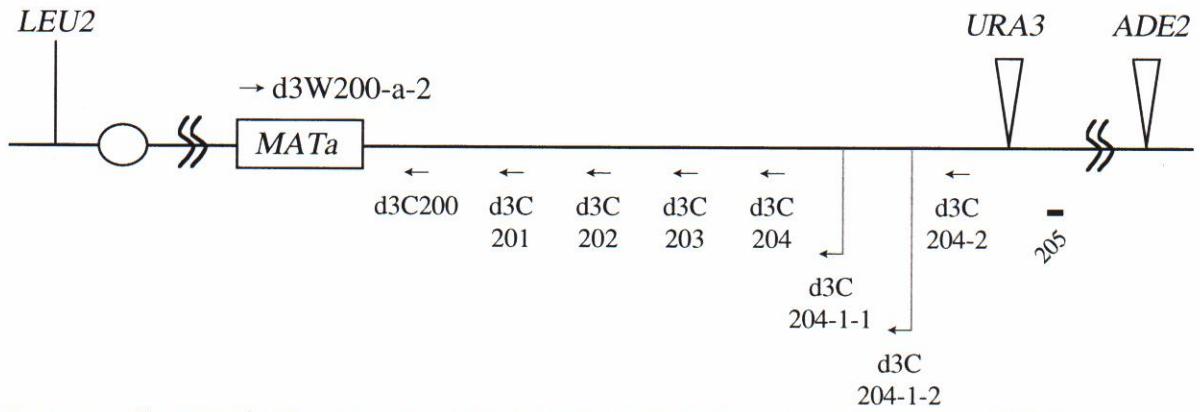
第III染色体の配列を細い縦線、セントロメアを白丸、LTR配列を白三角、Ty因子を白三角と白四角、プライマーを矢印で表した。クローン#145と#152では、d3W84-2とd3W168をプライマーとして用いた時にPCR産物が検出されることから、Ty2とTy1-4の約1 kbの相同性を利用した右腕-左腕間の転座が起きていることが判明した。



図III-10 第III染色体 III-197～III205付近の構造 (親株二倍体)

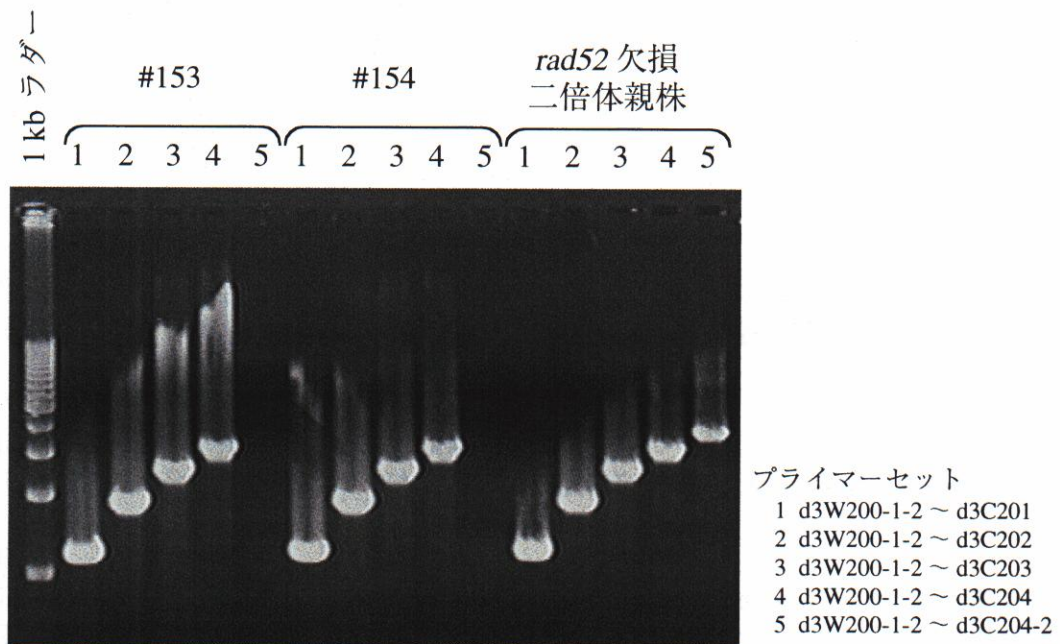
第III染色体の配列を横線、セントロメアを白丸、プライマーを矢印、MAT遺伝子座を四角で表した。LEU2遺伝子座を細い縦線、URA3遺伝子マーカーおよびADE2遺伝子マーカーの挿入部位を三角で表した。第III染色体の下側にはゲノムスキャンに用いたプライマーセットのIII-197とIII-205のおおまかな結合位置を太い横線と数字で表した。MATaが存在する場合はd3W200-a-2とd3C200間で0.54 kbのPCR産物が、MATalphaが存在する場合にはd3W200-alphaとd3C200間で0.4 kbのPCR産物が得られる。

以外の相同性を利用して転座が生じたのではないかと考え、出芽酵母のゲノム中にこの領域と相同な部分がないかをデータベースで検索したが、長い範囲に渡る相同性が高い領域は見出せなかった。従って、この転座の発生過程には、これまでに野生株や *rad52* 欠損株で観られた様な繰り返し配列を介した相同組換えとは異なったメカニズムが関与している可能性が考えられた。III-197~III-205領域は繰り返し配列は存在しないものの、*MATa* や *URA3* 遺伝子マーカーが挿入されている場所である。従って、転座の融合部はIII-197から *URA3* 遺伝子マーカーの間のどこかに存在しているのではないかと考えた。まず手始めに、III-197よりも *URA3* 遺伝子マーカー側にある *MATa* の存在をPCR法によって確認した。*MAT* 遺伝子座は出芽酵母一倍体の性、すなわち *a*型か α 型かの決定を司る領域であり、二倍体細胞にある2本の第III染色体には、それぞれ *MATa* と *MAT α* が存在する (図III-10)。*MATa* と *MAT α* は非常に良く似た配列で構成されるが、それぞれに特異的な領域も存在するため、その領域に設計したプライマーである d3W200-a-2 および d3W200- α と、d3C200を用いることで両者の存在を確認することが可能である。PCRの結果、クローン#153、#154とも *MATa* の存在を示す0.54 kbのPCR産物と *MAT α* の存在を示す0.4 kbの2種類のPCR産物が得られたことから、これらのクローンの異常染色体には *MATa* が残されていることが示された。この *MATa* に特異的なプライマー; d3W200-a-2を利用し、さらに融合部を絞り込む作業を行った。具体的には、*MATa* からテロメア側に0.7 kbおきに逆向きのプライマーを5つ設計し、d3W200-a-2とのPCR増幅が行われるか否かを調査した (図III-11)。その結果、*MATa* から3.3 kbに設計したプライマーd3C204まではPCR増幅が可能だったが、*MATa* から4.0 kbに設計したプライマーd3C204-2ではPCR産物は得られなかった (図III-12)。同じ要領で、今度はC204からテロメア側に0.2 kbおきに2つのプライマーを設計し、PCR法によってさらなる絞り込みを行った (図III-11)。その結果、最終的に融合部はd3C204-1-1からd3C204-1-2の間、0.2 kbの領域内に存在することが判明した。次に、この融合部の塩基配列の決定を試みた。通常、塩基配列の決定を行うにはある程度のDNA量が必要であり、そのためには融合部を含む領域をPCRによって増幅しなければならない。しかし、融合部から先の配列は全く未知のものであるために逆向きのプライマーを設計することができず、通常のPCR法による増幅をいきなり行うことは望めない。そこで、RACE (Rapid amplification of cDNA ends) 法という、cDNAの未知領域をクローニングする方法を応用することにした。未知領域を含む融合部DNAを増幅する方法を図III-13に示した。この方法の概略は以下の様なものである。まず、Taqポリメラーゼによって、*MATa* 特異的なプライマーであるd3W200-a-2からテロメア方向の配列を単鎖DNAとして合成した。DNA合成は融合部を通過し未知領域に至る。この様な方法で合成した単鎖DNAの3'末端に、TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) という酵素を用いて dCTPホモポリマーを重合し、このポリマーに結合するアンカープライマー(RACE



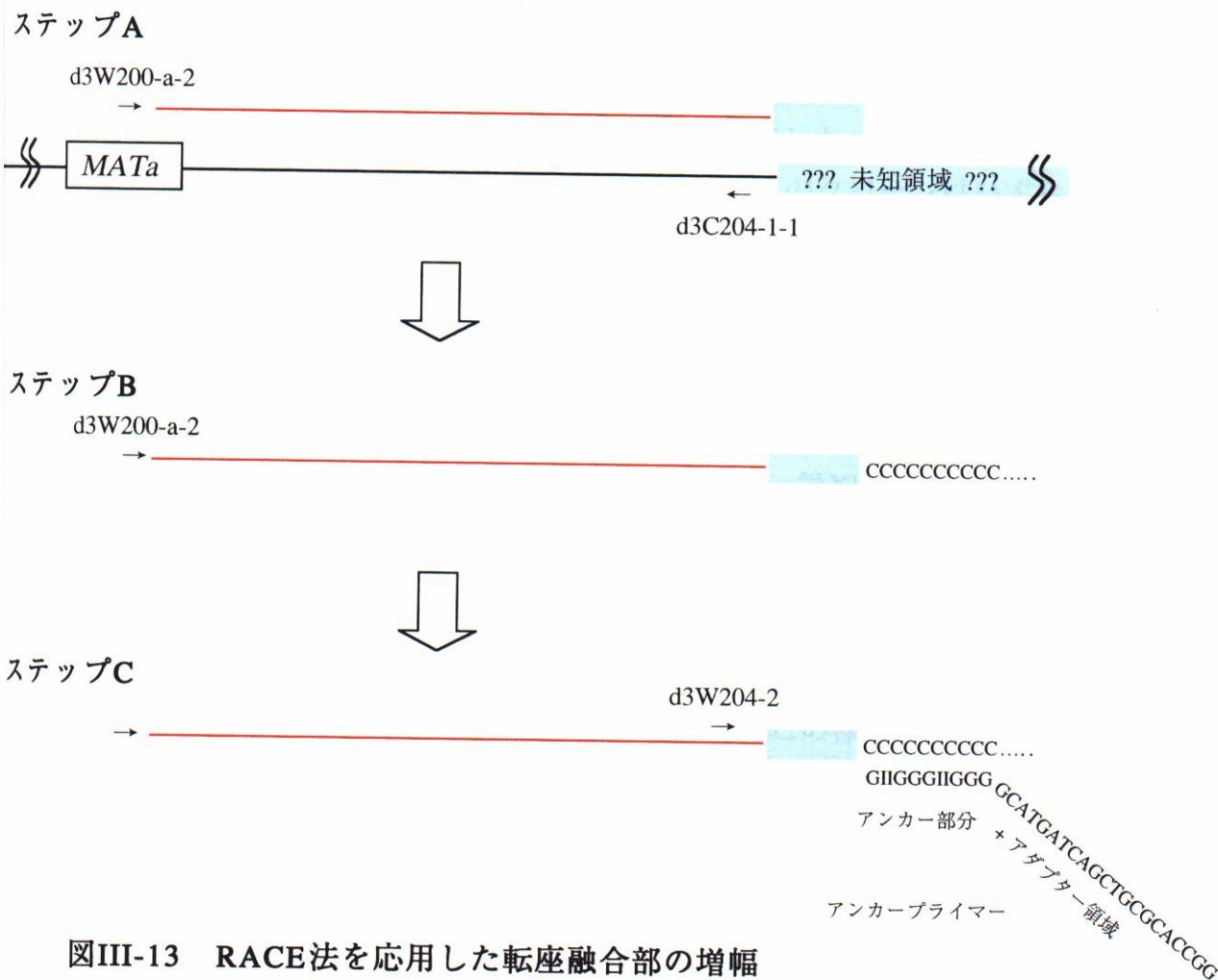
図III-11 第III染色体 III-197～III-205付近に設計したプライマーの配置

第III染色体の配列を横線、セントロメアを白丸、プライマーを矢印、*MATa* 遺伝子座を四角で表した。*LEU2* 遺伝子座を細い縦線、*URA3* 遺伝子マーカーおよび*ADE2* 遺伝子マーカーの挿入部位を三角で表した。第III染色体の下側にはゲノムスキャニングに用いたプライマーセットIII-205のおおまかな結合位置を太い横線と数字で表した。



図III-12 PCRを利用したクローン#153および#154の染色体融合部の同定

図III-11で示したプライマーを用いたPCRの結果を示した。泳動像の右隣に、PCRに用いたプライマーセットの一覧を記した。クローン#153と#154では *MATa* から3.3 kbに設計したプライマー-d3C204まではd3W200-1-2とのPCR増幅が可能だったが、*MATa* から4.0 kbに設計したプライマー-d3C204-2ではPCR産物は得られなかった。このことは、融合部がd3C204～d3C204-2の間に存在することを示している。



図III-13 RACE法を応用した転座融合部の増幅

第III染色体の配列を黒色の横線、プライマーを矢印、*MATa* 遺伝子座を四角、合成される単鎖DNAを赤色の横線、未知領域を青色の四角で表した。

ステップA

MATa に特異的なプライマー、d3W200-a-2をプライマーとし、Taqポリメラーゼによって単鎖DNAを合成する。DNA合成は融合部を通過し未知領域に至る。

ステップB

単鎖DNAの3'末端に、TdT (Terminal deoxynucleotidyl transferase) という酵素を用いてdCTPホモポリマーを重合する。

ステップC

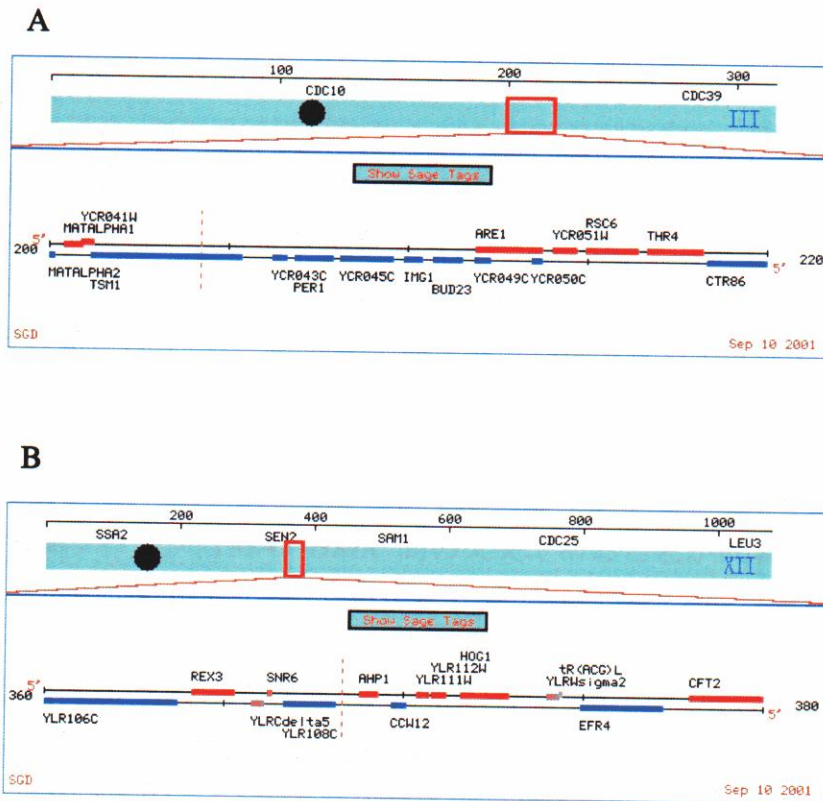
dCTPに結合するアンカープライマー (RACE adapter) と第III染色体に特異的なプライマーであるd3W204-2を用い、PCR法によって未知領域を含む融合部を増幅する。アンカープライマーのアンカー部分にI (イノシン) が挿入されているのは、 T_m 値が上がり過ぎないための配慮である。

adapter)と第III染色体に特異的なプライマーであるd3W204-2を用い、PCR法によって未知領域を含む融合部を増幅した。最終的にこのPCR産物を鋳型として用い、塩基配列の解析を行った。融合部の塩基配列を表III-4に示した。クローン#153と#154の異常染色体融合部の塩基配列を決定した結果、これらのクローンはいずれも第III染色体の204 kb領域から4 bpという非常に少ない相同配列 (GGCG) を介し、第XII染色体の368 kb領域と転座を生じていることが判明した。ゆえに、この異常染色体の形成プロセスにはNHEJ機構が関与している可能性が示唆された。第III染色体では、融合部はTSM1 (TAF1) というRNAポリメラーゼIIの転写因子 (TFIID複合体の一部) をコードする遺伝子ORF内に存在していた (図III-14 A)。一方、第XII染色体では融合部はORF以外の配列に存在していた (図III-14 B)。第XII染色体の長さは約2,500 kb前後であることが知られている。従って、第XII染色体の右腕約2,100 kbが第III染色体の右腕204 kb以降に転座し、全長約2,300 kb前後の異常染色体が形成されている計算になる。これらのクローンをサザンブロットング法で解析すると1,500 kbから2,500 kbの間に異常染色体を示すバンドが検出されることから、転座は第XII染色体との間で起きていると考えて矛盾はない。野生株ではこの様なNHEJによって生じた染色体再編は見い出されなかった (Umezu et al. 2002)。rad52 欠損株に生じたNHEJによる転座の頻度は 2.9×10^7 となるが、この頻度が野生株に対して有意に上昇しているか否かは不明である。

以上の結果をまとめると、RAD52 遺伝子に依存しない染色体再編は2種類に分類され、その大半はRAD52 遺伝子非依存的な相同組換え機構によるものであった。一方、マイナーなものとしてNHEJの様な相同性を殆ど必要としない機構も寄与していた。この様に、rad52 欠損株では、極めて頻度は低いものの相同性を介さない転座が生じていることが判明した。この転座の発生プロセスには、NHEJ機構が関与していると推測され、本来相同組換え機構が担っていた自然DNA傷害の回避のごく一部を、NHEJ機構が代替して行ったことを示唆している。NHEJの本質はDNAの末端同士のリゲーション反応であることから (Critchlow and Jackson 1998)、出芽酵母の細胞内に発生している自然DNA傷害には、DNA末端を持つ形状のもの、すなわちDouble strand breakやDouble strand endが含まれており、野生株ではこれらの自然DNA傷害が相同組換え機構によって回避されているものと推測される。

III-1-7 rad51 欠損は異所性組換えを増加させる

RAD51 遺伝子は相同組換え経路のうち、特に鎖交換反応において重要な役割を果たしている (Sung et al. 2000)。従って、この欠損株に生じる染色体再編には鎖交換反応を欠損した状況が反映されることが予想された。



図III-14 クローン#153および#154に生じた転座の融合部の位置

Aは第III染色体上での転座融合部の位置、Bは第XII染色体上での転座融合部の位置を、それぞれ赤い縦の点線で示した。第III染色体では、融合部はTSM1 (TAF1) というRNAポリメラーゼIIの転写因子 (TFIID複合体の一部) をコードする遺伝子ORF内に存在していた。一方、第XII染色体では、融合部はORF以外の配列に存在していた。

rad51 欠損株では、アリル間の組換えについては交叉の頻度が野生株の45%に減少しており（図III-6）、遺伝子変換は検出されなかった（表III-7、頻度 $<5.8 \times 10^{-7}$ ）。一方で、異所性の組換えについては上昇が観られ、転座・不等交叉の頻度が野生株の14倍に、染色体内欠失の頻度が8.7倍まで上昇していた。転座・不等交叉としては全部で45クローンが同定され（表III-3）、そのうち9クロンの異常染色体融合部を解析した。その結果、4クローンは野生株で観られたものと全く同じTy1を用いた転座であることがPCR法により判明した。また、ゲノムスキニング法で解析を行った5クロンの異常染色体に関しては、コピー数の変化する領域には全てTy1が存在することが判明した。染色体内欠失としては全部で47クローンが同定され（表III-3）、そのうち46クローンは*MAT-HMR* 間の欠失であることがPCRによって確認された。残りの1クローンに関しては、PFGEとサザンブロットィング解析を行ったところ130 kbのサイズ変化を生じた異常染色体を有していた（頻度 5.8×10^{-7} ）。野生株では、5-FOA耐性Leu⁺ Ade⁺の表現型を示す98クローン中にこの様な欠失を生じたものは見い出されなかった（表III-3、頻度 $<3.6 \times 10^{-6}$ ）。ゲノムスキニング法による解析結果から（図III-8 B）、この異常染色体のコピー数が変化する領域、III-141~III-153とIII-271~III-303にはTy1やLTRが存在することが判明した（図I-3）。最終的に融合部を決定することはできなかったが、このクローンにおける欠失の発生にはTy1やLTRなどの相同性が関与していることが考えられる。

以上の様に、*rad51* 欠損株では異所性の組換えによる染色体再編の発生頻度が上昇し、異常染色体の融合部には相同性が見い出された。従って、*RAD51* 遺伝子が関与する鎖交換反応は、この様な異所性の組換えを抑制していると考えられる。アリル間の組換えに関しては、*RAD51* 遺伝子が野生株に生じる交叉の約半分に参加していることが示唆された。遺伝子変換の頻度に関しては野生株に対しての増減は不明である。これを明らかにするためにはクラスCの解析数を増やす必要があるだろう。

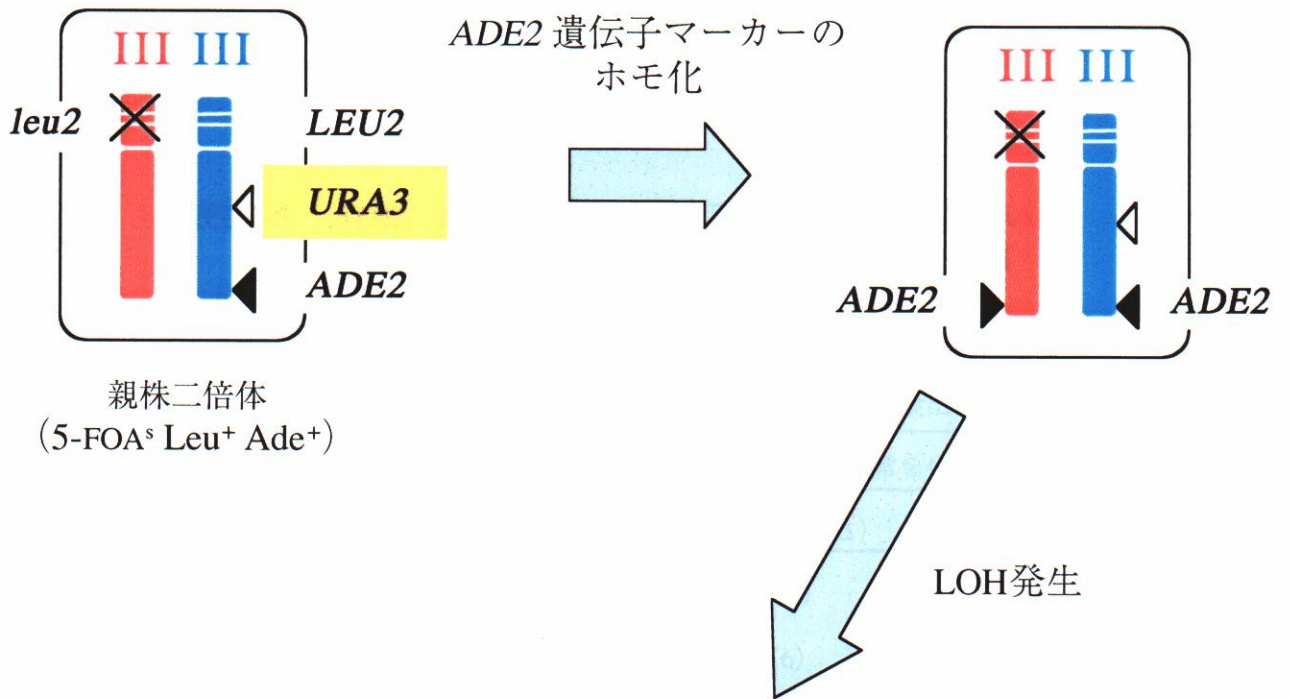
III-1-8 *rad50* 欠損はアリル間の組換えと異所性組換えの双方を増加させる


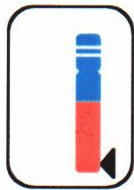
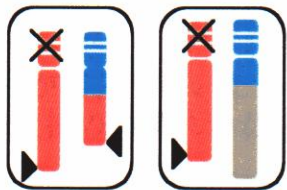
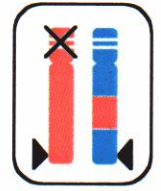
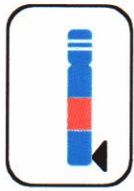

RAD50 遺伝子は、相同組換え初期過程においてDNA末端のプロセッシングに関与している他、近年の研究では姉妹染色分体同士の接着への関与が示唆されている（詳細は本稿IV-3-3に後述）。この欠損株における染色体再編にはそれらの現象を欠損した状況が反映されることが予想された。

rad50 欠損株では、以下に詳細を述べる様に*ADE2* 遺伝子マーカーがホモ化する現象が見い出されたため、その現象を考慮に入れたLOHイベントの分類を行う必要があった。野生株、*rad52* 欠損株および*rad51* 欠損株と異なり、*rad50* 欠損株ではクラスCに*MAT-HMR* 間の欠損以外のサイズ変化を生じた異常染色体をもつものが10クロー

ンも見い出された(表III-3)。しかも、これらのうちいくつかのクローンは、通常の第III染色体よりも長い異常染色体を有していた。このことから、これらの10クローンの異常染色体は染色体内欠失とは異なるメカニズムによって形成されていることが予想された。PCR法やゲノムスキニング法を用いて10クローンのうち7クローンの異常染色体を解析したところ、これらはいずれもTy1を介した転座や不等交叉を生じていることが判明した。転座や不等交叉は本来Ade^cの表現型を示すクラスBに検出されるものであり、野生株、*rad52* 欠損株および*rad51* 欠損株ではこの種のLOHイベントがクラスCで検出されることは皆無であった(表III-3)。この結果を説明する一つの仮説として、これらの10クローンでは、染色体間の組換えによるLOHが生じる前の段階で、*ADE2* 遺伝子マーカーが相同染色体に高頻度でコピーされ、+/- → +/+へとホモ化していることが考えられた(図III-15)。この点について確認するため、クラスCに分類された47クローンの*ADE2* 遺伝子マーカー挿入領域の構造をPCR法で解析した(表III-5)。この解析に用いるプライマーは*ADE2* 遺伝子マーカー挿入領域を挟む形で第III染色体上III-314領域に設計されており、*ADE2* 遺伝子マーカーが挿入されている場合には3.5 kbのPCR産物が、挿入がない場合には1.5 kbのPCR産物が検出される(図III-16)。表III-5にある様に、PCR法による解析の結果、クラスCのクローンは2つのタイプに分類された。一つは、3.5 kbのPCR産物のみが検出されるタイプである。このタイプには理論上*ADE2* 遺伝子マーカーが2コピー分あるもの(III-314::*ADE2* / III-314::*ADE2*; 図III-15のa、bの不等交叉、c、d)と1コピー分のみのもの(III-314::*ADE2* / 0; 図III-15-Aのa'、bの転座、c')が含まれている。これらのクローンでは*ADE2* 遺伝子マーカーがホモ化した後に、染色体間の組換えによってLOHが生じたものと推測される。このようなクローンを、以下*ADE2* ホモ化クローンと呼ぶ。もう一つのタイプは、1.5 kbと3.5 kbの2種類のPCR産物が検出されるタイプで、これらのクローンは図I-1にある様な、*ADE2* 遺伝子マーカーのホモ化を伴わないLOHを生じたものであると考えられる。これらを以下*ADE2* ヘテロクローンと呼ぶ。以上の様な現象が見い出されたことから、*rad50* 欠損株では*ADE2* 遺伝子マーカーのホモ化を考慮に入れた上でLOHイベントの分類を行う必要があった。

rad50 欠損株ではクラスCにおいて正常な長さの第III染色体を2コピー保持するものが30クローン検出され(表III-3)、そのうち*ADE2* ホモ化クローンが21クローンあり、その頻度は 1.9×10^{-5} であった(表III-5)。これらの21クローンは*ADE2* 遺伝子マーカーがホモ化した後に交叉か遺伝子変換の何れかのLOHイベントを生じたものと推測されるが、これらのクローンがどちらのLOHイベントによるものなのかを明確に区別することは不可能である。そこで、*ADE2* ヘテロクローンにおける交叉と遺伝子変換の頻度の割合を利用し、*ADE2* ホモ化クローンにおける交叉と遺伝子変換の頻度を算出することにした。*ADE2* ヘテロクローンにおける交叉(図I-1 B-a)と遺伝子変換(図I-1 C-b)の頻度はそれぞれ 4.5×10^{-4} (表III-3)と 8.3×10^{-6} (表III-5)であ



		パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による解析	
		第III染色体 2コピー	染色体異常あり (数・サイズの異常)
表現型による解析	5-FOA ^r Leu ⁺ Ade ⁺	 <p>a 交叉</p>	 <p>a' 交叉+ 染色体喪失</p>  <p>b 不等交叉 又は 転座</p>
	 <p>c 遺伝子変換</p>	 <p>c' 遺伝子変換 +染色体喪失</p>  <p>d 染色体内部欠失</p>	

図III-15 ADE2 遺伝子マーカーのホモ化を伴った LOH イベントの分類

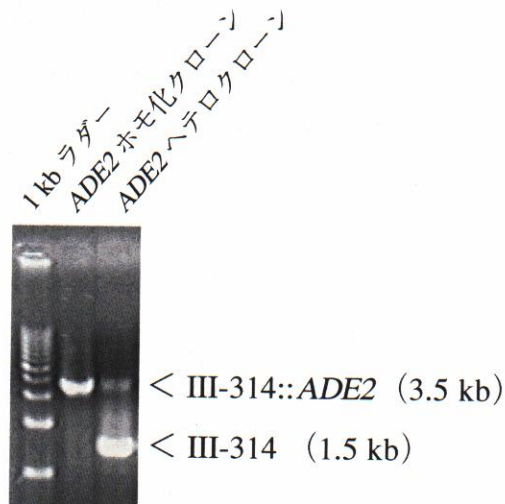
LOHが発生する前の段階でADE2 遺伝子マーカーのホモ化が生じた場合、5-FOA^r Leu⁺ Ade⁺の表現型を示すクローンには本来クラスBで検出されるLOHイベント；交叉や転座・不等交叉を生じたものが含まれる場合がある。

表III-5 *ADE2* 遺伝子マーカー挿入領域の構造に基づいた
rad50 欠損株5-FOA耐性Leu⁺Ade⁺クローンの分類

<i>ADE2</i> 遺伝子マーカー 挿入の有無 (遺伝子型) ¹⁾	頻度 x 10 ⁻⁵ (検出クローン数)		
	完全長第III染色体コピー数: サイズ異常を生じた第III染色体コピー数 ³⁾		
	2:0 ³⁾	1:1 (<i>MAT-HMR</i> Δ)	1:≥1 (non <i>MAT-HMR</i> Δ)
+ (<i>ADE2/ADE2</i> or <i>ADE2/0</i>)	1.9 (21)	0.093 (1)	0.93 (10)
+/- (<i>ADE2/III-314</i>)	0.83 (9)	0.56 (6)	<0.093 (ND)
合計	2.8 (30)	0.65 (7)	0.93 (10)

NDは未検出であることを示している。

- 1) *ADE2* 遺伝子マーカーが挿入されているIII-314領域の遺伝子型は、PCR解析によって分類した (図III-16)。
- 2) この分類は、表III-3と同様のものである。
- 3) これらのクローンはいずれも *URA3* 遺伝子マーカーの挿入断片が存在していないことがPCR解析により明らかになった。従って、交叉か遺伝子変換のいずれかが生じているものと考えられる。



図III-16 PCR法による*ADE2* 遺伝子マーカー挿入領域の構造解析

ADE2 遺伝子マーカー挿入領域の構造解析に用いるプライマーは*ADE2* 遺伝子マーカー挿入領域を挟む形で第III染色体上III-314領域に設計されており、*ADE2* 遺伝子マーカーが挿入されている場合には3.5 kbのPCR産物が、挿入がない場合には1.5 kbのPCR産物が検出される。

り、両者の合計を100%とした場合、交叉は98.2%、遺伝子変換は1.8%の割合となる。この割合を*ADE2* ホモ化クローンの頻度、 1.9×10^5 に乘じることで、*ADE2* ホモ化クローンにおける交叉および遺伝子変換頻度の算出を行った。これらの値を*ADE2* ヘテロクローンにおける交叉と遺伝子変換の頻度にそれぞれ加算し、最終的な交叉と遺伝子変換の頻度を決定した。

同様に、今度はクラスCにおいて*MAT-HMR* を介した染色体再編により-80 kbのサイズ変化を生じている7クローンに関して*ADE2* 遺伝子マーカー挿入領域の構造を解析した。その結果、7クローン中6クローンが*ADE2* ヘテロクローン、残り1クローンが*ADE2* ホモ化クローンであり、それらの頻度はそれぞれ 5.6×10^6 と 9.3×10^7 (表III-5)であった。*ADE2* ヘテロクローンは*MAT-HMR* 間の染色体内欠失に分類されるが、*ADE2* ホモ化クローンに関しては*MAT-HMR* 間の染色体内欠失か、*MAT-HMR* を介した不等交叉なのか判別不能である。*rad50* 欠損株ではクラスBに*MAT-HMR* を介した不等交叉 (*ADE2* ヘテロクローン) が1クローン検出されており、その頻度は 1.5×10^5 であった (表III-3)。これらの頻度を用いて*ADE2* ホモ化クローンにおける染色体内欠失と不等交叉の割合を算出し、交叉や遺伝子変換の時と同様の要領で最終的な頻度を決定した。

一方、*MAT-HMR* 以外の場所で染色体再編を生じたクラスCの10クローンに関しては、全てが*ADE2* ホモ化クローンであることが判明した (表III-5)。従って、これまでに述べてきた交叉、遺伝子変換、*MAT-HMR* を介した染色体再編の場合と異なり、これらの10クローンは全て転座や不等交叉として分類し、クラスBで求めた転座・不等交叉の頻度 (表III-3) に加算した。

また、*rad50* 欠損株ではクラスCにおいて正常な長さの第III染色体を1コピー保持するものが3クローン検出され、その頻度は 2.8×10^6 であった (表III-3)。このクローンの発生メカニズムには、「染色体喪失を伴った遺伝子変換」と、*ADE2* 遺伝子マーカーのホモ化を生じた「染色体喪失を伴った交叉」の双方が関与している可能性がある (図III-15-Aのa', c')。それらの頻度の算出には、*ADE2* ヘテロクローンにおける遺伝子変換の頻度と*ADE2* ホモ化クローンにおける交叉の頻度の割合を利用した。

以上に述べてきた様に、*ADE2* 遺伝子マーカーがホモ化することを考慮に入れた上で*rad50* 欠損株に生じたLOHイベントを表III-7にまとめ、野生株と比較した (図III-6)。アレル間の組換えに関しては交叉の頻度が野生株の13倍、遺伝子変換の頻度が30倍に上昇しており、また、異所性の組換えについても転座・不等交叉の頻度が32倍に上昇していた。転座・不等交叉を生じたものはクラスBで13クローンが同定され (表III-3)、そのうち8クローンの異常染色体融合部を解析した。その結果、3クローンは野生株で観られたものと全く同じTy1を用いた転座であること、1クローンは*rad52* 欠損株でも観られた様な*MAT-HMR* を介した不等交叉であることがPCR法に

より判明した。また、ゲノムスキニング法で解析を行った4クローンの異常染色体に関しては、コピー数の変化する領域には全てTy1が存在することが判明した。*MAT-HMR* 間の染色体内欠失の頻度に関しては野生株の1.9倍と、あまり大きな変化は観られなかった。

この様に、*rad50* 欠損株では多くのタイプの染色体間組換えが上昇していた。表 III-2 Bにある様に、*rad50 rad52* 二重欠損株ではクラスB全体の頻度が 8.8×10^{-5} と *rad50* 単独欠損株の12%まで低下したことから、*rad50* 単独欠損株生じる染色体再編の大部分は*RAD52* 遺伝子の機能に依存していると考えられる。このことは、*rad50* 欠損には*RAD52* 遺伝子依存的な組換えを上昇させる効果があることを示している。また、*rad50 rad52* 二重欠損株では、クラスB全体の頻度が*rad52* 単独欠損株の16倍に上昇しており、この関係は*rad50* 単独欠損株と野生株の関係と同じであった。従って、*rad50* 欠損は、*RAD52* 遺伝子依存的な相同組換えと*RAD52* 遺伝子非依存的な相同組換えの双方を上昇させる効果があることが判明した。また、*rad50* 欠損株では*ADE2* 遺伝子マーカーのホモ化という特徴的な現象が見い出された。結果として、交叉や転座・不等交叉といった染色体間でのLOHイベントでは、約4~5%で*ADE2* 遺伝子マーカーのホモ化を生じていることが明らかとなった。このような現象は野生株では極めて低頻度に生じることが確認されているが、*rad50* 欠損株の様にLOH解析に影響を及ぼすものではなかった。また、当研究室の安島による研究では、*sgs1* 欠損株においても*ADE2* 遺伝子マーカーのホモ化が生じることが明らかとなっている（安島 2001年修士論文；Ajima et al. 2002）。*sgs1* 欠損株も*rad50* 欠損株と同様“hyper-rec”と呼ばれる各種組換えが上昇する表現型を示すことから、*ADE2* 遺伝子マーカーのホモ化は組換えが上昇する株に普遍的に起こる現象であると考えられる。後述する*rad18* 欠損株のLOH解析においても、組換えの上昇と共に*ADE2* 遺伝子マーカーのホモ化が見い出されている。

III-1-9 *rad52* および *rad51* 欠損株では点突然変異の発生が上昇する

図III-6にある様に、*rad52* 欠損株と*rad51* 欠損株では、*URA3* 遺伝子マーカー内に生じる点突然変異の頻度が野生株に対し約25倍上昇していた。*rad52* 欠損株ではこの種の変異を生じたものが23クローン、*rad51* 欠損株では3クローン見いだされた(表III-6)。この変異の実体を掴むため、これらのクローンの*URA3* 遺伝子マーカー部位をPCR増幅し、塩基配列決定を行った。当初、これらの変異はNHEJなどの機構によってもたらされた微少な塩基の欠失や挿入ではないかと予想していたが、解析結果はその予想を覆すものであった。*rad52* 欠損株では19クローンが塩基置換を生じたものの、4クローンが-1のフレームシフトを生じたものであり、*rad51* 欠損株の3クローンは全て塩基置換を生じていることが判明した(表III-6)。*rad52* 欠損株では特にG:Cペアでの塩基置換変異が多い傾向が見受けられた。これらの変異は*URA3* 遺伝子のORF全体に渡って分散して検出され、特に変異のホットスポットは認められなかった(図III-17)。さらに、*rad52* 欠損株では同一クローン内に2箇所の塩基置換が同時に生じているものが3クローン検出され、しかも2箇所の塩基置換の距離は1~15 bp離れているだけと非常に近い位置で発生していた(図III-17)。野生株では、点突然変異はG:C→T:Aの塩基置換がクラスCの98クローン中2クローンから検出されたのみであり、しかもこれらは同一実験区から検出され*URA3* 遺伝子ORF内における変異の位置も一緒だった。このことから、この2クローンの起源は同じクローンであると考えられる。*rad50* 欠損株では点突然変異は検出されなかった。

以上の結果をまとめると、*rad52* 欠損株と*rad51* 欠損株では、*URA3* 遺伝子マーカー内に生じる点突然変異の頻度が大きく上昇し、その変異の実体は主に塩基置換であることが明かとなった。このことから、相同組換え経路、とりわけ*RAD51* 遺伝子が関与する鎖交換型の組換え経路が不活化したために、本来この経路が行っていた自然DNA傷害の回避が何らかの別の代替経路にスイッチされ、その結果として塩基置換が発生したことが示唆される。一般的に塩基置換を発生させるメカニズムとしては、DNA上の損傷部位に無理矢理塩基を挿入してDNA合成を行う損傷乗り越えDNA合成が知られている。従って、代替経路の実体はこの損傷乗り越えDNA合成ではないかと推測される。損傷乗り越えDNA合成の基質は主にDaughter Strand Gapと呼ばれるギャップ構造であることから、出芽酵母の細胞内にはこの種の自然DNA傷害が発生しており、野生株ではこれらは相同組換え機構により回避されていることが推測される。

表III-6 *URA3* 遺伝子マーカー内に生じた変異

株	頻度 $\times 10^{-5}$ (fold x)	検出変異数 (検出クローン数)	塩基置換					-1 フレームシフト
			GC→AT	AT→TA	AT→CG	GC→TA	GC→CG	
野生株 ¹⁾	0.0071 (1)	2 (2)	0	0	0	2	0	0
<i>rad52</i>	0.17 (24)	26 (23)	9	4	3	5	1	4
<i>rad51</i>	0.18 (25)	3 (3)	0	1	0	1	1	0
<i>rad50</i>	<0.093 (<13)	ND	-	-	-	-	-	-

NDは未検出であることを示している。

1) 野生株二倍体 (RD301) のデータはHiraokaらの研究によるものである (Hiraoka et al. 2000)。

5' - GGCATCAGAG CAGATTGTAC TGAGAGTGCA CCATACCACA GCTTTTCAAT TCAATTCATC ATTTTTTTTT TATTCTTTT TTTGATTCG GTTCTTTGA -166

AATTTTTTTG ATTCGGTAAT CTCCGAACAG AAGGAAGAAC GAAGGAAGGA GCACAGACTT AGATTGGTAT ATATACGCAT ATGTAGTGTT GAAGAAACAT -66

GAAATTGCC AGTATTCTTA ACCCAACTGC ACAGAACAAA AACCTGCAGG AAACGAAGAT AAATCAIGTC GAAAGCTACA TATAAGGAAC GTGCTGCTAC 35

TCATCCTAGT CCTGTTGCTG CCAAGCTATT TAATATCATG CACGAAAAGC AAAA^TAACTT GTGTGCTTCA ^ATTGGATGTTT GTACCACCAA GGAATTACTG 135

GAGTAGTTG AAGCATTAGG TCCCAAAATT TGTTACTAA AAACACATGT GGATATCTTG ACTGATTTTT CCATGGAGGG CACAGTTAAG CCGCTAAAGG 235

CATTATCCGC CAAGTACAAT TTTTACTCT TCGAAGACAG AAAA^TTTGCT GACATTGGTA ^AATACAGTCAA ATTGCAGTAC TCTGCGGGTG TATACAGAAT 335

AGCAGAATGG GCAGACATTA CGAATGCACA CGGTGTGGTG GGCCCAAGTA TTGTTAGCGG TTTGAAGCAG GCGGCAGAAG AAGTAACAAA GGAACCTAGA 435

GGCCTTTTGA TGTTAGCAGA ATTGTCATGC AAGGGCTCCC TATCTACTGG AGAATATACT AAGGGTACTG TTGACATTGC GAAGAGCGAC AAAGATTTTG 535

TTATCGGCTT TATTGCTCAA AGAGACATGG GTGGAAGAGA TGAAGGTTAC GATTGGTTGA TTATGACACC ^ACGGTGTGGGT TTAGATGACA AGGGAGACGC 635

ATTGGGTCAA CAGTATAGAA CCGTGGATGA TGTGGTCTCT ACAGGATCTG ACATTATTAT TGTTGGAAGA GGA^TCTATTGG CAAAGGGAAG GGATGCTAAG 735

GTAGAGGGTG AACGTTACAG AAAAGCAGGC TGGGAAGCAT ATTTGAGAAG ATGCGGCCAG CAAAAC^TAAA AAACTGTATT ATAAGTAAAT GCATGTATAC 835

TAAACTCACA AATTAGAGCT TCAATTTAAT TATATCAGTT ATTACCCTAT GCGGTGTGAA ATACCCGCACA GATGCGTAAG -3' 935

図III-17 URA3 遺伝子マーカー内に生じた変異の分布

URA3 遺伝子マーカー配列を黒色で示し、その下に rad51 欠損株に生じた変異を青色で、rad52 欠損株に生じた変異を赤色で示した。塩基置換変異には塩基を、一塩基欠失によるフレームシフト変異の場合は Δ で示した。塩基や Δ の数は、検出された変異の数に相当する。また、URA3 遺伝子 ORF の開始コドンと停止コドンには下線をつけた。図の右側に表示した数字は、開始コドンの最初の塩基を 1 とした場合の距離 (bp) を表している。

N—N 同一クローン内に検出された変異
 同一実験区由来の変異

相同組換え欠損株を用いた解析結果において得られた大きな知見の一つは、相同組換え機構を不活化することによって、間接的ではあるがLOH頻度の上昇という形で自然DNA傷害の存在を明らかにできたことである。野生株では、相同組換え機構による自然DNA傷害の回避の大部分は姉妹染色分体間の組換えによってエラーフリーに行われ、回避プロセスのごく一部がLOHという形で検出されているのではないかと考えられる。相同組換えが全般的に低下する*rad52* 欠損株では点突然変異が上昇し、さらに相同性を介さない転座が検出された。このことは、相同組換え機構が利用できない状況下では、損傷乗り越えDNA合成やNHEJが相同組換えの代替経路として利用されることを示唆している。損傷乗り越えDNA合成の基質であるDaughter strand gap、NHEJの基質であるDouble strand breakもしくはDouble strand endは、いずれも相同組換えの基質ともなり得ることが知られている。従って、損傷乗り越えDNA合成とNHEJは、それぞれ相同組換えと相互に補完して作用していることが推測される。では、損傷乗り越えDNA合成やNHEJは自然DNA傷害の回避に寄与するのだろうか？野生株において相同組換えによるエラーフリーな回避が見い出されなかったのと同じ様に、野生株や相同組換え欠損株において、損傷乗り越えDNA合成やNHEJによるエラーフリーな回避が見逃されている可能性がある。この可能性を確かめるために、本研究ではIII-2で複製後修復機構の欠損がLOHに及ぼす影響を、III-3でNHEJ機構の欠損がLOHに及ぼす影響を調べた。

表III-7 相同組換え関連遺伝子欠損株に生じた各 LOHイベントのまとめ

LOHイベント	頻度 $\times 10^{-5}$ (fold x) ¹⁾ [%] ²⁾			
	野生株 ³⁾	<i>rad52</i>	<i>rad51</i>	<i>rad50</i>
染色体喪失	5.8 (1) [56]	331 (49) [99.7]	231 (34) [94]	284 (42) [79]
相同染色体間の組換え ⁴⁾ 交叉 ⁵⁾	4.3 (1) [34]	0.44 (0.10) [0.13]	1.94 (0.45) [0.79]	55 (13) [15]
(+染色体喪失)	0.25 (1) [2.1]	0.056 (0.22) [0.017]	0.39 (1.6) [0.16]	7.5 (30) [2.1]
遺伝子変換	0.032 (1) [0.27]	0.029 (0.91) [0.0088]	<0.058 (<1.8) [-]	0.95 (30) [0.26]
(+染色体喪失)	<0.0036 (1) [-]	<0.0073 (-) [-]	<0.058 (-) [-]	0.084 (>23) [0.023]
異所性の組換え 転座・不等交叉	0.63 (1) [5.5]	0.11 (0.17) [0.034]	8.8 (14) [3.6]	20 (32) [5.5]
染色体内欠失 <i>MAT-HMR</i> Δ	0.31 (1) [2.6]	0.095 (0.31) [0.029]	2.7 (8.7) [1.1]	0.58 (1.9) [0.16]
それ以外の欠失	<0.0036 (1) [-]	<0.071 (-) [-]	0.058 (>16) [0.024]	<0.093 (-) [-]
<i>URA3</i> 内変異	0.0071 (1) [0.06]	0.17 (24) [0.051]	0.18 (25) [0.071]	<0.093 (<13) [-]
合計	12 (1) [100]	332 (28) [100]	245 (20) [100]	362 (30) [100]

1) () 内の数値は、野生株に対する頻度比を示している。

2) []内の数値は、各株毎のLOH頻度の総計における割合を示している。

3) 野生株二倍体 (RD301) のデータはHiraokaらの研究によるものである (Hiraoka et al. 2000)。

4) *rad50* 欠損株の頻度に関しては、*ADE2* 遺伝子マーカーのホモ化を考慮して補正を行った。

5) ここでの交叉の頻度は、通常の「交叉」(図I-1 B-a)の頻度と「交叉+染色体喪失」(図I-1 B-a')の頻度の総計である。遺伝子変換の場合も同様である。

III-2 複製後修復欠損株の解析

相同組換え関連遺伝子の欠損株におけるLOH解析の結果、*rad51* 欠損株および *rad52* 欠損株において *URA3* 遺伝子マーカー内の点突然変異が大きく上昇したことから、細胞内に発生する自然DNA傷害の回避プロセスには損傷乗り越えDNA合成の機構が関与している可能性が示唆された。損傷乗り越えDNA合成は複製後修復と呼ばれる機構の一部に含まれることが知られている。近年の研究から、複製後修復は *RAD6-RAD18* 遺伝子によって制御され、その下流に *RAD5*、*RAD30* および *REV3* それぞれの遺伝子が関与する複数の経路が存在することが報告されている (図I-6)。*RAD6-RAD18*、*RAD5* 遺伝子はユビキチン結合を介した蛋白質分解によって複製後修復に関与していると考えられているが、その分子機構の詳細は明らかになっていない。また、*RAD30* 遺伝子は損傷乗り越え型DNAポリメラーゼ *pol η* をコードし、*REV3* 遺伝子はやはり損傷乗り越え型DNAポリメラーゼである *pol ζ* の触媒サブユニットをコードしている。本研究では、*rad18*、*rad5*、*rad30* および *rev3* の単独欠損株と、*rad18 rad52*、*rad5 rad52*、*rad30 rad52* および *rev3 rad52* の二重欠損株を作製し、これらの欠損株に生じるLOHの解析を行った。

III-2-1 複製後修復欠損がアルキル化剤感受性に及ぼす影響

本研究では複製後修復関連遺伝子の欠損株として *rad18*、*rad5*、*rad30* および *rev3* それぞれの単独欠損株を作製した (株作製の詳細についてはII-5-3、II-5-4を参照)。まず最初に、相同組換え関連遺伝子の欠損株の時と同じ様に (III-1-1)、複製後修復関連遺伝子の欠損がMMS感受性に及ぼす影響を調査した。*rad18* 欠損株と *rad5* 欠損株はMMSに比較的強い感受性を示し、*rad30* 欠損株と *rev3* 欠損株は高濃度のMMS処理にごくわずかに感受性となることが知られている (Brendel and Haynes 1973 ; Xiao et al. 2000 ; Roush et al. 1998)。まず最初に *rad18* 欠損が0.01%のMMSを含んだYPD寒天培地上での生育に及ぼす影響を調べた (図III-18)。*rad18* 単独欠損株は *rad52* 欠損株と同様に0.01%のMMSに感受性を示した。*rad18 rad52* 二重欠損株に関しては、プラスミド *pMO317* (II-4を参照) を形質転換することによって野生型 *RAD52* 遺伝子を相補した状態でも0.01%のMMSに感受性を示した。以上より、本研究で導入した *rad18* 欠損はMMSに感受性であることが判明した。また、図III-18には示していないが、当研究室の梅津が *rad5*、*rad30* および *rev3* 欠損株に関してMMS感受性の検討を行ったところ、*rad5* 欠損株は0.01%のMMSに感受性を示したが、*rad30* 欠損および *rev3* 欠損による影響は見受けられなかった。この結果は一般的に知られているこれらの欠損株に

おけるMMS感受性と一致している。

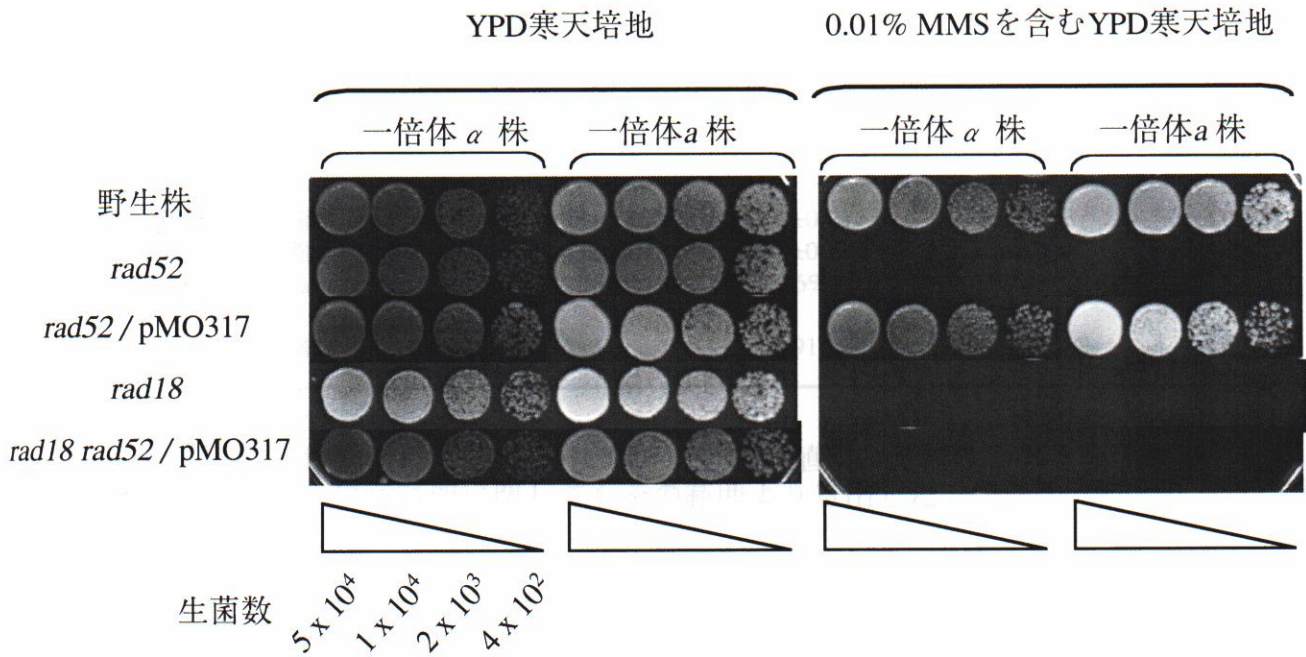
III-2-2 rad18 欠損が生育に及ぼす影響

次に、*rad18* 欠損が生育に及ぼす影響を調べるため、生菌数、ならびに細胞の出芽状況について経時的に測定を行った。具体的には、相同組換え欠損株の生育を調べた際 (II-1-2) と同様の実験を行った。生菌数をもとに作製した生育曲線を図III-19に、O.D.あたり生菌数と細胞数、ならびにそれらから算出したplating efficiencyや倍加時間を表III-8にまとめた。また、細胞周期分布の経時的变化を図III-20に示した。*rad18* 欠損が生育に及ぼす影響を調べた結果、*rad18* 欠損株、*rad52* 欠損株、*rad18 rad52* 欠損株の順で1) 野生株に対し倍加時間が遅延する (表III-8)、2) 対数増殖期においてG₂-M期の細胞と形態異常を示す細胞の割合が増大し (図III-20)、O.D.あたりの生菌数・細胞数が少なくなっていく (表III-8)、3) plating efficiencyが低下する (表III-8)、ということが判明した。従って、相同組換え欠損株と同様、複製後修復の欠損株ではG₂-M期で細胞周期が一時的に停止したり形態異常を生じる細胞の割合が増加し、分裂ができなくなってしまう細胞が出現しているものと推測される。ゆえに、複製後修復機構はゲノムDNAの複製中に生じた何らかの問題の解消に寄与していることが考えられる。

III-2-3 rad18 欠損はLOHを上昇させる

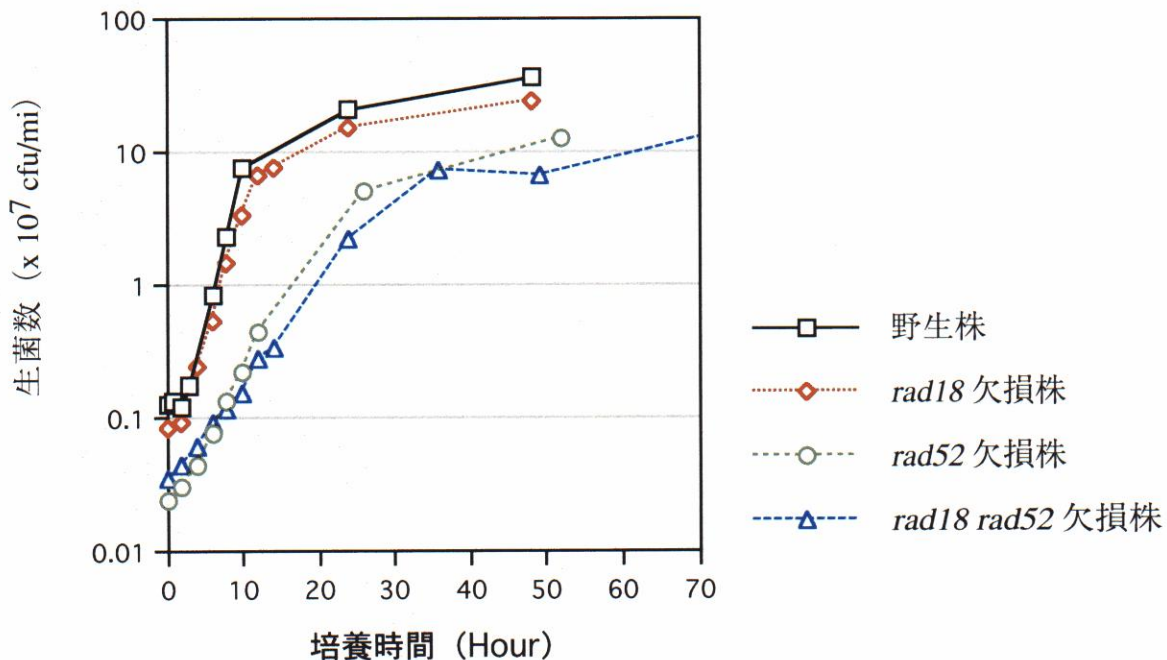
複製後修復はRAD18 遺伝子に依存していることから、この遺伝子の欠損株におけるLOH解析結果には、複製後修復経路全般が不活化された状況が反映されることが推測された。

図III-21に複製後修復欠損株における5-FOA耐性頻度、5-FOA耐性 Leu⁺頻度、5-FOA耐性Leu⁺ Ade⁺頻度の散布図を、表III-9 Aにこれらの中間値をまとめ、表III-9 Bにそれらをもとに算出したクラスA~Cの頻度をまとめた。図III-22のグラフは、各相同組換え欠損株の全LOH頻度を比較したもので、さらに染色体喪失とそれ以外のLOHイベントの割合を示している。*rad18* 単独欠損株でLOH解析を行った結果、LOH頻度は野生株の13倍に上昇し、染色体喪失とその他のLOHイベントの双方について上昇が観られた (図III-22)。*rad18 rad52* 二重欠損株ではLOHが野生株の54倍と大きく上昇し、この頻度の 6.5×10^3 という値は、*rad18* 単独欠損株と*rad52* 単独欠損株それぞれのLOH頻度の総和よりも高かった (図III-22)。また、LOHのほぼ全てが染色体喪失に



図III-18 *rad18* 欠損がMMS感受性に及ぼす影響

一倍体細胞株をYPD寒天培地および0.01% MMSを含むYPD寒天培地にスポットして30℃で3日間培養し、コロニー形成の有無を指標とすることによりMMS感受性を検定した。*rad52/pMO317*は、*rad52* 欠損株にプラスミドpMO317が形質転換されていることを示している。pMO317はRAD52 遺伝子機能を相補する。



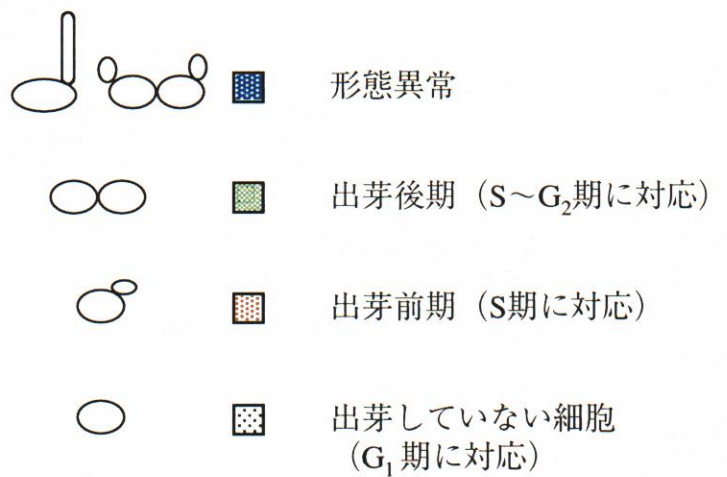
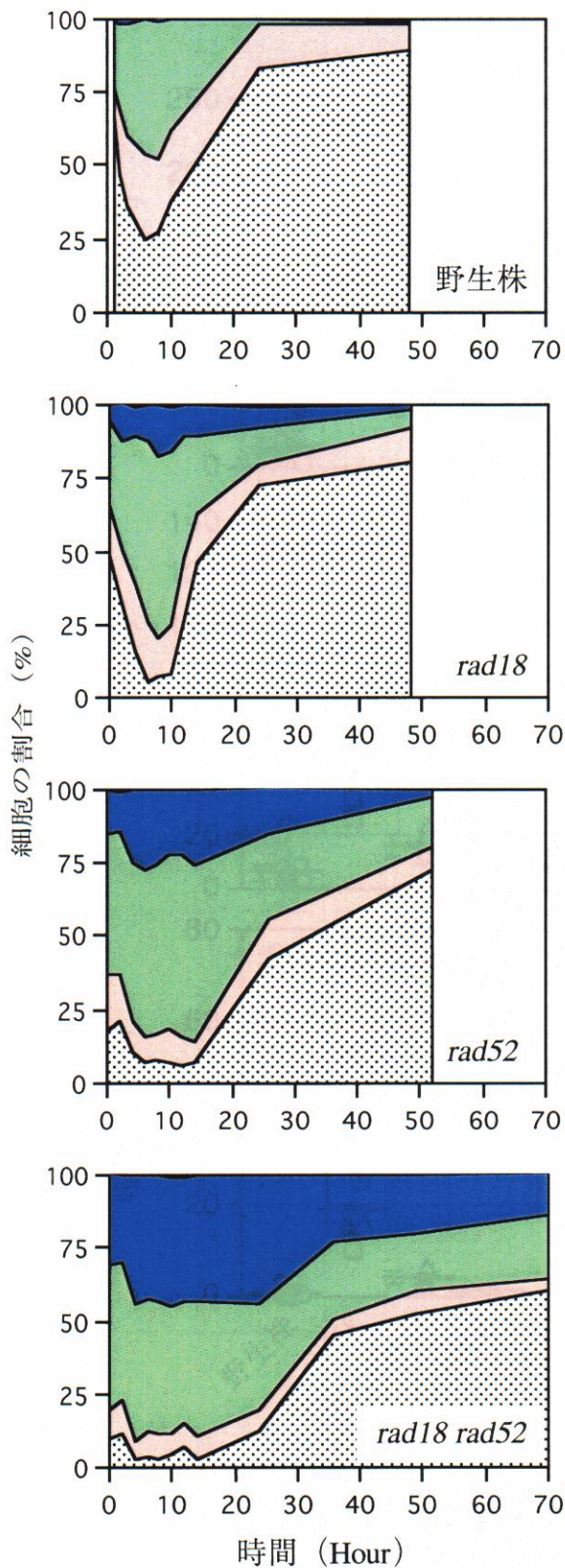
図III-19 *rad18* 欠損が生育に及ぼす影響

経時的に採取した培養液1 mlあたりの生菌数を計測し、その値をもとに生育曲線を作製した。生育の調査に関してはLOH測定時と同じ二倍体株で行い、培地についてもLOH測定時に使用するものと同じ、YPD液体培地にアデニンとウラシルを添加したものを使用した。

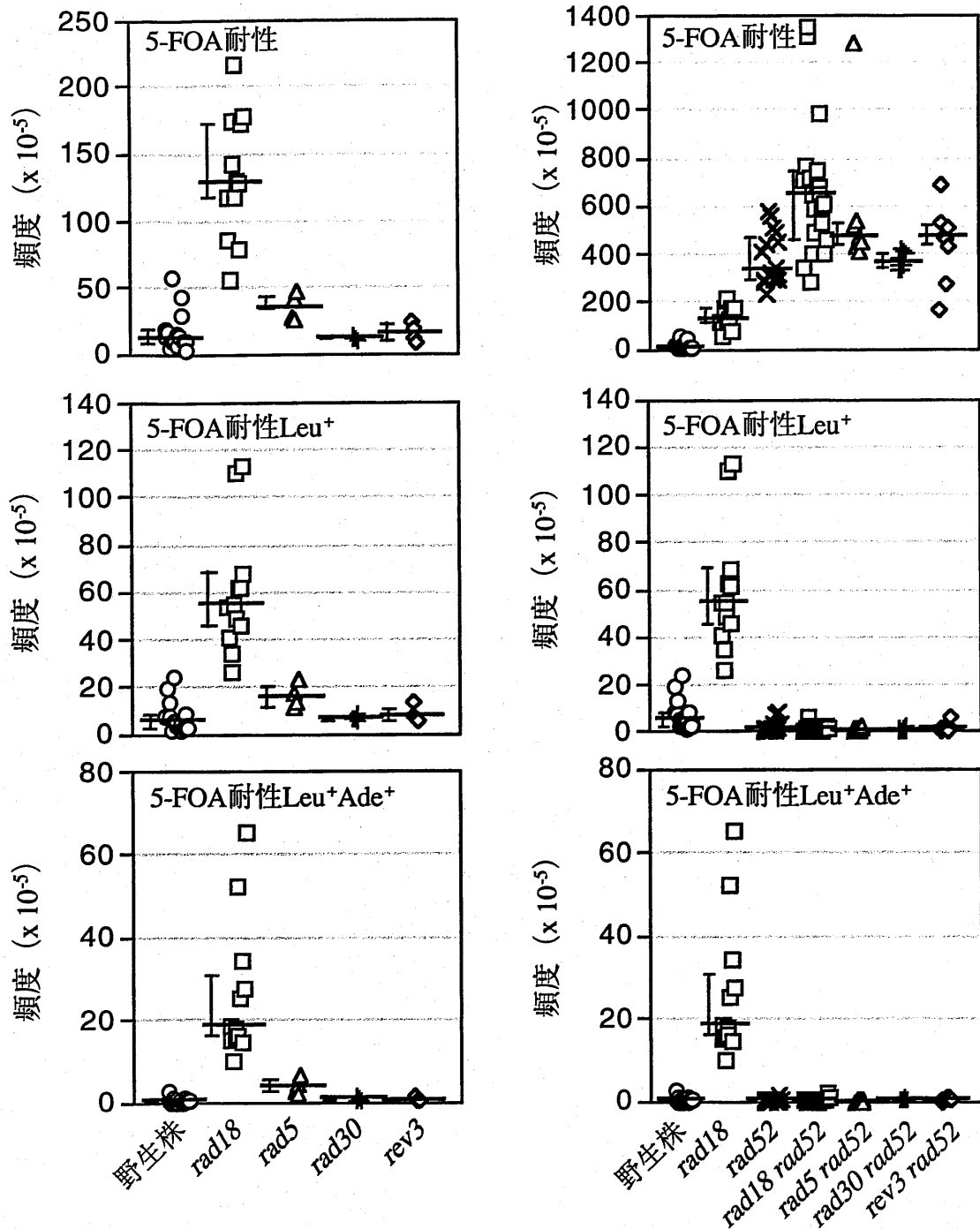
表III-8 複製後修復関連遺伝子欠損株の plating efficiencyと倍加時間

株	野生株	<i>rad18</i>	<i>rad52</i>	<i>rad18 rad52</i>
O.Dあたりの生菌数 ($\times 10^7$)	2.33 \pm 0.382	1.51 \pm 0.216	0.748 \pm 0.158	0.502 \pm 0.0387
O.Dあたりの細胞数 ($\times 10^7$)	2.43 \pm 0.197	2.68 \pm 0.580	1.51 \pm 0.284	1.37 \pm 0.147
Plating efficiency	96%	56%	50%	37%
生菌数より求めた倍加時間 (Min)	84	91	146	210

生菌数および細胞数は、図III-19において対数増殖期の直線性のある範囲の平均を求めて算出した。倍加時間に関してもその範囲より算出した。



図III-20 *rad18* 欠損が細胞周期分布の経時的変化に与える影響



図III-21 複製後修復関連遺伝子欠損株における 5-FOA耐性頻度、5-FOA耐性Leu⁺頻度、5-FOA耐性Leu⁺Ade⁺頻度の散布図

図中のプロット一個は一実験区での頻度を表している。頻度の中間値を太い実線で表し、その左に細い縦線でヒンジ散布度を表した。ヒンジ散布度とは、最低値より25%~75%の範囲のことを指す。野生株二倍体 (RD301) のデータはHiraokaらの研究によるものである (Hiraoka et al. 2000)。

表III-9 A

複製後修復関連遺伝子欠損株の 5-FOA耐性頻度、
5-FOA耐性Leu⁺頻度、5-FOA耐性Leu⁺Ade⁺頻度の中間値

A-a 複製後修復関連遺伝子単独欠損株

表現型	中間値 (25%-75%ヒンジ) x 10 ⁻⁵				
	野生株 ¹⁾	<i>rad18</i>	<i>rad5</i>	<i>rad30</i>	<i>rev3</i>
5-FOA耐性	12 (8.8-18.6)	144 (118-173)	40 (34-44)	12 (11-13)	15 (10-22)
5-FOA耐性Leu ⁺	5.2 (2.7-8.3)	56 (46-69)	17 (12-20)	6.5 (6.1-7.6)	7.2 (5.9-11)
5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁺	0.35 (0.15-0.57)	18 (16-31)	4.0 (2.6-5.7)	0.8 (0.57-1.22)	0.56 (0.53-0.98)

A-b 複製後修復関連遺伝子と *rad52* との二重欠損株

表現型	中間値 (25%-75%ヒンジ) x 10 ⁻⁵						
	野生株	<i>rad52</i>	<i>rad18 rad52</i>	<i>rad5 rad52</i>	<i>rad30 rad52</i>	<i>rev3 rad52</i>	
5-FOA耐性	12 (8.8-18.6)	332 (295-473)	650 (465-753)	467 (444-527)	367 (343-405)	470 (444-518)	
5-FOA耐性Leu ⁺	5.2 (2.7-8.3)	0.86 (0.53-2.5)	1.2 (0.75-1.6)	0.7 (0.44-1.21)	0.71 (0.56-1.1)	1.1 (0.96-2.1)	
5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁺	0.35 (0.15-0.57)	0.29 (0.11-0.39)	0.26 (0.15-0.55)	0.11 (0.083-0.42)	0.28 (0.20-0.41)	0.43 (0.36-0.70)	

A-a、A-b 解析を行った実験区数に関しては以下の通りである。*rad18* 欠損株；20区、*rad5* 欠損株；16区、*rad30* 欠損株；4区、*rev3* 欠損株；4区、*rad18 rad52* 二重欠損株；23区、*rad5 rad52* 二重欠損株；8区、*rad30 rad52* 二重欠損株；8区、*rev3 rad52* 二重欠損株；8区。

1) 野生株二倍体 (RD301) のデータはHiraokaらの研究によるものである (Hiraoka et al. 2000)。

表III-9 B 中間値より算出したクラス A~Cの頻度

B-a 複製後修復関連遺伝子単独欠損株

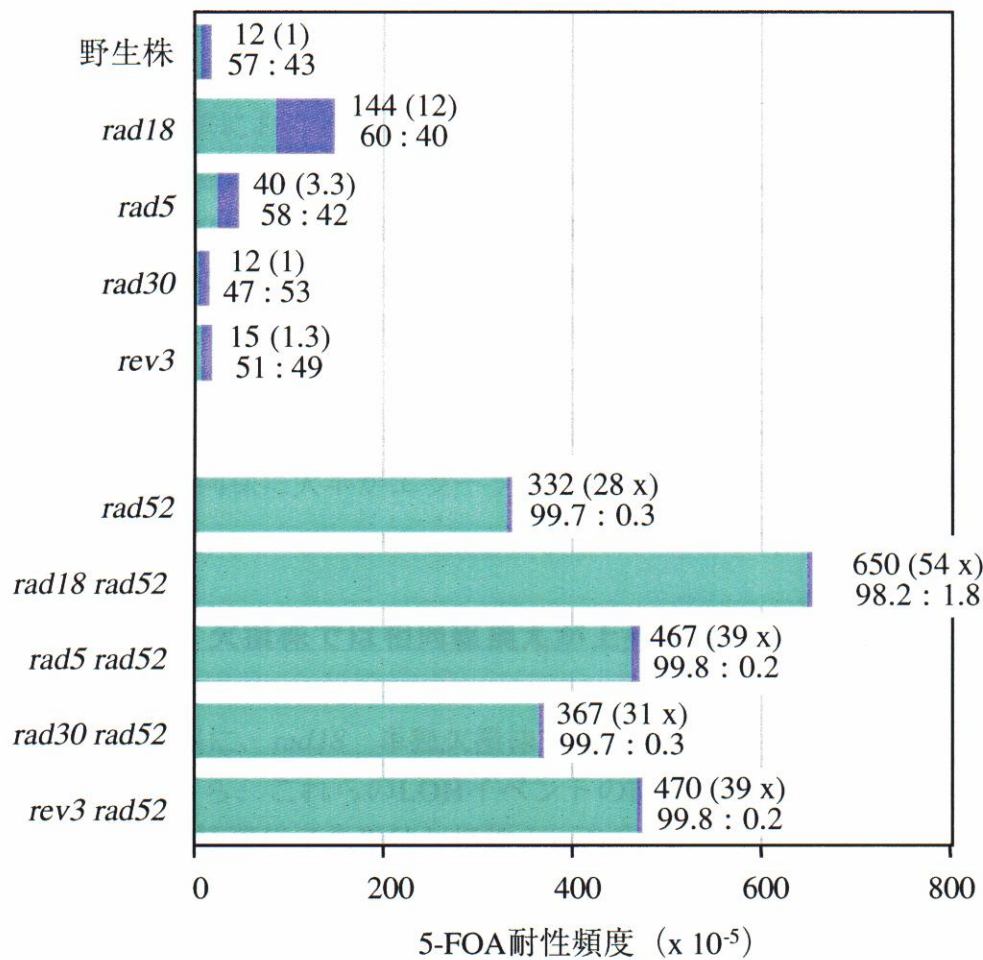
クラス ¹⁾	表現型	頻度 (5-FOA耐性頻度中の割合、%) x 10 ⁻⁵				
		野生株	<i>rad18</i>	<i>rad5</i>	<i>rad30</i>	<i>rev3</i>
A	5-FOA耐性Leu ⁻	6.8 (57)	87 (60)	23 (58)	5.6 (47)	7.7 (51)
B	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁻	4.9 (41)	38 (26)	13 (33)	5.7 (48)	6.6 (44)
C	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁺	0.35 (2.9)	18 (13)	4.0 (10)	0.79 (6.6)	0.56 (3.7)
合計	5-FOA耐性	12 (100)	144 (100)	40 (100)	12 (100)	15 (100)

B-b 複製後修復関連遺伝子と *rad52* との二重欠損株

クラス	表現型	野生株	頻度 (5-FOA耐性頻度中の割合、%) x 10 ⁻⁵					
			<i>rad52</i>	<i>rad18 rad52</i>	<i>rad5 rad52</i>	<i>rad30 rad52</i>	<i>rev3 rad52</i>	
A	5-FOA耐性Leu ⁻	6.8 (57)	331 (99.7)	649 (99.8)	466 (99.8)	366 (99.7)	469 (99.8)	
B	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁻	4.9 (41)	0.56 (0.17)	0.90 (0.14)	0.59 (0.13)	0.43 (0.12)	0.63 (0.13)	
C	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁺	0.35 (2.9)	0.29 (0.087)	0.26 (0.04)	0.11 (0.024)	0.28 (0.076)	0.43 (0.091)	
合計	5-FOA耐性	12 (100)	332 (100)	650 (100)	467 (100)	367 (100)	470 (100)	

B-a、B-b A-aおよびA-bの中間値を元に、5-FOA耐性頻度から5-FOA耐性 Leu⁺頻度を減ずることで5-FOA耐性Leu⁻頻度を、5-FOA耐性 Leu⁺頻度から5-FOA耐性Leu⁺ Ade⁺頻度を減ずることで5-FOA耐性Leu⁺ Ade⁻頻度を算出した。()内の値は5-FOA耐性頻度を100%とした場合の割合を示している。

1) 5-FOA耐性クローンの表現型によるクラス分類は図I-1と同様のものである。



図III-22 複製後修復関連遺伝子欠損が LOH頻度に及ぼす影響

■は染色体喪失（クラスA）、■はその他のLOHイベント（クラスB、C）の頻度を表している。また、バーの右上には5-FOA耐性頻度を、右下には染色体喪失の割合:その他のLOHイベントの割合(%)を示した。

よるものであった。

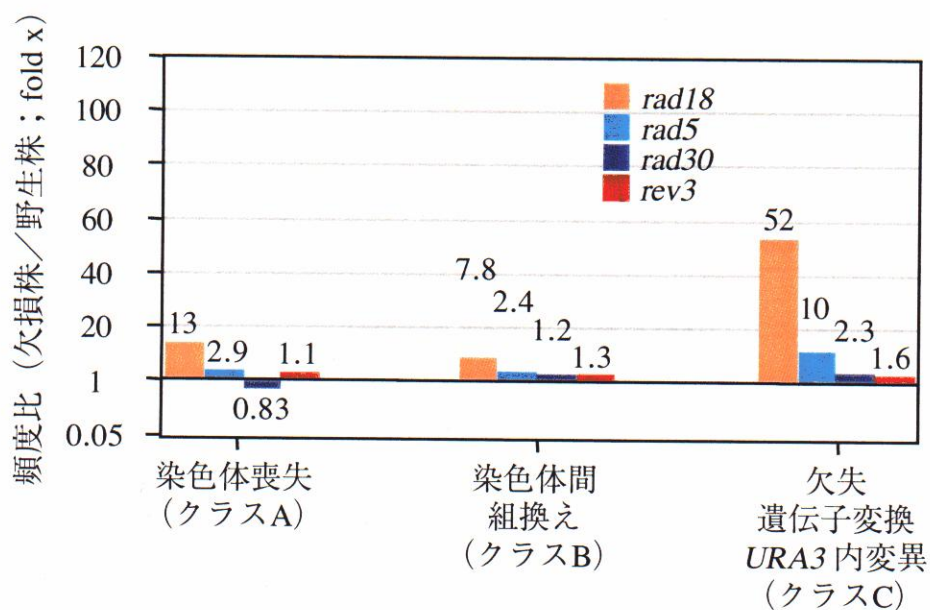
rad18 単独欠損株における染色体喪失の上昇は、複製後修復機構も相同組換え機構と同様に染色体の崩壊の回避に寄与していることを示している。また、*rad18 rad52* 二重欠損株での劇的なLOH頻度の上昇は、細胞内に発生する自然DNA傷害の総体量が相同組換え欠損株のLOH解析結果から推測していたもの以上であることを物語っている。おそらく自然DNA傷害には複製後修復機構と相同組換え機構のいずれの経路でも回避可能な部分があり、一方の欠損時にはもう一方が回避プロセスを代替することができるのであろう。また、複製後修復機構による自然DNA傷害の回避は、相同組換え機構と同様に大半がエラーフリーに行われているものと推測される。

III-2-4 *rad18* 欠損株では相同組換えが上昇する

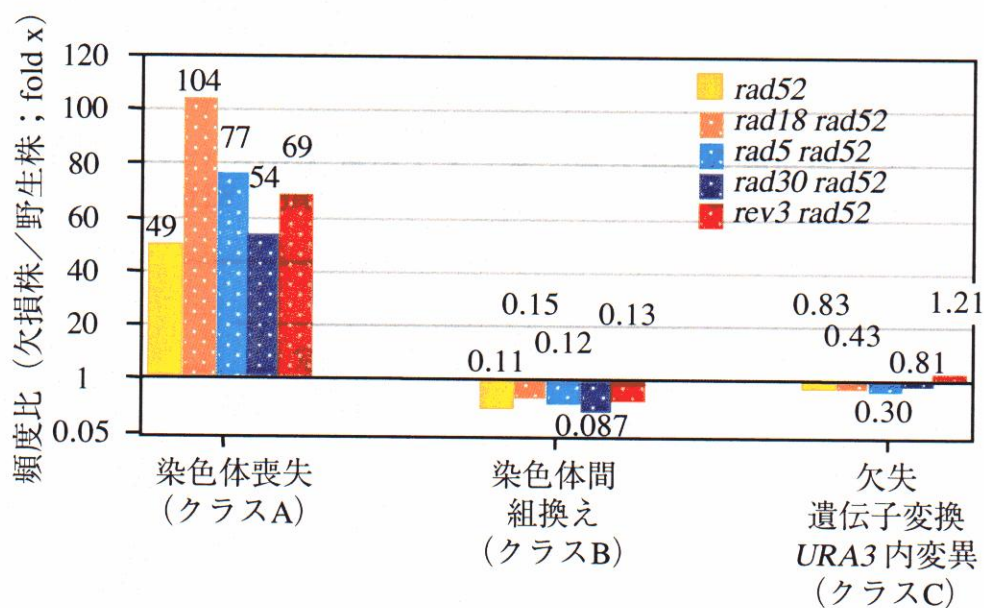
図III-22にある様に、*rad18* 単独欠損株では染色体喪失以外のLOHイベントの上昇が観られたことから、これらのLOHイベントの詳細を解析した。図III-23と図III-24は、複製後修復関連遺伝子の単独欠損株と*rad52* との二重欠損株に生じたLOHイベントをクラスA、B、Cに分類し、野生株に対する増減を比較したものである。*rad18* 単独欠損株ではクラスB；染色体間の組換えが野生株の8倍に上昇していた他、クラスC；*URA3* 遺伝子マーカー内の変異・遺伝子変換・染色体内欠失の頻度の合計が52倍と劇的に上昇していた（図III-23）。これらのクラスB、クラスCの頻度は*rad18 rad52* 二重欠損株では*rad52* 単独欠損株と同じレベルまで低下することから（図III-24）、*rad18* 単独欠損株で上昇しているこれらのLOHイベントは*RAD52* 遺伝子依存性の相同組換えによって生じていることが予想された。

そこで、*rad18* 単独欠損株で上昇している相同組換えによるLOHイベントをより詳細に解析するため、クラスBとクラスCからそれぞれ40クローンずつを単離し、PFGEおよびサザンブロットィング法により第III染色体の構造を調べた（表III-10）。クラスCには*rad50* 欠損株で観られたものと同様、*ADE2* 遺伝子マーカーのホモ化を生じているクローンが見い出されたことから（表III-11）、その現象を考慮に入れた補正を行って各LOHイベントの頻度を算出した。補正の方法は*rad50* 欠損株において行ったものと同様である。*rad18* 欠損が各LOHイベントに及ぼす影響を図III-25に示し、表III-12に各LOHイベントの頻度や割合等の情報をまとめた。交叉や転座、欠失といったLOHイベントはいずれも野生株の数倍から20倍程度まで上昇し、遺伝子変換に関して驚くべきことに野生株の313倍と劇的な上昇が観られた。*URA3* 遺伝子マーカー内の点突然変異に関しては検出されなかったため、野生株に対する増減は判定できなかった。

以上の結果から、*rad18* 欠損株では複製後修復機構の代替経路として相同組換え機



図III-23 複製後修復関連遺伝子の単独欠損が LOHの各クラスに及ぼす影響



図III-24 複製後修復関連遺伝子と rad52 の二重欠損が LOHの各クラスに及ぼす影響

図III-23および図III-24のグラフは、野生株に対するクラスA～Cの頻度の増加・減少を示している。バーの上の数字は頻度比を表している。

表III-10 第III染色体のコピー数と異常染色体のサイズに基づいた *rad18* 欠損株のLOHクロンの分類

株	表現型	クラス	頻度 (5-FOA耐性頻度中の割合、%) x 10 ⁻⁵				
			頻度 (x 10 ⁻⁵)	完全長第III染色体コピー数: サイズ異常を生じた第III染色体コピー数 ²⁾			
				2:0	1:1 (<i>MAT-HMR</i> Δ ³⁾)	1:≥1 (non <i>MAT-HMR</i> Δ) ⁴⁾	1:0
野生株 ¹⁾	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁻	B	4.9	4.0 (115/140=0.82)	<0.035 (0/140<0.0071)	0.63 (18/140=0.13)	0.25 (7/140=0.05)
	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁺	C	0.35	0.039 (11/98=0.11)	0.31 (87/98=0.89)	<0.0036 (0/98<0.010)	<0.0036 (0/98<0.010)
<i>rad18</i>	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁻	B	38	29 (31/40=0.78)	0.95 (1/40=0.025)	2.9 (3/40=0.075)	4.8 (5/40=0.125)
	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁺	C	18	12 (27/40=0.68)	5.9 (13/40=0.33)	<0.45 (0/40<0.025)	<0.45 (0/40<0.025)

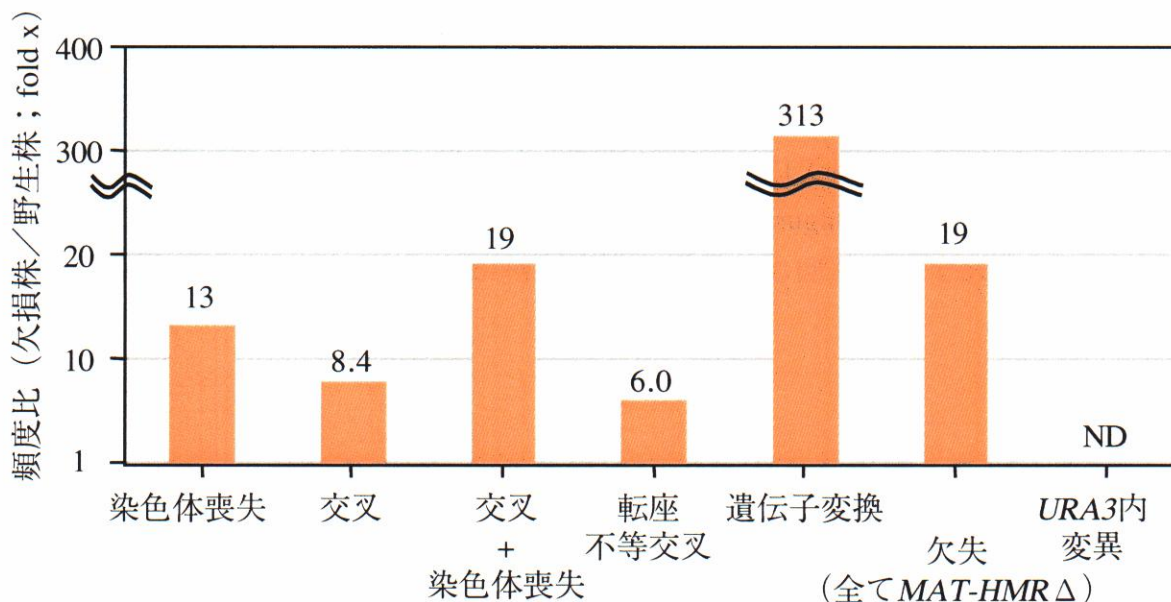
- 1) 野生株二倍体 (RD301) のデータはHiraokaらの研究によるものである (Hiraoka et al. 2000)。
- 2) 完全長第III染色体のコピー数 および サイズ異常を生じた第III染色体コピー数は PFGEとサザンブロッティング法により解析した。
- 3) *MAT-HMR* 間の欠失はPCR法により検出した (本稿II-8-6、III-1-6を参照)。
- 4) *MAT-HMR* 間の欠失以外の異常染色体のことを示す。

表III-11 *ADE2* 遺伝子マーカー挿入領域の構造に基づいた *rad18* 欠損株5-FOA耐性Leu⁺Ade⁺クロンの分類

<i>ADE2</i> 遺伝子マーカー 挿入の有無 (遺伝子型) ¹⁾	頻度 x 10 ⁻⁵ (検出クロン数)			
	完全長第III染色体コピー数: サイズ異常を生じた第III染色体コピー数 ²⁾			
	2:0 ³⁾	1:1 (<i>MAT-HMR</i> Δ)	1:≥1 (non <i>MAT-HMR</i> Δ)	
+	(<i>ADE2/ADE2</i> or <i>ADE2/0</i>)	2.3 (5)	<0.45 (ND)	<0.45 (ND)
+/-	(<i>ADE2/III-314</i>)	9.9 (22)	5.9 (13)	<0.45 (ND)
	合計	12 (27)	5.9 (13)	<0.45 (ND)

NDは未検出であることを示している。

- 1) *ADE2* 遺伝子マーカーが挿入されているIII-314領域の遺伝子型は、PCR解析によって分類した (図III-16)。
- 2) この分類は、表III-10と同様のものである。
- 3) これらのクロンはいずれも *URA3* 遺伝子マーカーの挿入断片が存在していないことがPCR解析により明らかになった。従って、交叉か遺伝子変換のいずれかが生じているものと考えられる。



図III-25 *rad18* 単独欠損が各 LOH イベントに及ぼす影響

このグラフは、野生株に対する各LOHイベントの増加・減少を示している。バーの上の数字は頻度比を、NDは未検出であることを表している。

表III-12 *rad18* 単独欠損株に生じた各 LOH イベントのまとめ

LOHイベント	頻度 $\times 10^{-5}$ (fold x) ¹⁾ [%] ²⁾	
	野生株 ³⁾	<i>rad18</i>
染色体喪失	5.8 (1) [56]	87 (13) [60]
相同染色体間の組換え ⁴⁾		
交叉 ⁵⁾	4.3 (1) [34]	36 (8.4) [25]
(+染色体喪失)	0.25 (1) [2.1]	4.8 (19) [3.3]
遺伝子変換	0.032 (1) [0.27]	10 (313) [6.9]
(+染色体喪失)	<0.0036 (1) [-]	<0.45 (-) [-]
異所性の組換え		
転座・不等交叉	0.63 (1) [5.5]	3.8 (6.0) [2.6]
染色体内欠失		
<i>MAT-HMR</i> Δ	0.31 (1) [2.6]	5.9 (19) [4.1]
それ以外の欠失	<0.0036 (1) [-]	<0.45 (-) [-]
URA3 内変異	0.0071 (1) [0.06]	<0.45 (<63) [-]
合計	12 (1) [100]	144 (12) [100]

1) ()内の数値は、野生株に対する頻度比を示している。

2) []内の数値は、各株毎のLOH頻度の総計における割合を示している。

3) 野生株二倍体 (RD301) のデータはHiraokaらの研究によるものである (Hiraoka et al. 2000)。

4) *rad18* 欠損株の頻度に関しては、*ADE2* 遺伝子マーカーのホモ化を考慮して補正を行った。

5) ここでの交叉の頻度は、通常の「交叉」(図I-1 B-a)の頻度と「交叉+染色体喪失」(図I-1 B-a')の頻度の総計である。遺伝子変換の場合も同様である。

構が利用されていることが示唆された。この関係は、*rad52* 欠損株において相同組換え機構の代替経路として損傷乗り越えDNA合成が利用されていたことと全く逆のパターンである。また、これらの結果は、自然DNA傷害にDaughter strand gap型の構造を持つものが含まれており、それらが相同組換え機構でも回避可能であることを示唆している。

III-2-5 *rad5*, *rad30* および *rev3* 欠損はLOHに大きな影響を及ぼさない

次に、*RAD18* 遺伝子下流に存在する複数の経路が、それぞれどの程度LOHに影響を与えるかを調べるために*rad5*, *rad30* および *rev3* それぞれの単独欠損株、ならびに*rad5 rad52*, *rad30 rad52* および *rev3 rad52* それぞれの二重欠損株に生じるLOHを解析した。*rad5*, *rad30* および *rev3* それぞれの単独欠損株のLOH頻度を野生株と比較した場合(図III-21、図III-22)、*rad5* 単独欠損株に関しては野生株に対し3.3倍と有意な上昇が観られたものの、その他二つの単独欠損株に関しては野生株と同レベルに留まり、染色体喪失とその他のLOHイベントの比に関しても大きな変化はなかった(図III-22)。また、クラスBとクラスCの分布に関しても、*rad5* 単独欠損株がクラスCにおいて野生株に対し10倍の上昇を示した以外、顕著な増減は観られなかった(図III-23)。以上のように、いずれの単独欠損株も*rad18* 単独欠損株で観られたようなLOHの上昇やLOHイベント分布の変化を示さなかった。

rad5 rad52, *rad30 rad52* および *rev3 rad52* それぞれの二重欠損株ではいずれもLOH頻度が野生株の30~40倍に上昇し、その大半が染色体喪失によるものであった(図III-22)。しかし、*rad52* 単独欠損株のLOH頻度と有意な差は認められなかった。クラスBとクラスCの頻度に関してはいずれの二重欠損株においても*rad52* 単独欠損株と同等の分布を示していた(図III-24)。以上より、いずれの二重欠損株も*rad18 rad52* 二重欠損株で観られたような顕著なLOHの上昇やLOHイベント分布の変化を示さないことが判明した。*rad5 rad52* および *rev3 rad52* 二重欠損株は*rad30 rad52* 二重欠損株に比べLOH頻度(5-FOA耐性頻度)が若干高くなる傾向が観られたが(図III-21)、解析数が少ないこともあり、これらの株間で有意な差があるかどうかは不明である。

以上のように、*RAD5*, *RAD30* および *REV3* 遺伝子の欠損は、単独欠損の場合も*rad52* との二重欠損の場合も共にLOHの頻度や分布に大きな影響を与えないことが判明した。これらの結果は、*rad18* 単独欠損株や*rad18 rad52* 二重欠損株での結果と大きく異なっている。従って、*RAD18* 遺伝子下流の複数の経路に関して、1) *RAD5*, *RAD30* および *REV3* 遺伝子のそれぞれが関与する経路が互いに補完して染色体の崩壊の回避に寄与しているか、2) *RAD18* 遺伝子下流に、本研究では調べていない第四の経路が寄与している、という二つの可能性が考えられる。

III-3 NHEJ欠損株の解析

相同組換え関連遺伝子の欠損株におけるLOH解析の結果、*rad52* 欠損株において相同配列を介さない転座が検出された。このことから、細胞内に発生する自然DNA傷害の回避プロセスにNHEJの機構が関与している可能性が示唆された。NHEJでは、*HDF1* および *HDF2* 遺伝子にそれぞれコードされるHdf1p (KU70p) とHdf2p (KU80p) の複合体がDNAの末端に結合し、DNA末端をエキソヌクレアーゼなどから保護すると同時にリガーゼをリクルートしてライゲーション反応を促進することが知られている。本研究では、NHEJの欠損株として、*hdf1* の単独欠損株および *hdf1 rad52* 二重欠損株を作製し、これらの欠損株に生じるLOHの解析を行った。

III-3-1 *hdf1* 欠損が温度感受性に及ぼす影響

すでに多くの研究グループが *hdf1* および *hdf2* 欠損株を作製しており、これらの欠損株の生育能は温度依存的に変化するという報告がされている。従って、Ku欠損株のLOH解析を行うにあたり、解析を実施する際の温度条件は良く吟味しなければならないポイントであった。複数の研究グループがそれぞれ異なったgenetic backgroundを持つ株で欠損株を作製しており、それら全ての株において一致しているのは、*hdf1* および *hdf2* 欠損株は37℃で培養した場合にG₂-M期で不可逆的な細胞周期の停止が起こりコロニー形成能が失われる、という知見である。そこで、まず本研究では *hdf1* 単独欠損株および *hdf1 rad52* 二重欠損株を作製し、その温度感受性を検討した。

結果を図III-26に示した。本研究で作製した一倍体の *hdf1* 単独欠損株はいずれも37℃ではコロニーを形成できなかった。また、*hdf1 rad52* 二重欠損株に関しては、プラスミドpMO317 (本稿II-4を参照) を形質転換することによって野生型*RAD52* 遺伝子を相補した状態で37℃の温度感受性を示した。どちらの欠損株も30℃および23℃では野生株と同等のコロニーを形成した。以上の結果から、本研究で作成した *hdf1* 単独欠損株および *hdf1 rad52* 二重欠損株は37℃で温度感受性を示すことが示された。

III-3-2 *hdf1* 欠損が生育に及ぼす影響

次に、*hdf1* 欠損が許容温度条件下での生育に及ぼす影響を調べた。一般的に *hdf1* 欠損株の許容温度は30℃と言われているが、genetic backgroundによっては30℃では若干生育が悪化するケースも報告されている。そこで、本研究で導入した *hdf1* 欠損が

30℃と23℃の温度条件下で生育に及ぼす影響を検討するため、生菌数、ならびに細胞の出芽状況について経時的に測定を行った。具体的には、相同組換え関連遺伝子の欠損株の生育を調べた際（III-1-2）と同様の実験を行った。

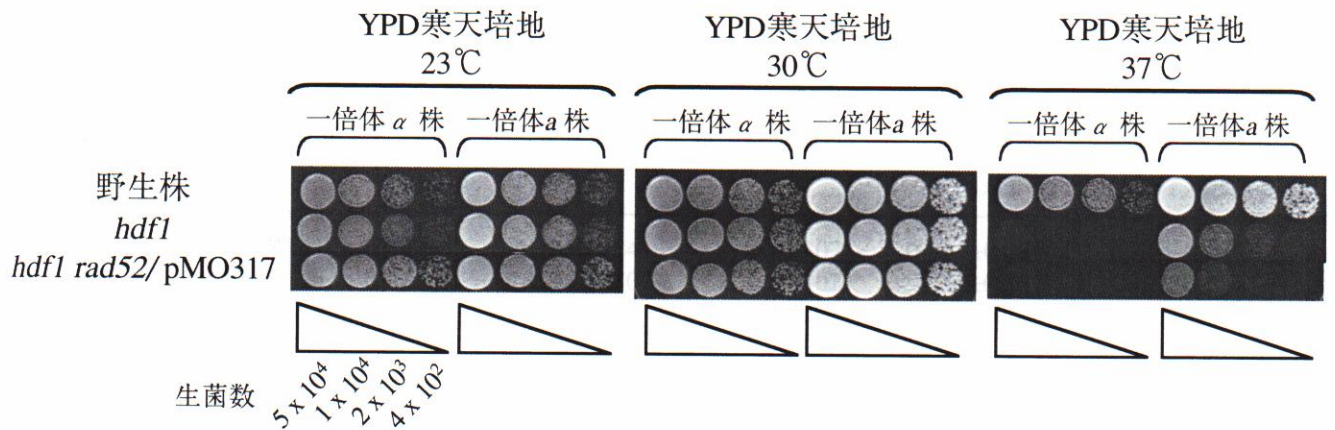
生菌数をもとに作製した生育曲線を図III-27に、O.D.あたり生菌数と細胞数、ならびにそれらから算出したplating efficiencyや倍加時間を表III-13にまとめた。また、細胞周期分布の経時的変化を図III-28に示した。*hdf1* 単独欠損株に関しては、23℃と30℃の双方の条件下において、共に全ての点において野生株と全く同じ挙動を示した。一方、*hdf1 rad52* 二重欠損株では、23℃と30℃の双方の条件下において*rad52* 単独欠損株に対し倍加時間の遅延、O.D.あたりの生菌数・細胞数の低下、plating efficiencyの低下が観られた（表III-13）。また、対数増殖期における細胞周期分布に関しても*rad52* 単独欠損株に対し形態異常を示す細胞の割合が若干増大する傾向が観られた（図III-28）。以上の結果から、相同組換え機構関連遺伝子の各欠損株や*rad18* 欠損株および*rad18 rad52* 二重欠損株と同様、*hdf1 rad52* 二重欠損株ではG₂-M期で細胞周期が一時的に停止したり形態異常を生じる細胞の割合が増加し、分裂ができなくなってしまう細胞が出現しているものと推測される。ゆえに、NHEJ機構は相同組換えと二重欠損にした場合にのみ、ゲノムDNAの複製中に生じた問題の解消に寄与していることが考えられる。

III-3-3 *hdf1* 欠損はLOHに大きな影響を及ぼさない

次に、NHEJ機構がどの程度LOHに影響を与えるかを調べるために*hdf1* 単独欠損株および*hdf1 rad52* 二重欠損株に生じるLOHを解析した。図III-29にNHEJ欠損株における5-FOA耐性頻度、5-FOA耐性 Leu⁺頻度、5-FOA耐性 Leu⁺ Ade⁺頻度の散布図を、表III-14にこれらの中間値と、それらをもとに算出したクラスA～Cの頻度をまとめた。図III-30のグラフは、NHEJ欠損株の全LOH頻度を比較したもので、さらに染色体喪失とそれ以外のLOHイベントの割合を示している。図III-31は、NHEJ欠損株に生じたLOHイベントをクラスA、B、Cに分類し、野生株に対する増減を比較したものである。

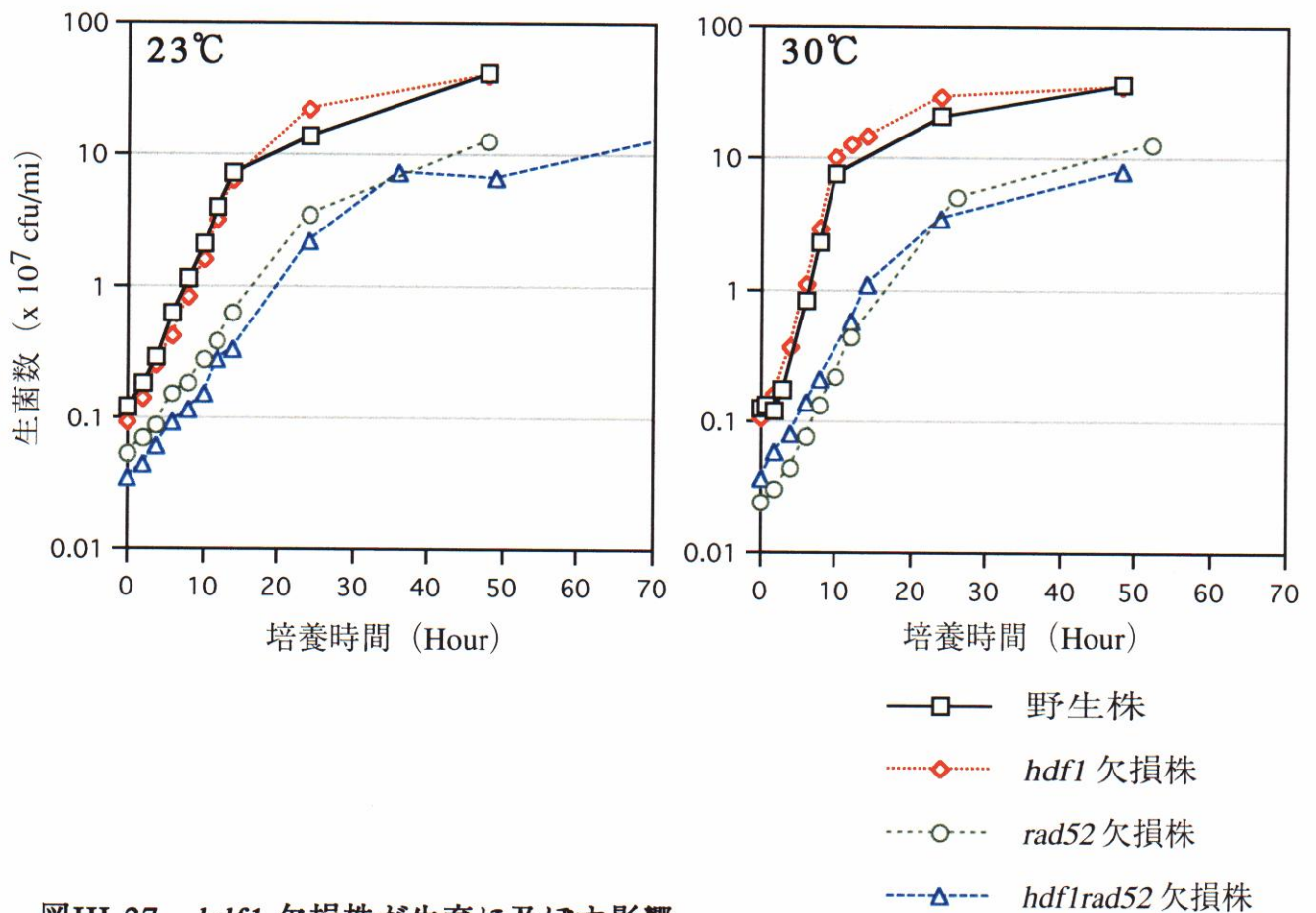
hdf1 単独欠損株では、LOH頻度は野生株とほぼ同じレベルであり、染色体喪失とその他のLOHイベントの比に関しても大きな変化はなかった（図III-30）。また、クラスBとクラスCの分布に関しても野生株に対する顕著な増減は観られなかった（図III-31）。以上の様に、*hdf1* 単独欠損株ではLOHの上昇やLOHイベント分布の変化を示さなかった。

また、*hdf1 rad52* 二重欠損株ではLOH頻度が野生株の36倍に上昇し、その大半が染



図III-26 *hdf1* 欠損株における温度感受性の検定

一倍体細胞株を3枚のYPD寒天培地にスポットしてそれぞれ23℃、30℃、37℃で3日間培養し、コロニー形成の有無を指標とすることにより温度感受性を検定した。*hdf1 rad52/pMO317*は、*hdf1 rad52* 二重欠損株にプラスミドpMO317が形質転換されていることを示している。pMO317はRAD52 遺伝子機能を相補する。



図III-27 *hdf1* 欠損株が生育に及ぼす影響

経時的に採取した培養液1 mlあたりの生菌数を計測し、その値をもとに生育曲線を作製した。生育の調査に関してはLOH測定時と同じ二倍体株で行い、培地についてもLOH測定時に使用するものと同じ、YPD液体培地にアデニンとウラシルを添加したものを使用した。

表III-13 複製後修復関連遺伝子欠損株の plating efficiencyと倍加時間

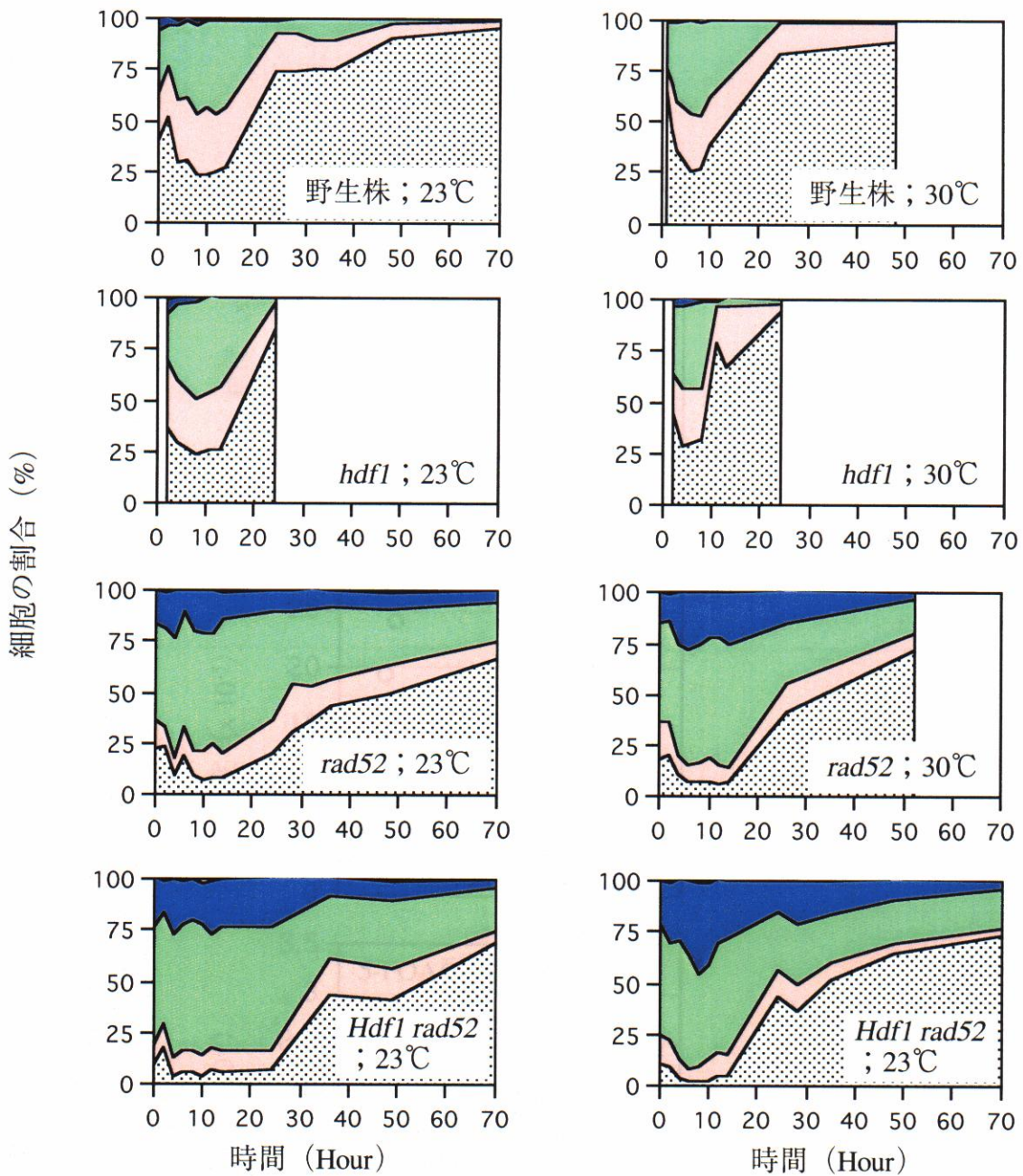
A 23℃

株	野生株	<i>hdf1</i>	<i>rad52</i>	<i>hdf1 rad52</i>
O.Dあたりの生菌数 ($\times 10^7$)	2.19±0.184	1.85±0.307	0.913±0.0910	0.718±0.0927
O.Dあたりの細胞数 ($\times 10^7$)	2.85±0.00707	2.29±0.302	1.39±0.229	1.21±0.363
Plating efficiency	77%	81%	66%	59%
生菌数より求めた倍加時間 (Min.)	128	132	210	286

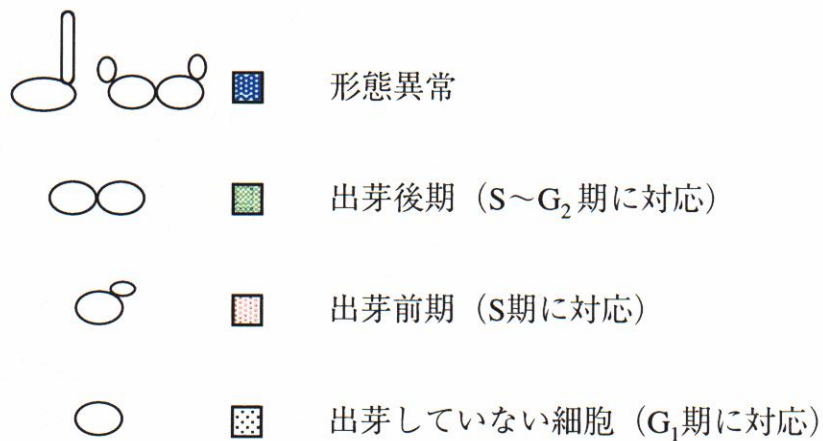
B 30℃

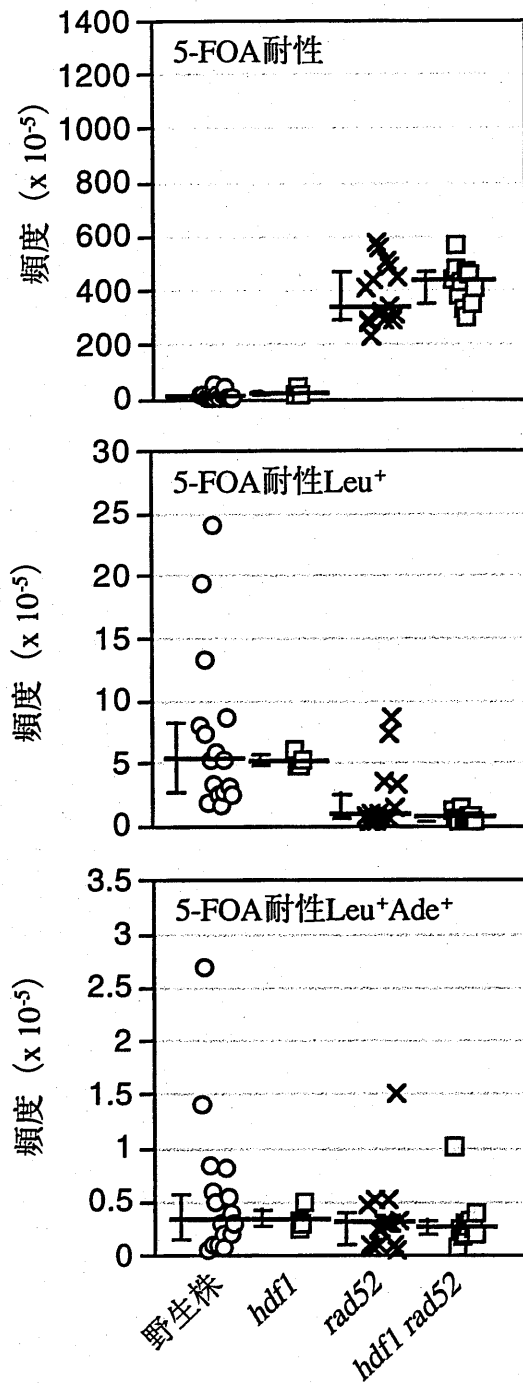
株	野生株	<i>hdf1</i>	<i>rad52</i>	<i>hdf1 rad52</i>
O.Dあたりの生菌数 ($\times 10^7$)	2.33±0.382	1.98±0.217	0.748±0.158	0.488±0.0525
O.Dあたりの細胞数 ($\times 10^7$)	2.43±0.197	2.34±0.211	1.51±0.284	1.24±0.662
Plating efficiency	96%	85%	50%	39%
生菌数より求めた倍加時間 (Min.)	84	87	146	161

生菌数および細胞数は、図III-27において対数増殖期の直線性のある範囲の平均を求めて算出した。倍加時間に関してもその範囲より算出した。



図III-28 *hdf1* 欠損が細胞周期分布の経時的変化に与える影響





図III-29 *hdf1* 欠損株における5-FOA耐性頻度、5-FOA耐性Leu⁺頻度、5-FOA耐性Leu⁺Ade⁺頻度の散布図

図中のプロット一個は一実験区での頻度を表している。頻度の中間値を太い実線で表し、その左に細い縦線でヒンジ散布度を表した。ヒンジ散布度とは、最低値より25%~75%の範囲のことを指す。野生株二倍体 (RD301) のデータはHiraokaらの研究によるものである (Hiraoka et al. 2000)。

表III-14

A. *hdf1* 単独欠損株および *rad52* との二重欠損株における 5-FOA耐性頻度、5-FOA耐性Leu⁺頻度、5-FOA耐性Leu⁺Ade⁺頻度の中間値

表現型	中間値 (25%-75%ヒンジ) × 10 ⁻⁵			
	野生株 ¹⁾	<i>hdf1</i>	<i>rad52</i>	<i>hdf1 rad52</i>
5-FOA耐性	12 (8.8-18.6)	13 (13-29)	332 (295-473)	428 (353-468)
5-FOA耐性Leu ⁺	5.2 (2.7-8.3)	5.1 (4.9-5.7)	0.86 (0.53-2.5)	0.66 (0.49-0.33)
5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁺	0.35 (0.15-0.57)	0.31 (0.28-0.41)	0.29 (0.11-0.39)	0.26 (0.21-0.33)

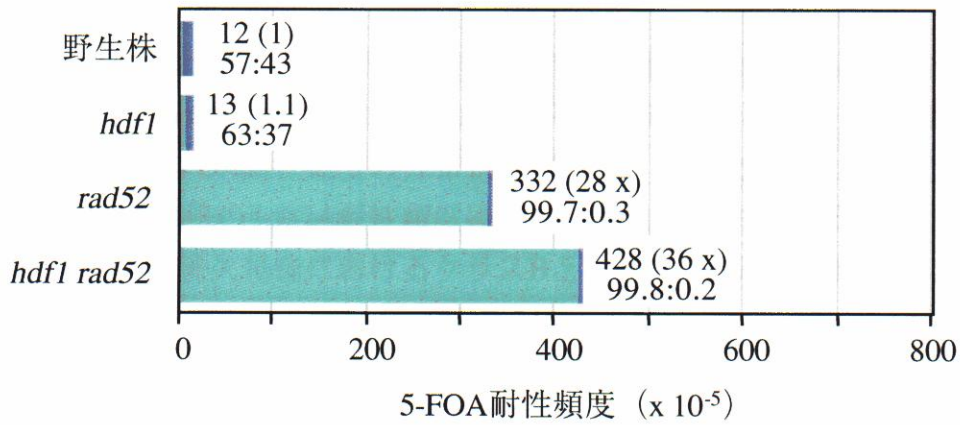
B. 中間値より算出したクラス A~Cの頻度

クラス ²⁾	表現型	頻度 (5-FOA耐性頻度中の割合、%) × 10 ⁻⁵			
		野生株	<i>hdf1</i>	<i>rad52</i>	<i>hdf1 rad52</i>
A	5-FOA耐性Leu ⁻	6.8 (57)	8.2 (63)	331 (99.7)	427 (99.8)
B	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁻	4.9 (41)	4.8 (37)	0.56 (0.17)	0.40 (0.83)
C	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁺	0.35 (2.9)	0.31 (2.4)	0.29 (0.087)	0.26 (0.061)
合計	5-FOA耐性	12 (100)	13 (100)	332 (100)	428 (100)

A 解析を行った実験区数に関しては以下の通りである。*hdf1* 欠損株；4区、*hdf1 rad52* 二重欠損株；11区。

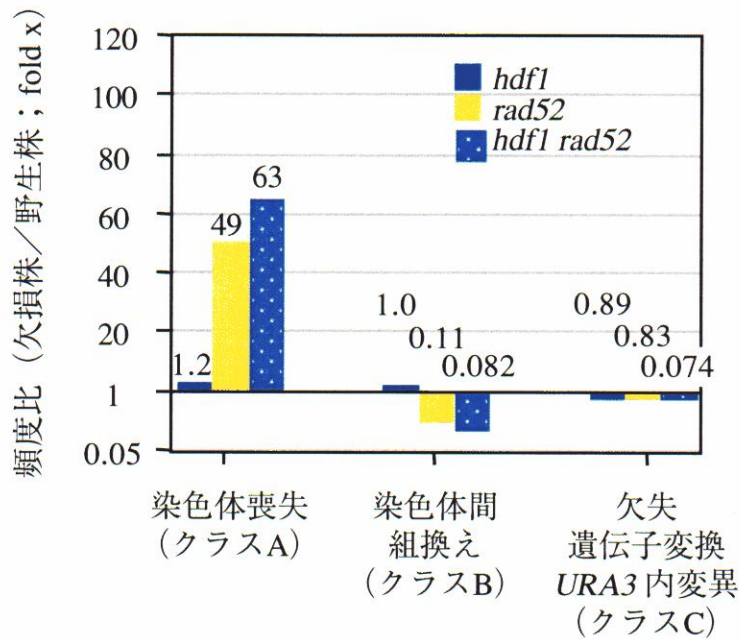
B Aの中間値を元に、5-FOA耐性頻度から5-FOA耐性Leu⁺頻度を減ずることで5-FOA耐性Leu⁻頻度を、5-FOA耐性Leu⁺頻度から5-FOA耐性Leu⁺Ade⁺頻度を減ずることで5-FOA耐性Leu⁺Ade⁻頻度を算出した。()内の値は5-FOA耐性頻度を100%とした場合の割合を示している。

- 1) 野生株二倍体 (RD301) のデータはHiraokaらの研究によるものである (Hiraoka et al. 2000)。
- 2) 5-FOA耐性クローンの表現型によるクラス分類は図I-1と同様のものである。



図III-30 *hdf1* 欠損がLOH頻度に及ぼす影響

■は染色体喪失（クラスA）、■はその他のLOHイベント（クラスB、C）の頻度を表している。また、バーの右上には5-FOA耐性頻度を、右下には染色体喪失の割合:その他のLOHイベントの割合 (%)を示した。



図III-31 *hdf1* 単独欠損および *rad52* との二重欠損がLOHの各クラスに及ぼす影響

このグラフは、野生株に対するクラスA~Cの頻度の増加・減少を示している。バーの上の数字は頻度比を表している。

色体喪失によるものであった(図III-30)。中間値で判断した場合 *hdf1 rad52* 二重欠損株のLOH頻度は *rad52* 単独欠損株に比べ若干上昇している様に見えるが、図III-29にある散布図では5-FOA耐性頻度の分布状況が *rad52* 単独欠損株と同等であることが解る。従って、この株の5-FOA耐性頻度は *rad52* 単独欠損株とほぼ同じであると判断した。*hdf1 rad52* 二重欠損株におけるクラスBとクラスCの分布に関しては、*rad52* 単独欠損株と同等の分布を示していた(図III-31)。

以上の様に、*HDF1* 遺伝子の欠損は、単独欠損の場合も *rad52* との二重欠損の場合も共にLOHの頻度や分布に大きな影響を与えないことが判明した。従って、NHEJの寄与度は「染色体の崩壊の回避」と「LOHの発生過程」のいずれに対しても、相同組換えや複製後修復に比べはるかに小さいことが示された。NHEJ機構は、相同組換え機構が欠損している場合には、放射線照射などにより形成されるDouble strand breakの修復に大きく寄与することが知られている(Siede et al. 1996)。しかし、NHEJ欠損株でのLOH解析結果より、LOHの原因となる様な自然DNA傷害に関する限り、Double strand breakはあまり関与していないことが推測される。一方で、*rad52* 欠損株に生じた異常染色体(本稿III-1-6)ではDNA末端同士のライゲーションの様な機構で形成されたと思われるものが検出されたことから、自然DNA傷害にはDNA末端を持つものが含まれていることが示唆されている。従って、この様な自然DNA傷害としては、例えばS期のDNA複製時に起こる複製フォークの進行阻害や崩壊によって形成されることが示唆されているDouble strand endなどが考えられる(詳細は本稿IV考察にて述べる)。

考察

本研究では、染色体異常・再編についてその発生や制御にどのような機構が関与しているのかを調べるため、相同組換え、複製後修復およびNHEJの各機構に関連する遺伝子を欠損した二倍体細胞に生じるLOHを解析した。本研究で用いたLOH解析系の大きな特徴は、片方の第III染色体に挿入された*URA3* 遺伝子マーカーの喪失を指標とすることにより、染色体喪失、欠失・交叉などの染色体異常・再編から点突然変異まで多様なゲノムの変化を網羅的に検出・分類できることにある。これまでに行われてきた多くの遺伝学的な研究は、点突然変異のみを検出しているもの、あるいは特定の部位間で生じる相同組換えのみを検出しているものが主流であった。従って、様々な種類の遺伝的変化が同時に検出可能なLOH解析系は、ゲノム安定性の維持に関与する機構間の相互関係や相対的な寄与度を知る上で大きな武器となることが期待される。

IV-1 相同組換えによる染色体の安定な維持；姉妹染色分体間の組換えの関与

野生株における解析結果より、相同組換え機構が様々なタイプの染色体再編やある種の染色体喪失を引き起こすことが示された。また、これらの結果から、通常の細胞増殖期には相同組換えの基質となる様な自然DNA傷害が発生しており、それがLOHの主要な原因となっていることが示唆された。本研究ではまず、相同組換え機構が染色体異常・再編に及ぼす影響を調べるため、相同組換えに関連する遺伝子である*RAD50*、*RAD51* および *RAD52* 遺伝子の欠損株を作製し、それらに生じるLOHイベントの詳細な解析を行った。解析の結果特に顕著であったのは、いずれの単独欠損株でも全体のLOH頻度（5-FOA耐性頻度）が $2.5 \sim 3.6 \times 10^{-3}$ と野生株の20~30倍に上昇し、LOHイベントの80~99%が染色体喪失であったことである。以前の研究でも *rad52* および *rad51* 欠損株において染色体喪失の自然発生率が野生株より上昇することが示されている（Klein 2001；Mortimer et al.1981）。これらの結果から、増殖中の細胞内では染色体の崩壊をもたらす様な自然DNA傷害が頻繁に生じており、それらは相同組換え機構によってエラーフリーに、つまりLOHを伴わない形で回避されていることが示唆された。言い換えれば、野生株で観察されたLOHイベントというのは、細胞内で生じている自然DNA傷害回避反応のほんの一部、あるいはごく稀な失敗を垣間見ただけに過ぎず、実際にはその背後にエラーフリーな相同組換えによる回避反応がかなりの量行われているものと推測される。今回用いた相同組換え関

連遺伝子の欠損株では自然DNA傷害の回避が不完全であり、その結果何らかの原因によって最終的に染色体の喪失がもたらされたものと考えられる。特に*rad52* 欠損株ではLOHイベントの99%が染色体喪失で占められていたことから、自然DNA傷害の回避には*RAD52* 遺伝子依存性の相同組換え経路が大きく寄与していることが示唆された。相同組換え機構の欠損によって染色体が喪失するメカニズムは良く分かっていないが、放置されたDNA末端がヌクレアーゼによる侵食を受けセントロメアまで達する場合や、分裂装置により姉妹染色分体が2つの娘細胞に均等に分配されない、いわゆる不均等分裂が生じるといったケースが想定される。以上の様に本研究では、相同組換え機構がLOHの発生よりむしろ抑制に大きく寄与していることが明らかとなった。

このエラーフリーな相同組換え機構による自然DNA傷害の回避反応の実体は、おそらく姉妹染色分体間の組換えであると推測される。姉妹染色分体とはS期～G₂期にかけて複製されるDNA鎖のペアのことを指す。相同組換え反応の際ドナー配列として姉妹染色分体を用いることは、細胞にとってメリットが多い。まず、姉妹染色分体は自然DNA傷害を発生した部位自身の正確なコピーであるため、遺伝的変化を何ら生じることなく、DNA傷害の回避を極めて正確に行うことが可能である。また、染色体の分配が起きるまでの期間はドナー鎖とレシピエント鎖（自然DNA傷害が存在するDNA分子）間の物理的な距離が常に接近しており、相同組換え反応による回避をより素早くかつ効率的に行なえるという点でも有利である。*rad52* 欠損株で生じた染色体喪失が本来姉妹染色分体間の組換えによって行われる自然DNA傷害回避反応の失敗を反映していると仮定した場合、野生株において長さ約330 kbの第III染色体当りに生じる姉妹染色分体間の組換えの頻度は約 3.3×10^3 であると試算することができる（表III-7）。野生株において、第III染色体のセントロメア～*URA3* 遺伝子マーカー間（約100 kb）で生じる相同染色体アリル間の組換え頻度は 4.3×10^3 であることから、単位区間あたりに生じる相同組換え反応において、姉妹染色分体と相同染色体がパートナー（相同組換え反応の相手）として用いられる比率は概ね25 : 1であると考えられる。KadykとHartwellによる報告でも、UVや放射線照射によって誘発されるDNA傷害が相同組換え機構によって修復を受ける場合、姉妹染色分体が相同染色体よりも優先的にパートナーとして利用されることが明らかとなっている（Kadyk and Hartwell 1992 ; Kadyk and Hartwell 1993）。

本研究では姉妹染色分体間の組換えがエラーフリーな自然DNA傷害回避反応の実体であることが示唆されたが、LOH解析系ではあくまで姉妹染色分体間の組換えの失敗をLOHという形で間接的に観察しているに過ぎず、姉妹染色分体間の組換えそのものを直接検出している訳ではない。前述のKadykとHartwellらが観察した姉妹染色分体間の組換えに関しても、実際には姉妹染色分体間の異所性組換えという形で遺伝学的な検出を行っている。結局の所、姉妹染色分体間の組換えの様なエラーフ

リーなイベントを遺伝学的手法によって検出することには限界があり、従って今後の課題として細胞生物学的なアプローチ等を用いてこの様な現象を直接的に解析する必要があると思われる。

野生株では、交叉に分類されたクローンの6%が染色体喪失を伴っていた（図I-1 B-a'）。この頻度は 2.5×10^{-4} であり、「交叉」と「染色体喪失」が独立した事象として発生した場合の頻度のおよそ900倍にも達する。従って、この染色体喪失を伴う交叉は、相同染色体アリル間組換えの最終過程において何らかの原因により片方の染色体が失われた結果ではないかと考えられている（Hiraoka et al. 2000）。今回LOH解析を行った相同組換え関連遺伝子の各欠損株においてもこの染色体喪失を伴った交叉は検出されたが、これらの欠損株では染色体喪失の頻度が極めて高かったため、この種のLOHイベントが野生株で生じたものと同じメカニズムで発生したものかどうかを判断することは出来なかった。

IV-2 染色体の安定な維持にはRAD52、RAD51 およびRAD50 遺伝子全てが必要である

相同組換え機構に関連した遺伝子の単独欠損株；*rad52*、*rad51* および*rad50* 欠損株のLOH解析結果で共通して観られた傾向として、いずれの欠損株もLOH頻度の上昇がほぼ同じレベルであり、その大半が染色体喪失であったという点が挙げられる（図III-5）。この結果をもって、姉妹染色分体間の組換えによる自然DNA傷害のエラーフリーな回避は、3つの遺伝子全てが揃った時にのみ効率的に行われる、言い換えれば、RAD52、RAD51 およびRAD50 遺伝子全てが要求される決定的な一つの「主要組換え経路」と言うものが存在し得る、という仮説をたてた。この点について検討するため、本研究では*rad50 rad52* および*rad51 rad52* 二重欠損株を作製してLOH頻度の測定を行った。その結果、いずれの二重欠損株も*rad52* 単独欠損株のLOH頻度に対し相乗的な上昇を示さなかったことから、3つの遺伝子が一つの「主要組換え経路」上で働いている仮説が裏付けられた。*rad50 rad52* 二重欠損株に関しては*rad52* 単独欠損株のLOH頻度に対し約1.8倍の上昇を示したが、これはRad50pがDNAダメージチェックポイント機構にも関与していることに起因していると考えられる（詳細はIV-6で後述）。

IV-3 染色体再編を生じる複数の相同組換え経路

rad52、*rad51* および *rad50* 欠損株では染色体喪失がLOHの大半を占めていたが、一方で染色体喪失以外の様々なLOHイベント、とりわけ染色体再編に関しては各欠損株間で大きな違いが観られた（図III-6、表III-7）。このことは、染色体再編の発生には複数の異なる相同組換え経路が関与しており、各欠損株の結果にはそれぞれの株で利用可能な組換え経路の種類や寄与度が反映されていることを示している。自然DNA傷害の相同組換え機構による回避反応が主に姉妹染色分体間で行われるとするならば、交叉や遺伝子変換、転座や不等交叉といった相同染色体間や他の染色体との相同組換え反応はどのような状況で生じるのであろうか？考えられる第一の可能性としては、DNA複製中に発生した傷害が組換えによって修復される際、姉妹染色分体間の距離が何らかの原因によって離散してしまい、姉妹染色分体以外の部位と組換えを生じることが考えられる。姉妹染色分体以外の染色体との組換えは相同染色体アレル間の組換えや異所性の組換えによるLOHを引き起こす。このような状況は細胞にとって不利益な点が多いため、通常は抑制される様な制御を受けていることが予想される。第二の可能性は、姉妹染色分体が存在しないG₁期に発生した自然DNA障害が回避される場合に、相同染色体あるいは他染色体の相同配列を有する部分が相同組換え反応のパートナーとして選択されることが考えられる。

IV-3-1 *RAD52* 遺伝子依存적および非依存적組換え経路

rad52 欠損株では、相同染色体アレル間の組換えと異所性組換えの双方の頻度が一般的に野生株より減少したことから（図III-6、表III-7）、LOHを生じるあらゆるタイプの染色体再編が*RAD52* 遺伝子依存적相同組換えによって行われていることが示された。一般的に*rad52* 欠損はヘテロアレル間の相同組換えやDouble strand break修復を劇的に減少させることが知られているが（Paques and Haber 1999）、本研究における*rad52* 欠損による染色体再編の減少は最大でも野生株の10%程度に留まっていた。さらに、*rad52* 欠損株ではTy1や*MAT*、*HMR*の相同性を介した転座・不等交叉や染色体内欠失が検出された（表III-4）。これらの結果は*RAD52* 遺伝子に依存しない相同組換え経路が存在し、この経路が染色体再編に寄与していることを示している。このような*RAD52* 遺伝子非依存적相同組換えは、繰返し配列間で生じる欠失として観察されている（Klein 1995 ; Paques and Haber 1999）。この欠失は、自然発生によるものとHOエンドヌクレアーゼで形成したDouble strand breakによって誘発されるものの双方が観られている。とりわけDouble strand breakで誘発された繰返し配列間の欠

失は、SSAによって生じたものであると考察されている（図I-5 B）。本来、SSAは *RAD52* 遺伝子産物（Rad52p）の持つアニーリング活性によって行われるが、SSAに利用される相同領域が長くなる程 *RAD52* 遺伝子の要求性は低くなることが知られている（Paques and Haber 1999）。本研究では *rad52* 欠損株に生じた異常染色体の融合部に *MAT-HMR* や *Ty1* といった繰返し配列が存在することが示された。これらの長さはそれぞれ1.6 kb、6 kbであり、これは *RAD52* 遺伝子非依存的なSSAが生じるには十分な相同性である（Klein 1995）。従って、*rad52* 欠損株で生じた染色体再編にはこの種のSSAが関与しているのではないかと推測される。また、相同染色体アリル間の組換えに関しては、*rad52* 欠損株では交叉が野生株の10%まで減少したものの、完全に消滅した訳ではなかった。遺伝子変換に至っては野生株とほぼ同じ頻度で生じていた。これらの染色体再編も *RAD52* 遺伝子非依存的な相同組換えによって生じたことが考えられる。交叉に関しては相同染色体の同じ部位にDouble strand breakが同時に発生した場合、SSAによってやはり交叉として分類される様な染色体再編を生じる可能性があるが、遺伝子変換に関してはその発生過程にSSAが関与していると仮定した場合非常に複雑なプロセスを経ることになる。出芽酵母には *RAD52* 遺伝子の機能を部分的に補う様な未知の遺伝子が存在し、それによって鎖交換反応やBIRが行われる結果、交叉や遺伝子変換が発生しているのかも知れない。*rad50 rad52* および *rad51 rad52* 二重欠損株によるLOH解析結果では、クラスBとクラスCの頻度が *rad52* 単独欠損株と同程度か、*rad50 rad52* 二重欠損株ではむしろ上昇する傾向があったことから（表III-2、図III-4）、*RAD52* 遺伝子非依存的な相同組換え経路は *RAD50* および *RAD51* 遺伝子には余り依存していないことが判明した。この *RAD52* 遺伝子非依存的な相同組換え経路の実体を明らかにするためには、遺伝学的解析によってこの経路が要求する遺伝子を同定する必要があると思われる。

IV-3-2 *RAD51* 遺伝子は異所性組換えを抑制する

rad51 欠損株では、異所性組換えの頻度が野生株に対し上昇した（図III-6、表III-7）。また、*rad51* 欠損株に生じた異常染色体は、調べた限り全て *Ty1* や *MAT-HMR* の相同性を介した異所性組換えにより形成されていた。このことから、*RAD51* 遺伝子は異所性組換えを抑制する役割を果たしていることが明らかになった。アリル間の組換えに関しては、遺伝子変換は検出されず、交叉の頻度は野生株の45%と若干の減少を示していた。これら知見を総合して考えると、*RAD51* 遺伝子は、相同組換えのパートナーとして姉妹染色分体や相同染色体アリル部位が優先される様な、“忠実度の高い”組換えにおいて機能していると推測される。BIRやSSAといった相同組換え経路は *RAD51* 遺伝子の欠損下でも機能することが知られていることから

(Paques and Haber 1999)、本研究において*rad51* 欠損株で観察された異常染色体はこれらの経路によって形成されたのではないかと考えられる。

近年、*in vitro*の実験において、精製したヒトのRad52pが相同性を利用してD-ループを形成することがKagawaらによって報告されている (Kagawa et al. 2002)。このようなD-ループ形成は、本来大腸菌RecAのホモログであるRad51pが中心となっており、Rad52pの役割は主としてRPAに保護された単鎖DNA上にRad51pをリクルートすることだと考えられていた。従って、Rad52p自体がD-ループ形成を行うという知見は非常に興味深いものである。BIRによる相同組換え反応では初期にD-ループの形成が関与すると考えられていることから (図I-5A)、Rad51pの非存在下では特にRad52pに依存したD-ループ形成を伴うBIRが異所性組換えを増加させる一因となっているのかも知れない。さらにShibataらは異所性の部位間で繰返し配列を介した組換え中間体が形成された場合、Rad51pを含むRecAタイプの蛋白がこれらを認識して排除する機能があるのではないかと提唱している (Shibata et al. 2002)。*rad51* 欠損株ではこの機能が失われるため、異所性の組換えが上昇していることが考えられる。

Rad51pによる鎖交換反応は、一般に相同組換え反応の中心的存在として位置付けられており、遺伝子変換や交叉といった組換え反応は主にこの蛋白によって生じると考えられている (Paques and Haber 1999; Sung et al. 2000)。本研究では、*URA3* 遺伝子マーカーの遺伝子変換によるLOHは*rad51* 欠損株で1クローンも検出されず、野生株に対しての増減を判断することが不可能であった (表III-3、表III-7)。交叉に関しては、*rad51* 欠損株では野生株の45%と若干減少したに過ぎなかった。当LOH解析系で相同染色体間の交叉として分類している染色体再編は、S~G₂期で相互交叉だけでなく、細胞周期全体を通した非相互的なBIRによっても生じ得る。また、本稿VI-3-1でも述べた様に、SSAでも交叉として分類される様な染色体再編を生じる可能性がある。*rad51* 欠損株ではBIRもSSAも生じることから、この欠損株で観られた交叉は、これらの*RAD51* 遺伝子非依存的な相同組換え経路によって形成されたのではないかと推測される。

IV-3-3 *RAD50* 遺伝子は姉妹染色分体間の組換えを促進する

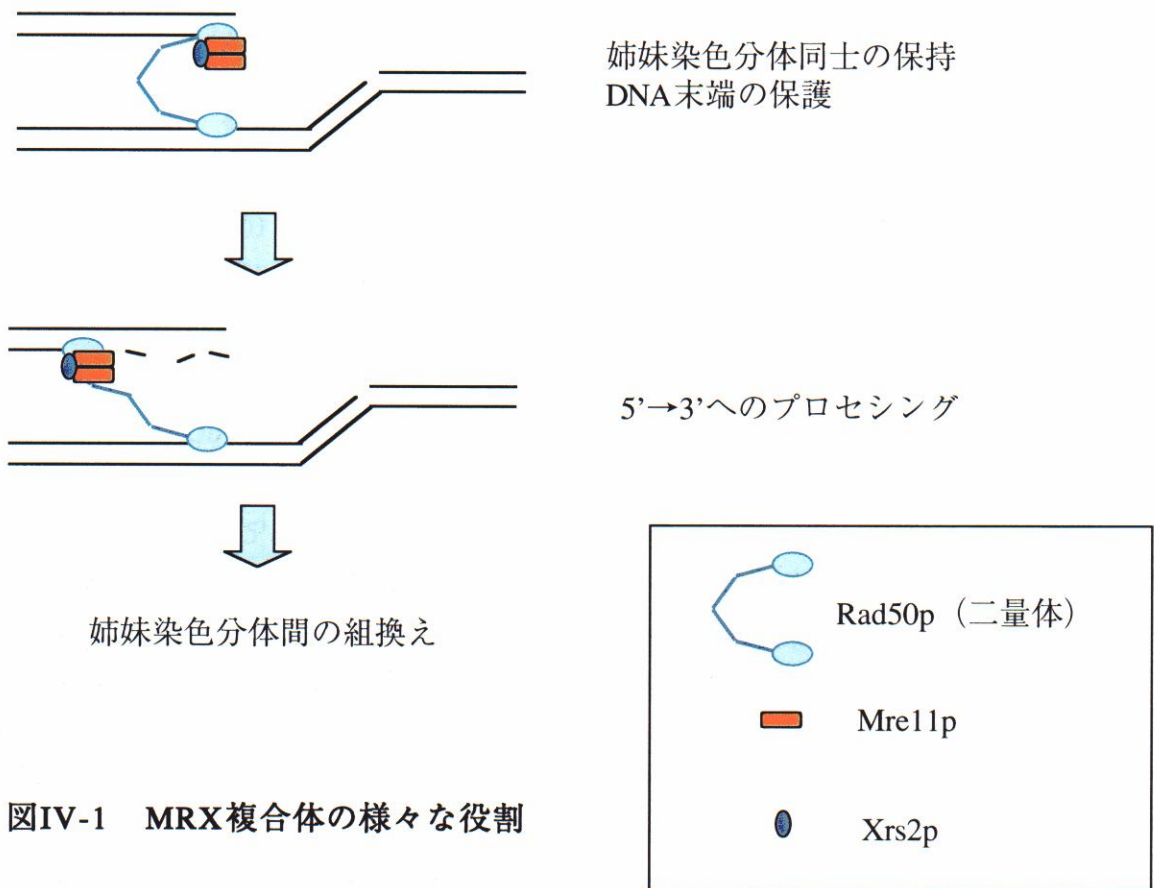
rad50 欠損株では、相同染色体アリル間の組換えと異所性組換えの双方の頻度が一般的に野生株より上昇した (図III-6、表III-7)。*rad50 rad52* 二重欠損株ではクラスBの頻度が*rad50* 単独欠損株より減少することから (表III-3)、*rad50* 欠損株で上昇する染色体再編の大部分は*RAD52* 遺伝子に依存することが示された。つまり、*RAD50* 遺伝子は本来これらの染色体再編を抑制していると言える。また、*rad50 rad52* 二重

欠損株のクラスBの頻度は*rad52* 単独欠損株よりも約16倍に上昇していることから (表III-3)、*RAD50* 遺伝子は*RAD52* 遺伝子依存的だけでなく非依存的な相同組換え反応をも抑制していることが示された。このような組換えが上昇するいわゆる“hyper-rec”な表現型は*rad50*欠損をもつ株の特徴の一つであり、*rad50*欠損株では自然発生する相同染色体アレル間の組換えが野生株に対して上昇することが知られている (Malone et al. 1990)。*rad50*欠損株には*RAD52*および*RAD51*遺伝子が依然として存在していることから、これらの遺伝子が染色体再編の上昇に寄与しているのではないだろうか。

一方、*rad50*欠損株におけるLOHの大半は、*rad52*欠損株や*rad51*欠損株と同様染色体喪失で占められていることから (図III-5)、*RAD50* 遺伝子はむしろ姉妹染色分体間の組換えにおいて重要な働きをしていることが推測される。本稿IV-1で挙げた姉妹染色分体間の組換えによる自然DNA傷害の回避という概念を参考にすれば、*RAD50* 遺伝子は相同組換え反応において姉妹染色分体の正確な部位を優先的にドナー配列として用いる様に積極的に働いていると考えることができる。*rad50*欠損株ではこの機能が失われてしまうため、大半の自然DNA傷害は回避されずに染色体喪失を引き起こし、一部の自然DNA傷害に関しては利用可能な相同組換え経路によって副次的に姉妹染色分体以外の部位と染色体再編を生じているのではないかと推測される。*Rad50p*はDNA結合モチーフをもつ蛋白で、*Mre11p*と*Xrs2p*と共にMRXと呼ばれる複合体を形成することが知られている。遺伝学的解析により、このMRX複合体の構成因子を欠損した株では放射線照射により誘発される姉妹染色分体間の組換えが低下するという報告がなされている (Bressan et al. 1998; Bressan et al. 1999; Ivanov et al 1992)。

MRX複合体はそのヌクレアーゼ活性により、DNA末端の単鎖DNA部位の形成、すなわち5' → 3' 方向のプロセッシングに関与していると考えられている。実際出芽酵母では、MRX複合体がHOエンドヌクレアーゼの発現により形成されたDouble strand break末端のプロセッシングに関与することが知られている (Ivanov et al. 1994; Lee et al. 1998; Tsubouchi and Ogawa 1998)。

しかし、*RAD50* 遺伝子の役割はDNA末端のプロセッシングだけに留まらない。近年では、*Rad50p*がSMC; Structural maintenance of chromosomeとよばれるファミリーに属する蛋白と非常によく似た構造を持つことが生化学的に示されている。真核生物の姉妹染色分体接着において、“糊”として働くコヒーシはこのSMCファミリーに属している。このことから考えると、MRX複合体はコヒーシンの様に姉妹染色分体同士やDNA末端同士を繋ぎ止め、それらの離散を防いでいる可能性がある (図IV-1)。ただし、実際にMRX複合体が姉妹染色分体の接着に関与するかどうかは検証されていない。以上の様に、MRX複合体は複数の事象に関与しているものと推測される。



図IV-1 MRX複合体の様々な役割

Double strand end型のDNA傷害が発生した場合、MRX複合体は姉妹染色分体同士の離散を防ぎ、同時にDNA末端の保護と5'→3'へのプロセッシングを行って、姉妹染色分体間の組換えを促進しているのではないかと考えられる。

以上の知見を総合して考えると、*rad50* 欠損株では「DNA末端のプロセシング」と「姉妹染色分体同士の接着」の双方の現象に問題が発生していることが予想される。しかし、LOHの上昇や染色体再編の上昇がどちらの現象に起因しているかを本研究の結果だけから判断するのは難しい。これを明らかにする為には、例えば *rad50S* 変異 (Alani et al. 1990) といった、DNA末端のプロセシングだけが不活化する (と考えられている) 変異アレルを導入してLOH解析を行うといったアプローチが考えられるだろう。*rad50* 欠損株とは異なり、*rad50S* 変異株はMMSに耐性を示すことから (Alani et al. 1990)、少なくともMMSによって誘発するDNA傷害の回避にはDNA末端のプロセシングは必須ではないと推測されている。DNA傷害の回避という点に関して、もしかしたら *RAD50* 遺伝子の中心的役割は姉妹染色分体同士の接着にあるのかも知れない。

前述した様に、*rad50* 欠損株における染色体再編の発生過程には *RAD52* や *RAD51* 遺伝子依存的な組換え経路が関与していることが推測される。しかし、それらは通常と異なる形態、つまり5' → 3' 方向のプロセシングを受けていないDNA末端を基質としなければならない筈だ。本研究では *rad50* 欠損株における染色体再編は低下せず、むしろ上昇する傾向が観られた。従って、少なくとも姉妹染色分体以外の部位との相同組換え反応には、DNA末端のプロセシングは必ずしも必須ではないことが示された。この点に関しては、MRX複合体以外のヌクレアーゼ活性を持つ蛋白やヘリカーゼ等によって、相同組換え反応の開始に必要な単鎖DNA部位の形成が行われた可能性が考えられる。

以上の様に、*RAD50* 遺伝子は姉妹染色分体同士の離散の抑制や、DNA末端のプロセシングといった多くの役割を持ち、姉妹染色分体間の組換えを保証する働きがあるものと推測される。*Rad50p*が姉妹染色分体間の組換えに関与しているとするならば、*rad50* 欠損株で *MAT-HMR* 間の染色体内欠失だけが上昇しなかったことを説明することが可能である。この種の欠失の発生メカニズムとしてはSSAが考えられるが、姉妹染色分体間の異所性組換えでも同様の欠失が生じ得る。後者が *MAT-HMR* 間の欠失の主要な発生機構であるとした場合、*rad50* 欠損株でこの種の欠失の頻度が上昇しなかったのは、姉妹染色分体間の相互作用が失われたためであると考えて矛盾はない。

rad50 欠損株では、*ADE2* 遺伝子マーカーのホモ化という特徴的な現象が見い出された。染色体再編をクローンの4~5% (頻度にして4~5 x 10⁻²) は *ADE2* 遺伝子マーカーのホモ化を生じていることが明らかとなった。III-1-8では詳細を述べなかったが、予備的な実験として、LOH解析と同じ条件で培養した *rad50* 欠損株親株二倍体クローンを本培養液中からランダムに抽出し、その *ADE2* 遺伝子マーカー挿入領域の構造を調べた。5つの独立した実験区で測定を行った結果、*ADE2* 遺伝子マーカーのホモ化の頻度は3.2 x 10⁻²であり、これはLOHクローンで算出した頻度とほぼ同等である

ことが判明した。従って、*ADE2* 遺伝子マーカーのホモ化という現象はLOHの有無に関わらず生じていることが示された。一方でこの予備実験では*ADE2* 遺伝子マーカーが+/- → -/- へと変化する（以下ヌル化と呼ぶ）頻度も測定したが、その頻度は 4.6×10^3 とホモ化の場合に対して低いものであることが判明した。では、*ADE2* 遺伝子マーカーのホモ化とヌル化でこの様な頻度の違いが生じるのは何故だろうか？本研究では、本培養に供する親株二倍体細胞を予備培養する際、ウラシル、アデニン、ロイシンを除去した合成培地を用いることで第III染色体上の3つのマーカーの保持を保証している。ところがこの予備培養では、*ADE2* 遺伝子マーカーに関してヌル化した細胞の増殖は抑制される一方、ホモ化した細胞は問題なく増殖することが可能である。既に述べてきた様に*rad50* 欠損株では種々の染色体間組換えが上昇することから考えて、予備培養中に*ADE2* 遺伝子マーカーのホモ化が生じている可能性は極めて高い。予備培養液から本培養液へ100 cfuを接種する際に、ホモ化を生じた細胞が仮に1 cfuでも本培養液に持ち込まれば、その頻度は理論上 1×10^2 となる。この頻度はLOH解析や先に述べた予備実験で得られた値と非常に近い。従って、*ADE2* 遺伝子マーカーに関してヌル化よりもホモ化の頻度が高かったのは、予備培養液からの持ち込みがあったためと推測される。本研究では、*rad50* 欠損株に生じた染色体再編を分類する際、この*ADE2* 遺伝子マーカーのホモ化を考慮して行った。その際にヌル化を考慮した補正を行わなかったのは、その影響が非常に小さく無視できる程度だったためである。例えば、クラスBにおいて正常な長さの第III染色体を2コピー保持するクローンは交叉として分類しているが、実際には*ADE2* 遺伝子マーカーのヌル化を伴った遺伝子変換が含まれるはずである。*ADE2* ヘテロクローンにおける遺伝子変換（図I-1 C-b）の頻度は 8.3×10^6 （表III-5）であるので、仮に遺伝子変換にヌル化が生じたとした場合、その頻度は $8.3 \times 10^6 \times 4.6 \times 10^3 = 3.8 \times 10^8$ となる。この頻度は*ADE2* ヘテロクローンにおける交叉（図I-1 B-a）頻度、 4.5×10^4 （表III-3）の1%未満となる。

ADE2 遺伝子マーカーのホモ化という現象は、*rad50* 欠損株だけでなく*sgs1* 欠損株（安島 2001年修士論文；Ajima et al. 2002）や*rad18* 欠損株のLOHクローンにも同じ頻度で見受けられた。これらの欠損株はいずれも“hyper-rec”な表現型を示していることから、*ADE2* 遺伝子マーカーのホモ化には組換えの上昇が寄与していると考えられる。*rad50* 欠損株や*sgs1* 欠損株ではテロメア配列の短縮化が報告されている（Boulton and Jackson 1998；Kironmai and Muniyappa 1997；Nugent et al. 1998；Johnson et al. 2001）。これらの知見から、第III染色体の末端部、テロメアに近い部位に挿入された*ADE2* 遺伝子マーカーがホモ化を生じる原因の一つとして、染色体末端のDNA配列が不安定になっていることが考えられる。しかし、*rad18* 欠損株ではテロメア近傍での不安定性は今のところ報告されていない。従って、*ADE2* 遺伝子マーカーのホモ化は必ずしもテロメア近傍での不安定性とリンクしていないか、あるいは*RAD18* 遺伝

子も*RAD50* 遺伝子や*SGS1* 遺伝子と同様にテロメアで何らかの機能を果たしている可能性が考えられる。

IV-4 相同組換えの代替経路としての複製後修復

IV-4-1 *rad52* および*rad51* 欠損株では点突然変異が上昇する

rad52 および*rad51* 欠損株では、*URA3* 遺伝子マーカー内の点突然変異頻度が野生株の約25倍と同程度に上昇し（図III-6、表III-7）、マーカー内の塩基配列を決定したところ*rad52* 欠損株ではその8割が塩基置換、残り2割が-1フレームシフトによる変異であることが判明した（表III-6）。これらの欠損株では、自然発生およびUV照射による点突然変異の上昇が以前より報告されている（Liefshitz et al. 1998 ; Morrison and Hastings 1979 ; Paulovich et al. 1998 ; Roche et al. 1995）。野生株二倍体では点突然変異としてG:C→T:Aの塩基置換が2クローン検出されたが、これらは同一実験区から検出され、*URA3* 遺伝子ORF内における変異の位置も一緒だった（表III-6、Hiraoka et al. 2000）。この2クロンの起源は同じクローンであると考えられるため、野生株における点突然変異の頻度は過大評価されている可能性がある。従って、*rad52* および*rad51* 欠損株における点突然変異頻度は野生株に対して最小で約25倍、最大で50倍上昇している計算になる。

以上の結果から、相同組換え経路、とりわけ*RAD51* 遺伝子が関与する鎖交換型の組換え経路が不活化したために、本来この経路が行っていた自然DNA傷害の回避が何らかの別の代替経路にスイッチされ、その結果として塩基置換が発生したことが示唆された。一般的に塩基置換を発生させるメカニズムとしては、鋳型としての塩基情報を失ってしまう様なDNA損傷が生じた部位に無理矢理塩基を挿入してDNA合成を行う、損傷乗り越えDNA合成が知られている。従って、代替経路の実体はこの損傷乗り越えDNA合成であることが推測された。実際、Rocheらにより、*rad52* 欠損によって一倍体株の*SUP4-o* 遺伝子に発生する変異が、損傷乗り越え型DNAポリメラーゼの触媒サブユニットをコードする*REV3* 遺伝子の欠損によって抑制されることが報告されている（Roche et al. 1995）。また、損傷乗り越えDNA合成機構はDaughter strand gapを基質としていることから、出芽酵母の細胞内に発生する自然DNA傷害にはDaughter strand gapが含まれており、それらは相同組換え機構によって回避されている可能性がある。

rad50 欠損株では点突然変異は検出されず、野生株に対してどの程度増減しているのかは明らかにできなかった（図III-6、表III-7）。しかし、MRX複合体がDNA末端

に優先的に結合すること (Chen et al. 2001 ; D'Amours and Jackson 2002 ; De Jager et al. 2001) から考えると、*RAD50* 遺伝子はDaughter strand gapの回避には余り寄与していないことが予想される。IV-4で詳細を述べた様に、*rad50* 欠損株では姉妹染色分体以外の部位と生じる染色体再編が上昇することから、Daughter strand gapは損傷乗り越えDNA合成が生じるよりも先に、染色体間の相同組換え反応によって回避されているのではないかと推測される。

IV-4-2 *RAD18* 遺伝子は自然DNA傷害のエラーフリーな回避に寄与する

IV-4-1で述べた様に、*rad52* および*rad51* 欠損株では野生株に対し点突然変異の頻度が上昇していたことから、出芽酵母の細胞内に発生する自然DNA傷害には損傷乗り越えDNA合成の基質となる様なDaughter strand gap型のものが含まれていることが示唆された。このことは、見方を変えれば損傷乗り越えDNA合成も相同組換えと同じ様に自然DNA傷害の回避に寄与している可能性を物語っている。相同組換え機構の場合、その機能を不活化することによって、LOHの上昇と言う間接的な形ではあるが初めてエラーフリーな経路の存在 (姉妹染色分体間の組換え) を明らかにすることができた。注意すべき点として、*rad52* および*rad51* 欠損株で検出された点突然変異は、あくまでLOHとして検出可能なエラーを生じるタイプの損傷乗り越えDNA合成経路によるものである、ということが挙げられる。逆に言えば、その背後にエラーフリーな損傷乗り越えDNA合成が自然DNA傷害を回避している可能性がある。現に、損傷乗り越えDNA合成はエラーフリーな経路とエラーを生じる経路の2種類に分類されることが知られている (Broomfield et al. 2001)。これらの経路の全体像を掴むためには、相同組換え欠損株の場合と同様にその機能を不活化する必要があると思われた。そこで本研究の第二段階として、損傷乗り越えDNA合成機構の役割を明らかにするため、これらの経路に関連する遺伝子の欠損株でLOH解析を行った。実際には、損傷乗り越えDNA合成は複製後修復と呼ばれる機構の一部に含まれることが知られている (図I-6)。出芽酵母では複製後修復機構は*RAD6-RAD18* 遺伝子により制御され、その下流に*RAD5*、*RAD30*、および*REV3* 遺伝子それぞれが関与する複数の経路が知られている。*RAD6-RAD18* 遺伝子がどのような分子機構で複製後修復機構を制御しているのかは余り明らかになっていない。現在のところ、*RAD6* および*RAD18* 遺伝子はユビキチン結合を介した蛋白質分解に関与していることが判明している (Hoege et al. 2002 ; Pickart 2002)。一般的に、この複製後修復機構がDaughter strand gap型のDNA傷害の回避に関与していると考えられている。

本研究ではまず、*rad18* 欠損に生じるLOHの解析を行った。*RAD6* 遺伝子の欠損株を用いなかった理由は、この遺伝子が複製後修復機構だけでなく、テロメアのサイ

レンシングや胞子形成といった複数の事象にも関与することが知られているためである (Huang et al. 1997 ; Morrison et al. 1988) 。 *rad18* 欠損株で生じるLOHには、複製後修復機構のみが全般的に不活化してDaughter strand gapの回避が全く行えなくなる様な状況が反映されることが予想された。

解析の結果、*rad18* 欠損株ではLOH頻度が野生株の12倍に上昇し、染色体喪失と相同組換えによる染色体再編の双方が上昇していることが判明した (図III-22) 。 *rad18* 欠損株の染色体喪失頻度は 8.7×10^{-4} なので、染色体崩壊の回避における複製後修復機構の寄与度は相同組換え機構の約1/4程度に相当することが明らかとなった。また、*rad18* 欠損株ではLOHとして検出可能な染色体再編の全ての種類が上昇しており (図III-25、表III-12) 、それらは*rad18 rad52* 二重欠損株では*rad52* 単独欠損株と同レベルまで低下することから*RAD52* 遺伝子に依存していることが判明した (図III-23、図III-24) 。 この様な、*rad18* 欠損による“hyper-rec”な表現型は他の研究グループによっても報告されている (Liefshitz et al. 1998) 。 染色体再編の上昇は、Daughter strand gapの回避が複製後修復機構で対処できなかったためにその代替経路として相同組換え機構が利用された可能性を示唆している。この関係は、*rad52* 欠損株において相同組換えの代替経路として損傷乗り越えDNA合成が利用されるという仮説と全く逆のパターンである。

rad18 欠損株で染色体喪失や染色体再編といったLOHが上昇した原因には以下の2つの可能性が考えられる。第一の可能性は複製後修復機構が欠損した結果、一部のDaughter strand gapの回避を適切に行うことができず、最終的にLOHが生じてしまう、というもの。*rad18* 欠損株では相同組換えに関与する蛋白群は正常に機能するはずなので、LOHの原因となったDaughter strand gapは本来複製後修復機構のみに回避を依存し、相同組換え機構の基質としては適さない様な種類であることが考えられる。この種のDaughter strand gapが無理矢理相同組換えで回避される場合には、どこかに無理が生じ、エラー、すなわちLOHを起こしやすくしてしまうのかも知れない。あるいは、この種のDaughter strand gapが未回避のまま放置され、次回のDNA複製時にその部位で複製フォークの崩壊が生じ、その結果Daughter strand gapがDouble strand endに変換される。この様にして形成されたDouble strand endはある程度相同組換え機構によって回避されるはずであるが、*rad18* 欠損株ではDouble strand endの量が相同組換え機構の許容量を超えてしまい、最終的にLOHの上昇を引き起こしていることが考えられる。裏を返せば、Daughter strand gapの中には複製後修復機構よりもむしろ相同組換え機構による回避の方が好ましいものも存在していることが考えられる。*rad52* 欠損株では、それらが無理矢理複製後修復機構によって回避された結果、点突然変異の頻度が上昇してしまうのかも知れない。Daughter strand gapと一括りにしている自然DNA傷害は、実際には質的に異なるいくつかのものに分類され、その種類や発生した部位・シチュエーションの違い (例えばDaughter strand gap発生の原

因となったDNA損傷の種類、細胞周期、リーディング鎖とラギング鎖のどちらに存在するか等の違い)によって最適な回避機構が異なっていることが考えられる。第二の可能性は、*rad18* 欠損株では相同組換え全般が上昇していることから、このこと自体がLOHの上昇に寄与しているとするものである。生物物理学的には、どのような機能蛋白質であっても低頻度ではあるが固有の確率で内在的なエラーを起こすことが知られている。従って、野生株や*rad18* 欠損株に生じている染色体喪失や染色体再編は、姉妹染色分体間の組換えが生じる際の一種のエラーによって生じた、とも捉えることもできる。例えば野生株では染色体喪失を伴う交叉が観られたが、この結果は相同組換え反応に伴って染色体喪失が引き起こされ得ることを示唆している。*rad18* 欠損株では染色体喪失を伴う交叉の頻度が野生株の19倍に上昇していたことから、この種のメカニズムが染色体喪失の上昇に寄与していることが推測される。この相同組換えに伴う染色体喪失のメカニズムは、本研究で用いているLOH解析系では交叉や遺伝子変換に関してしか検出することが出来ない。しかし、同様の現象が姉妹染色分体間の組換えにおいても発生しており、かつ*rad18* 欠損株で姉妹染色分体間の組換えが上昇している場合には、染色体喪失の上昇は姉妹染色分体間の組換えの上昇に起因していると考えられる。Yamashitaらは、ニワトリのDT40細胞で*RAD18* 遺伝子を欠損させた場合、自然発生する姉妹染色分体間の組換えが野生株に対して約3倍に上昇することを光学顕微鏡下で観察している (Yamashita et al. 2002)。出芽酵母の*rad18* 欠損株でもDT40細胞と同様に姉妹染色分体間の組換えが上昇していることが考えられる。可能性1の時と同様、同じことが*rad52* 欠損株における点突然変異頻度の場合にも言える。すなわち、*rad52* 欠損株では複製後修復機構の利用量が増え、それに伴うエラーの量も増大してしまったと考えることも可能である。

rad18 欠損株では種々の染色体再編が上昇したが、本研究では*rad50* 欠損株でも染色体再編の上昇が観られている。*rad50* 欠損株では姉妹染色分体間の組換えが行えなくなってしまう結果、組換えのパートナーとして相同染色体や他の染色体が用いられていることが推測されているが(本稿IV-3-3)、逆に*rad18* 欠損株では前述した様に相同組換えが代替経路として働き、その一部が一種のエラーの様な形で染色体間組換えを引き起こしていることが推測される。以上の様に“hyper-rec”な表現型を示す原因は、*rad50* 欠損株と*rad18* 欠損株では全く異なるものであると考えられる。

rad18 欠損株における遺伝子変換以外の各種染色体再編の頻度はいずれも野生株の数倍~20倍程度であったが、一方で遺伝子変換の頻度に関しては驚くべきことに野生株の約300倍と劇的な上昇を示した。これは*rad18* 欠損株だけに特徴的な現象であり、“hyper-rec”な表現型を示す*rad50* 欠損株や*sgs1* 欠損株には観られなかったものである。*rad18* 欠損株においてこの種の組換えが劇的な上昇を示すという報告は今迄になされていない。この劇的な上昇の具体的な分子機構を考察することは今の所困

難であるが、少なくともこの結果は「自然DNA傷害の回避において相同組換え機構が複製後修復機構を代替した」ことに起因しており、遺伝子変換と相同組換えによるDaughter strand gapの回避との関連性を示しているものと思われる。

rad18 rad52 二重欠損株では、LOH頻度が野生株の59倍と劇的に上昇し、この頻度の 6.5×10^3 という値は、*rad18* 単独欠損株と*rad52* 単独欠損株それぞれのLOH頻度の総和よりも高かった。また、LOHのほぼ全てが染色体喪失によるものであった（図III-22、表III-9）。これらの結果から、細胞内に発生している自然DNA傷害の総体量は、*rad52* 単独欠損株のLOH解析結果から推測できるものよりも更に多いことが考えられる。おそらく、*rad52* 単独欠損株ではDaughter strand gapのかなりの部分が複製後修復によって、また、*rad18* 単独欠損株ではDaughter strand gapのかなりの部分が相同組換えによって、エラーフリーに回避されているのであろう。野生株では、このようなDaughter strand gapは相同組換え機構と複製後修復機構の双方により、部分的にオーバーラップして回避されているものと推測される。ニワトリのDT40細胞では*RAD18* 遺伝子と相同組換え機構に関与する*RAD54* 遺伝子を二重欠損した場合には合成致死となることが報告されている（Yamashita et al. 2002）。出芽酵母でも、両方の機構を二重欠損した場合には、死に至る程ではないものの、染色体の不安定性が非常に悪化してしまうものと考えられる。

以上の様に、Daughter strand gapは複製後修復機構によって回避され、その回避の一部は相同組換え機構によっても代替し得ることが示唆された。では、細胞はDaughter strand gapの回避にあたり複製後修復機構と相同組換え機構の使い分けをどの様な方法で行っているのだろうか？出芽酵母では、*SRS2* と呼ばれる遺伝子がコードする蛋白がDaughter strand gapの回避に際して二つの機構の使い分けの様な制御を行っている可能性が指摘されている（Broomfield et al. 2001）。出芽酵母の*rad6* あるいは*rad18* 単独欠損株一倍体はUV照射に感受性を示すが、これらの株に*srs2* 欠損を導入した場合にはUV照射に対する感受性が抑制され（Lawrence and Christensen 1979 ; Aboussekhra et al. 1989 ; Schiestl et al. 1990a）、さらにこの抑制は相同組換え機構に依存していることが判明している（Schiestl et al. 1990a ; Schiestl et al. 1990b）。これらの知見から、少なくともUV照射によって誘発されるDNA傷害の回避において、*SRS2* 遺伝子が複製後修復機構を優先的に使用する様な制御を行っていることが推測されている。この様な制御の具体的な分子メカニズムはまだ分かっていない。今後は*srs2* 欠損株を作製し、その株に生じるLOHイベントの詳細を解析することによって、*SRS2* 遺伝子が自然DNA傷害に対してどの様な制御を行っているのかを調べる予定である。予備実験による結果では、*srs2* 欠損株に生じるLOHの頻度やクラスA～Cの分布は*rad18* 単独欠損株に酷似することが明らかになっている。加えて、この欠損株で上昇するクラスB・CのLOHは*rad18* 欠損株の場合と同様、*RAD52* 遺伝子に依存することから、染色体再編であることが推測される。しかし、*srs2* 欠損株と

rad18 欠損株とでは全く別の要因で染色体再編が上昇している可能性も否定できない。これを明らかにする為には *srs2 rad18* 二重欠損株を作製し、その株に生じる LOH がそれぞれの単独欠損株に対してどの様に変化するのかを調査する必要があるだろう。また、*srs2* 欠損株に生じるクラス B・C の LOH イベントの詳細な解析を行い、*rad18* 欠損株と比較することも重要であると思われる。将来的にこれらの解析を通じ、自然 DNA 傷害の回避における複製後修復機構と相同組換え機構の相互関係、ならびに、*SRS2* 遺伝子の役割が明らかになることが期待される。

IV-4-3 RAD18 遺伝子下流の経路群の LOH への関与

近年の研究より、*RAD18* 依存性の複製後修復は単純な一つの経路ではなく、少なくとも *RAD5*、*RAD30* および *REV3* 遺伝子それぞれが関与する 3 経路に分類されることが明かとなってきた (Broomfield et al. 2001)。*RAD5* 遺伝子は、*RAD6* および *RAD18* 遺伝子と同様、ユビキチン結合を介した蛋白質分解に関与していることが判明している (Hoegge et al. 2002 ; Pickart 2002)。*RAD5* 遺伝子産物が如何なるメカニズムで DNA 傷害の回避に寄与しているのかは現在の所明らかになっていないが、この遺伝子が関与する経路はエラーフリーに DNA 傷害を回避することが知られている (Johnson et al. 1992 ; Broomfield et al. 2001)。3 経路に関与する遺伝子を欠損した株はいずれも *rad18* 欠損株程ではないが UV 照射に対して感受性を示す。中でも、*rad5* 欠損株は *rad30* 欠損株や *rev3* 欠損株に比べ比較的高い UV や MMS 感受性を示す事が知られている (ただし *rad18* 欠損株程ではない、Xiao et al. 2000)。このことから、*RAD5* 遺伝子の関与する経路は UV や MMS により誘発する DNA 傷害の回避において、比較的重要な役割を果たしているものと推測されている。*RAD30* 遺伝子は損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼ *pol η* をコードし、*REV3* 遺伝子はやはり損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼである *pol ζ* の触媒サブユニットをコードしている。生化学的及び遺伝学的な多くの知見から、*pol η* による DNA 傷害の回避はエラーフリーであるが、*pol ζ* はエラーを生じやすいのではないかと考えられている。また、この他にも PCNA や DNA ポリメラーゼ δ といった DNA 複製に関与する因子群が、何らかの形で複製後修復機構に関与している可能性が示唆されている。

本研究では *rad18* 欠損株で LOH 頻度が野生株に対して上昇したが、この欠損株では *RAD5*、*RAD30* および *REV3* 遺伝子それぞれが関与する経路が全て不活化しているものと推測される。従って、*RAD18* 遺伝子下流の各遺伝子を欠損した株の LOH 頻度を測定することで、どの経路が *RAD18* 遺伝子依存的な LOH の抑制、すなわち自然 DNA 傷害の回避に寄与しているかを明らかにすることができると考えた。

しかし、実際にはいずれの単独欠損株も *rad18* 単独欠損株で観られた様な LOH の上

昇やLOHイベント分布の変化を示さず、野生株とほぼ同じか若干LOH頻度が上昇したに過ぎなかった(図III-22、表III-9)。また、*rad5 rad52*、*rad30 rad52* および *rev3 rad52* それぞれの二重欠損株に関しても、*rad52* 単独欠損株で生じるLOHとの差異は見出せず、*rad18 rad52* 二重欠損株の様な劇的なLOH頻度の上昇は示さなかった(図III-22、表III-9)。これらの結果より、*RAD18* 遺伝子下流の複数の経路に関して、a) *RAD5*、*RAD30* および *REV3* 遺伝子のそれぞれが関与する経路が互いに補完して染色体の崩壊の抑制に寄与しているか、b) *RAD18* 遺伝子下流に、本研究では調べていない別の経路が寄与している、という二つの可能性が考えられた。しかし、*rad18* 単独欠損株に及ばないとは言え、例えば *rad5* 単独欠損株ではLOH頻度が野生株に対して有意に上昇し、また、その中身はあたかも *rad18* 単独欠損株をミニチュア化したかのようなクラス分布を示した(図III-22、図III-23)。特にクラスCが突出して上昇する傾向は、*rad18* 単独欠損株に酷似している。*rad5 rad52* 二重欠損株のLOH解析結果より、少なくともこの部分は *RAD52* 遺伝子依存性の染色体再編であることが推測される。これらの結果より、*RAD5* 遺伝子はUVやMMS処理時と同様、自然DNA傷害の回避という点において比較的重要な役割を果たしているものと考えられる。今後は *rad5* 単独欠損株に生じるクラスBやクラスCのLOHイベントを詳細に解析することで、複製後修復機構における *RAD5* 遺伝子の位置付けや役割を明らかにできることが期待される。

最終的には、*rad5 rad30 rev3* 三重欠損株および *rad5 rad30 rev3 rad52* 四重欠損株を作製してLOH解析を行い、自然DNA傷害の回避における3経路間の相互関係や別の経路の有無を明らかにせねばならないだろう。その前段階として、本研究では先ず *rad5 rev3* 二重欠損株(および *rad5 rev3 rad52* 三重欠損株)を作製し、LOH解析を行う予定である。この組み合わせを選択した理由としては、*rad5* 欠損と *rev3* 欠損がUV感受性に関して synergistic な効果を示す(つまり、*rad5 rev3* 二重欠損株のUV感受性がそれぞれの単独欠損株に対して相乗的に上昇する)という知見が挙げられる(Jhonson et al. 1992)。この知見より、少なくともUV照射により誘発するDNA傷害の回避に関しては、*RAD18* 遺伝子下流の3経路の内、特に *RAD5* 遺伝子と *REV3* 遺伝子がそれぞれ関与する2経路が互いに補完しあう関係であると推測される。ちなみに、*rad30* 欠損に関しては *rad5* 欠損と *rev3* 欠損のいずれとも相加的な関係であることが知られている(Xiao et al, 2000)。

IV-5 NHEJはLOHの発生や抑制には寄与しない

rad52 欠損株では、クラスBにおいて4 bpという極めて少ない相同性を介した転座

が2クローン検出され、その頻度は 2.9×10^{-7} であった(表III-4)。ただし、検出された2クローンは同じ実験区から同定され転座の内容も全く同じだったことから、 2.9×10^{-7} という値は過大評価されている可能性がある。野生株ではこの種の染色体再編は見い出されなかったことから(Umezu et al. 2002)、 2.9×10^{-7} という頻度が野生株に対して有意に上昇しているかかどうかは不明である。これらの結果から、この種の転座の発生プロセスにはNHEJ機構が関与していると推測され、本来相同組換え機構が担っていた自然DNA傷害の回避のごく一部を、この機構が代替して行ったのではないかと考えた。NHEJ機構はDouble strand breakのDNA末端同士をライゲーションし、その回避に関与していると考えられている(Critchlow and Jackson 1998)。従って、出芽酵母の細胞内に発生している自然DNA傷害には、DNA末端を含む形状のもの、すなわちDouble strand breakやDouble strand endが含まれており、これらは通常は相同組換え機構によって回避されていることが推測された。*rad52* 欠損株で検出されたNHEJによると思われる転座はエラーを生じるタイプのものであったため、結果としてLOHとして検出することができた。しかし、裏を返せば、エラーフリーなNHEJ機構がLOHの抑制に寄与している可能性が考えられた。現に、NHEJはエラーフリーなタイプとエラーを生じるタイプの二種類に分類されることが知られている(Moore and Haber 1996)。

そこで本研究ではこのNHEJ機構がLOHに及ぼす影響を調べるため、この機構に関与する遺伝子である*HDF1* 遺伝子を欠損した株を作製し、それらに生じるLOHの解析を行った。解析の結果、*hdf1* 単独欠損株のLOH頻度は野生株とほぼ同じレベルであり、染色体喪失とその他のLOHイベントの比に関しても大きな変化はなかった(図III-30)。また、クラスBとクラスCの分布に関しても野生株に対する顕著な増減は観られなかった(図III-31)。*hdf1 rad52* 二重欠損株に関しても、LOH頻度やクラスA~Cの分布は*rad52* 単独欠損株と同等のものであった(図III-30、図III-31)。これらの結果より、NHEJ機構の寄与度はLOHの発生と抑制のいずれに対しても相同組換え機構や複製後修復機構に比べて遥かに小さいことが判明した。

このような結果が得られた理由には、以下に述べるいくつかの可能性が考えられる。第一の可能性は、少なくともLOH解析条件下では自然DNA傷害の回避におけるNHEJ機構の寄与が非常に小さいというもの。これを支持する知見として、出芽酵母二倍体ではNHEJ活性が低下するという報告がなされている(Astrom et al. 1999)。第二の可能性は、出芽酵母の細胞内において、LOHの原因となる様な自然DNA傷害に関する限り、NHEJ機構の基質となり得る種類のもの、すなわちDouble strand breakはあまり関与していないとするもの。相同組換えが欠損している場合に限り、NHEJ機構は放射線照射などによって形成されるDouble strand breakの修復に大きく寄与することが知られている(Siede et al. 1996)。一方で本研究では、*hdf1 rad52* 二重欠損株のLOH頻度は*rad52* 単独欠損株と同じレベルであった。この結果は、LOH解析条件

下で発生する自然DNA損傷においてDouble strand breakが占める割合が非常に低い可能性を示唆している。一方で、DNA末端のプロセッシングに関与する*RAD50* 遺伝子の欠損はLOHに対して大きな影響を及ぼすことが本研究によって明らかになっていることから、自然DNA傷害にはDNA末端を持つものが含まれていることが示唆されている。従って、この様な自然DNA傷害としては、例えばDNA複製フォークの崩壊により形成されることが示唆されているDouble strand end等が考えられる（詳細はIV-6で後述）。*rad52* 欠損株で検出されたNHEJによる転座は、おそらく第III染色体と第XII染色体の二ヶ所で同時にDouble strand endが生じ、それら同士がNHEJ機構もしくはそれに準じた機構を介してライゲーションされた結果生じたのではないかと推測される。

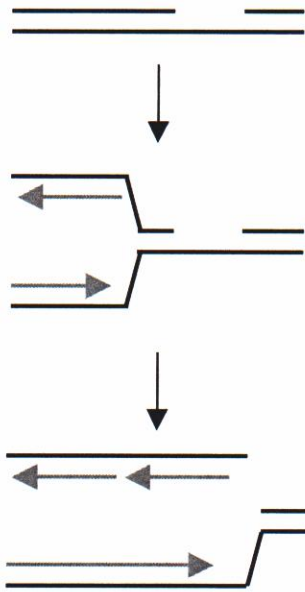
IV-6 自然DNA傷害の実体とは？

本研究では、相同組換え機構や複製後修復機構に関連する遺伝子の欠損株においてLOH解析を行い、出芽酵母の細胞内には染色体の崩壊をもたらす自然DNA傷害が発生している可能性が示唆された。では、自然DNA傷害の実体は一体どのようなものなのだろうか？本研究では、いくつかの知見からLOH解析条件下で発生している自然DNA傷害の実体を推測することができた。*rad52* 欠損株でNHEJによると考えられる転座が検出されたこと、DNA末端のプロセッシングに関与する*RAD50* 遺伝子の欠損株においてLOH頻度が大きく影響を受けたことから、自然DNA傷害にはDNA末端を含むもの、例えばDouble strand endやDouble strand breakが含まれることが示唆された。一方で、Double strand breakの回避に寄与するNHEJ機構の欠損株ではLOHの頻度や内容に大きな変化は認められなかったことから、自然DNA損傷においてDouble strand breakが占める割合は非常に低いことが推測された。また、*rad52* 欠損株で点突然変異頻度が野生株に対して上昇したこと、および、複製後修復に関与する*RAD18* 遺伝子の欠損株においてLOH頻度が大きく影響を受けたことから、自然DNA傷害にはDaughter strand gapが含まれていることが示唆された。留意すべき点としては、LOH解析時にはDNAに傷害を誘発する様な薬剤による処理や放射線・UV照射等は一切行っていないことが挙げられる。このことは、Double strand endやDaughter strand gapは内的要因によって“自然”発生しているDNA傷害であることを示している。

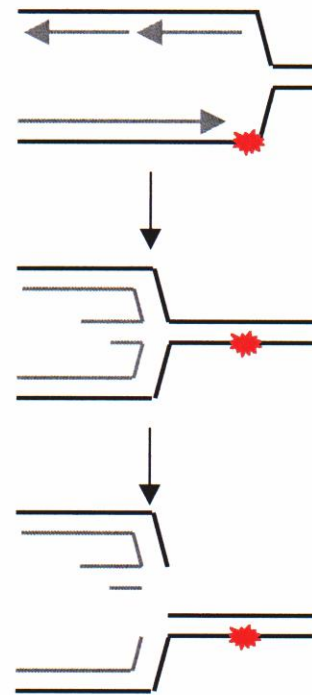
近年、S期のDNA複製時に起こる複製フォークの進行阻害や崩壊がtwo-strand DNA傷害と呼ばれる種類のDNA傷害を引き起こし、それが相同組換えの基質になるというモデルが提唱されている（図IV-2、Cox et al. 2001；Haber 1999；Kuzminov 1999；Kowalczykowski 2000）。DNA複製における複製フォークの進行は必ずしも円滑に進

A Double strand endが形成される場合

1) ニック・ギャップ上での複製フォークの崩壊

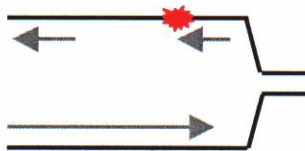


2) 新生鎖同士の間合とHolliday構造の解離

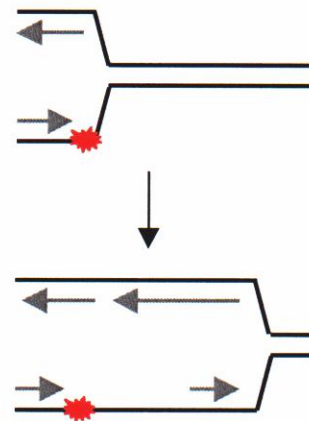


B Daughter strand gapが形成される場合

1) ラギング鎖合成の阻害



2) リーディング鎖合成の阻害と再開



図IV-2 複製フォークの進行阻害や崩壊による two-strand DNA傷害の発生メカニズム

DNA上の損傷（化学的な修飾や変化、脱塩基など）を★で、二本鎖DNAを二本の実線で示した。また、新生鎖を灰色の矢印で示した。

むとは限らない。実際には、複製フォークの進行に支障をきたす様々な要因がDNA上に存在していると考えられており、具体的な例としてはDNA上の化学的な修飾や変化、脱塩基、ニックやギャップ、転写装置などのDNA結合蛋白、高次構造、トポロジーの変化による物理的なストレス、といった様々な種類のものが挙げられる。これらの要因が存在するDNA上に複製フォークが到達した場合、その進行阻害や複製装置の崩壊を招いてしまうことが予想される。その結果生じるtwo-strand DNA傷害としては、主にDouble strand endとDaughter strand gapの二種類が考えられている。ヌクレオチド除去修復や塩基除去修復の過程で形成されるニックやギャップとは異なり、two-strand DNA傷害はDNA合成の鋳型となる塩基情報が失われているのが特徴である。この種のDNA傷害を回避するためには、相同組換え機構によって別の場所から失われた塩基情報を得るか、損傷乗り越えDNA合成等によって無理矢理塩基を挿入するしかないのが特徴である。Double strand endを形成するプロセスの可能性としては、1) Daughter strand gap、もしくは、ヌクレオチド除去修復や塩基除去修復の過程で形成されたニックやギャップが埋められないままS期に入ってしまう、その上を複製フォークが通過して崩壊を生じる。この種の崩壊は、リーディング鎖とラギング鎖のどちらでも起こり得る、2) リーディング鎖上にのみ存在する化学的な修飾や変化・脱塩基、もしくはトポロジーの変化によるストレス、DNA上の蛋白や高次構造等により複製フォークの進行が阻害される。その後、新生鎖同士の対合が生じてHolliday構造が形成され、この構造をHolliday構造リゾルベースと呼ばれるエンドヌクレアーゼ（大腸菌ではRuvABC、出芽酵母では明らかになっていない）が解離する、のいずれかが想定されている（図IV-2 A）。これらのプロセスによって生じたDouble strand endは、主に相同組換え機構によって姉妹染色分体と組換えを生じることで回避され、複製フォークが再構築される。実際、大腸菌では複製フォークの再構築を補助する機構の一部として相同組換え機構が利用されることが良く知られている（Kogoma 1996 ; Kuzuminov 1999）。Daughter strand gapを形成するプロセスの可能性としては、1) ラギング鎖上にのみ複製フォークの進行を阻害する様な化学的な修飾・脱塩基などが存在し、それ以前に合成されている岡崎フラグメントまでDNA合成が到達できない、2) リーディング鎖上で複製フォークの進行阻害が生じた後、下流で再びリーディング鎖のDNA合成が開始される、のいずれかが考えられる（図IV-2 B）。Daughter strand gapに関しては、複製後修復機構である損傷乗り越えDNA合成もしくは相同組換え機構によって回避される。

以上の様に、Double strand endやDaughter strand gapがゲノムDNAの複製に付随して発生していることが想定されている。本研究においてLOH解析系で検出している各種LOHイベントは富栄養条件下で増殖中の細胞において生じている。従って、LOH解析条件下でもDouble strand endやDaughter strand gapといった自然DNA傷害が発生していると推測される。相同組換え関連遺伝子の各欠損株やrad18欠損株の対数増殖期

にはG₂-M期で細胞周期の一時停止や形態異常を生じる細胞の割合が増加するという知見も、DNA複製時に自然DNA傷害が頻繁に発生していることを示唆している。相同組換え機構や複製後修復機構の欠損等の理由によってそれらの回避が行われない場合、染色体は複製を完了することができず、最終的には染色体の崩壊へと帰着するものと考えられる。野生株では一見順調にゲノムDNAの複製が進んでいる様に見えるが、実際には「自然DNA傷害による複製フォークの進行阻害や崩壊」→「相同組換え機構や複製後修復機構による回避」、というサイクルが頻繁に繰り返されているのであろう。

また、相同組換え関連遺伝子の欠損自体がある種のDNA傷害を誘発している可能性もある。例えば、*rad50* 欠損株では染色体末端のテロメア配列が短縮化するという報告がある (Boulton and Jackson 1998 ; Kironmai and Muniyappa 1997 ; Nugent et al. 1998) 。テロメアが短縮化した場合、染色体末端構造を維持するテロメア特異的な蛋白群の局在量が低下する。その結果、染色体末端は相同組換えの基質である Double strand end として認識されることが考えられる。しかし、*hdf1* 欠損によってもテロメア配列が短縮化することが知られているが (Boulton and Jackson 1996) 、本研究では *hdf1* 欠損は単独欠損、もしくは *rad52* との二重欠損のいずれの場合でも LOH に影響を及ぼさなかった。従って、必ずしも短縮化したテロメア配列が LOH の発生に寄与しているとは限らない様である。

rad18 rad52 欠損株の染色体喪失頻度より、LOH解析を行った生育条件では長さ約 330 kb の第III染色体一本当りにおよそ 6.5×10^{-3} の頻度で最低一箇所に染色体の崩壊を招く様な Double strand end や Daughter strand gap といった自然DNA傷害が生じていることが推測される。出芽酵母二倍体細胞には全部で32本の染色体が存在し、それらの合計の長さは約24 Mbであることが知られている。従って、自然DNA傷害の発生量がDNAの長さに比例すると仮定した場合、LOH解析条件下ではゲノム全体で 4.7×10^{-4} という極めて高い頻度で最低一箇所に染色体の崩壊を招く様な自然DNA傷害が生じているという計算になる。

相同組換え関連遺伝子の各欠損株や *rad18* 欠損株では、この様な自然DNA傷害の存在に対してチェックポイント制御機構はどの様に対応しているのだろうか？細胞はDNAダメージチェックポイントと呼ばれる機構によってDNA上の傷害をモニターし、それらの回避が完了するまで細胞周期を停止することが知られている。例えば放射線照射によってDNA傷害を誘発させた場合、野生株では修復の時間をかせぐため細胞周期の停止が起きる。*rad52* 欠損株でも同様の現象が起こるが、この欠損株ではDNA傷害を回避できないため細胞周期が停止したままの状態に陥り、やがて死を迎えることが報告されている (Weinert and Hartwell. 1988) 。このことから、*rad52* 欠損株ではDNAダメージチェックポイント機構そのものは正常に機能すると考えられ

ている。本研究で相同組換え関連遺伝子の各欠損や*rad18* 欠損が生育に及ぼす影響を調べたところ、 G_2 -M期細胞の割合の増大や倍加時間の遅延が観察された。これらの結果は、相同組換え関連遺伝子の各欠損株や*rad18* 欠損株に生じた自然DNA傷害がDNAダメージチェックポイント機構によって認識され、細胞周期の停止が生じていることを示している。これらの欠損株では細胞周期を停止することで時間が稼がれ、代替経路による自然DNA傷害の回避が可能になっているものと考えられる。Kleinの研究では、相同組換え機構とDNAダメージチェックポイント機構の双方を欠損した株は相乗的に染色体喪失が上昇することが報告されている (Klein 2001)。また、本研究室の渡辺の研究では、LOHが上昇する*orc1-4* 欠損株にDNAダメージチェックポイント機構に関与する*RAD9* 遺伝子の欠損を導入した場合、相乗的にLOHが上昇することが明かとなっている (渡辺 2001年博士論文; Watanabe et al. 2002)。以上の知見から考えると、DNAダメージチェックポイント機構が欠損した場合には自然DNA傷害が放置されたまま細胞周期が進行してしまい、染色体の崩壊が劇的に増加してしまうのであろう。本研究で*rad50 rad52* 二重欠損株のLOH頻度が*rad52* 単独欠損株よりも2倍近く高かったのは、*RAD50* 遺伝子がDNAダメージチェックポイントにも関与していることに起因しているためなのかも知れない (Grenon et al. 2001; Usui et al. 2001)。

一方、注意しなければならない点として、*rad52* 欠損株に放射線照射を行った時とは異なり、自然DNA傷害による細胞周期の停止は一時的であったということが挙げられる。HOエンドヌクレアーゼの発現によってゲノムDNA中一ヶ所のみDouble strand breakを発生させた場合、*rad52* 欠損株では細胞周期の停止が一過性で、修復が不十分のまま再び細胞分裂が開始される (つまりアダプテーションが起きる) という報告がされている (Malone and Esposito. 1980; Kramer and Haber et al. 1993; Sandell and Zakian et al. 1993)。放射線照射とHOエンドヌクレアーゼの発現ではそれぞれ細胞が異なる反応を示すことから、細胞周期の停止やその後のアダプテーションはDNA傷害の質や量によって異なるとも言えるのかも知れない。自然DNA傷害によって細胞周期の停止が生じた細胞では、*rad52* 欠損株でHOエンドヌクレアーゼを発現した際に見られる様なアダプテーションが起こっていることが予想される。GalgoczyとToczyskiは、相同組換え関連遺伝子を欠損した二倍体細胞において、自然発生する染色体喪失の発生にチェックポイントのアダプテーションに関与する*CDC5* 遺伝子が必要であることを報告していることから (Galgoczy and Toczyski 2001)、染色体喪失の発生過程にはこのアダプテーションの機構が関与していることが推測される。

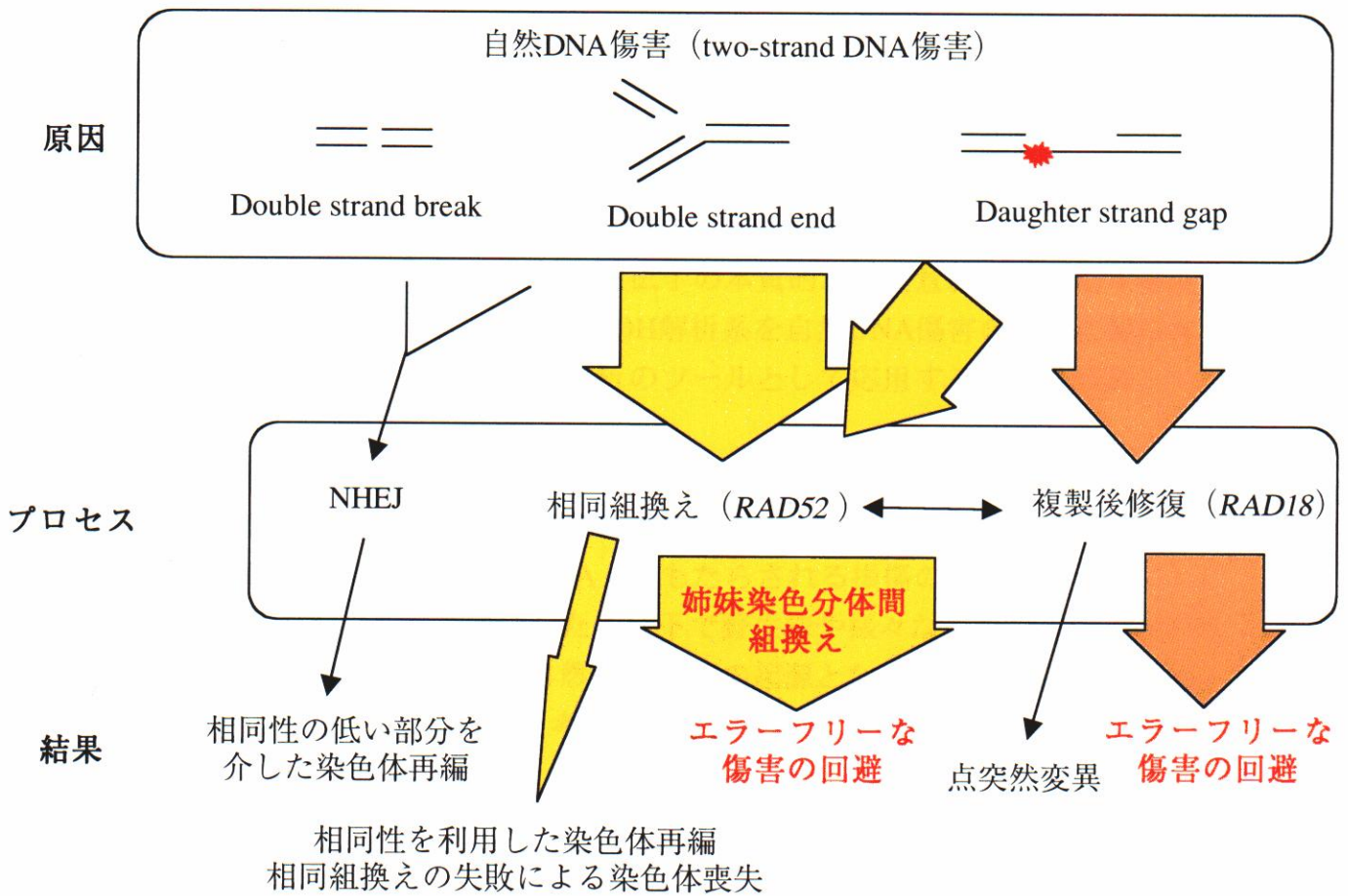
IV-7 本研究のまとめ

以下に本研究によって得られた知見をまとめ、図IV-3にその内容を図示した。

- 1) 出芽酵母の対数増殖期において染色体異常・再編によるLOHが発生する主要な原因は、*RAD52* 遺伝子依存性の相同組換え機構や*RAD18* 遺伝子依存性の複製後修復機構による回避を必要とする様な内在性の自然DNA傷害であると結論される。これらの自然DNA傷害の大半は、ゲノムDNAの複製に付随して発生するDaughter strand gapやDouble strand endであると推測される。
- 2) 相同組換え機構と複製後修復機構のいずれの場合も自然DNA障害の回避プロセスの大半はエラーフリーに行われ、その結果ゲノム安定性が維持されている。相同組換え機構の場合、エラーフリーな回避プロセスの実体は主に姉妹染色分体間の組換えであると推測され、この種の相同組換え反応は*RAD52*、*RAD51* および*RAD50* 遺伝子全てが要求される経路により行われる。一方で回避プロセスの一部は染色体異常・再編や点突然変異などのLOHイベントとして検出される。染色体再編に関しては複数の相同組換え経路が関与している。
- 3) 自然DNA障害の一部は相同組換えと複製後修復いずれの機構でも回避可能であり、一方の欠損時にはもう一方が代替できる。この様な自然DNA傷害はDaughter Strand Gapであると考えられる。
- 5) NHEJ機構の寄与度は、LOHの発生と抑制のいずれに対しても相同組換え機構や複製後修復機構に比べてはるかに小さい。

IV-8 今後の展望

本研究では、対数増殖期にDouble strand endやDaughter strand gapといった自然DNA傷害が頻繁に発生しており、それらの大半は相同組換え機構や複製後修復機構によってエラーフリーに回避されていること、また、回避が適切に遂行されなかった場合には染色体喪失や染色体再編といったLOHが生じることが明らかとなった。ここで注意したいのは、相同組換え機構や複製後修復機構がエラーを生じるケースというのは、回避イベント全体のごく一部であるという点だ。今日まで行われてきた多くの研究は、この一部分のみを検出しているに過ぎない。一方で当研究室のLOH



図IV-3 ゲノム安定性は複数の経路によって維持される

出芽酵母の対数増殖期において染色体異常・再編によるLOHが発生する主要な原因は、ゲノムDNAの複製に付随して発生するDaughter strand gapやDouble strand endといった自然DNA傷害であると推測される。これらの自然DNA傷害の大半は主に相同組換え機構と複製後修復機構によりエラーフリーに回避され、その結果ゲノム安定性が維持されている。また、Daughter strand gapに関しては、相同組換えと複製後修復の双方の機構により回避可能である。回避プロセスの一部は染色体異常・再編や点突然変異などのLOHイベントとして検出される。

解析系は、自然DNA傷害の量やその回避経路、とりわけエラーフリーな回避プロセスをモニターするのに非常に適した系であることが本研究によって再認識された。エラーフリーな回避プロセスを検出できるということは、自然DNA損傷の量・種類・相対比や、それらの回避に関与する機構間の相互関係を推測する上で非常に大きなメリットになるであろう。また、DNAに人為的な傷害を誘発することなく様々な欠損株での解析を行えるという点も見逃せない。このことは言い換えれば、欠損させた遺伝子が、通常の細胞活動中において本来いかなる役割を果たしているのかを推測できるということであり、その遺伝子の本質的な存在意義を明確にすることが可能だということである。今後は、LOH解析系を自然DNA傷害の回避に関与する遺伝子のスクリーニングや遺伝学的解析のツールとして応用することを計画している。

逆に、人為的にDNAに損傷を与えた状況下でのLOH解析も、有益な情報をもたらしてくれる可能性がある。現在、DNAに損傷を与える薬剤には数多くのもが知られており、生化学的解析によってDNA上にもたらされる損傷の種類や質が明らかになっている。これらの薬剤で処理した条件下で野生株や様々な欠損株のLOH解析を行い、その影響を調べることで、自然DNA傷害の起源となっているDNA上の損傷の実体を明らかにすることができると考えている。

謝辞

本研究を進める上で適切な御助言のみならず、科学に取り組む者としてのあり方や考え方を丁寧に御指導下さいました、原核生物分子遺伝学講座 真木寿治教授に心より感謝申し上げます。

また、同講座の秋山昌弘助教授、真木智子助手、中嶋淑美秘書、井田慶子氏、ならびに諸先輩方には、本研究に関する有意義な論議に加え、研究環境の整備などへの御尽力に対し、深く感謝いたします。

とりわけ本研究を進めるにあたり、未熟な私を研究へと導いて下さり、いつも励まし、時に叱咤し、忍耐強く見守って下さった梅津桂子助手には心より御礼申し上げます。

また、本研究に関する有意義な論議に加え、同じ学生の立場として公私を問わず私を支えて下さった平岡美奈先輩、渡辺圭一先輩、安島潤氏、川内啓氏、ならびに原核生物分子遺伝学講座の学生の皆様に感謝いたします。

プラスミドpNKY83、p Δ RAD51、pHT19を分与して下さいました国立遺伝学研究所細胞遺伝部門の小川智子博士、プラスミドScRAD52pRS316を分与して下さいました大阪大学理学部の篠原彰博士、プラスミドpU6H2MYCおよび*Saccharomyces genome deletion project*で作製された*hdf1 Δ ::kanMX*株を分与して下さいました理研ゲノム科学総合研究センターの白髭克彦博士に、この場を借りて御礼申し上げます。

参考文献

- ABOUSSEKHRA, A., R. CHANET, Z. ZGAGA, C. CASSIER-CHAUVAT, M. HEUDE et al., 1989 *RADH*, a gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a putative DNA helicase involved in DNA repair. Characteristics of *radH* mutants and sequence of the gene. *Nucleic Acids Res* 17: 7211-7219.
- ADZUMA, K., T. OGAWA and H. OGAWA, 1984 Primary structure of the *RAD52* gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 4: 2735-2744.
- 安島 潤, 2001 出芽酵母 *sgs1* 変異株における染色体不安定性の解析. 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 修士論文.
- AJIMA, J., K. UMEZU and H. MAKI, 2002 Elevated incidence of loss of heterozygosity (LOH) in an *sgs1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: roles of yeast RecQ helicase in suppression of aneuploidy, interchromosomal rearrangement, and the simultaneous incidence both events during mitotic growth. *Mutat. Res.* 504: 157-172.
- ALANI, E., L. CAO and N. KLECKNER, 1987 A method for gene disruption that allows repeated use of *URA3* selection in the construction of multiply disrupted yeast strains. *Genetic* 116: 541-545.
- ALANI, E., S. SUBBIAH and N. KLECKNER, 1989 The yeast *RAD50* gene encodes a predicted 153-kD protein containing a purine nucleotide-binding domain and two large heptad repeat regions. *Genetics* 122: 47-57.
- ALANI, E., R. PADMORE and N. KLECKNER, 1990 Analysis of wild-type and *rad50* mutants of yeast suggests an intimate relationship between meiotic chromosome synapsis and recombination. *Cell* 61: 419-436.
- ASTROM, S. U., S. M. OKAMURA and J. RINE, 1999 Yeast cell-type regulation of DNA repair. *Nature* 397: 310.
- BAI, Y., and L. S. SYMINGTON, 1996 A Rad52 homolog is required for *RAD51*-independent mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 10: 2025-2037.

BOEKE, J. D., 1991 Yeast Transposable Elements, pp. 193-261 in *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Genome Dynamics, Protein Synthesis, and Energetics*, edited by J. R. BROACH, J. R. PRINGLE and E. W. JONES. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

BOULTON, S. J., and S. P. JACKSON, 1996 Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Res* 24: 4639-4648.

BOULTON, S. J., and S. P. JACKSON, 1998 Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *Embo J.* 17: 1819-1828.

BRENDEL, M., and R. H. HAYNES, 1973 Interactions among genes controlling sensitivity to radiation and alkylation in yeast. *Mol Gen Genet* 125: 197-216.

BRESSAN, D. A., H. A. OLIVARES, B. E. NELMS and J. H. PETRINI, 1998 Alteration of N-terminal phosphoesterase signature motifs inactivates *Saccharomyces cerevisiae* Mre11. *Genetics* 150: 591-600.

BRESSAN, D. A., B. K. BAXTER and J. H. PETRINI, 1999 The Mre11-Rad50-Xrs2 protein complex facilitates homologous recombination-based double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 19: 7681-7687.

BROOMFIELD, S., T. HRYCIW and W. XIAO, 2001 DNA postreplication repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res* 486: 167-184.

CHEN, L., K. TRUJILLO, W. RAMOS, P. SUNG and A. E. TOMKINSON, 2001 Promotion of Dnl4-catalyzed DNA end-joining by the Rad50/Mre11/Xrs2 and Hdf1/Hdf2 complexes. *Mol Cell* 8: 1105-1115.

COX, M. M., M. F. GOODMAN, K. N. KREUZER, D. J. SHERRATT, S. J. SANDLER et al., 2000 The importance of repairing stalled replication forks. *Nature* 404: 37-41.

CRITCHLOW, S. E., and S. P. JACKSON, 1998 DNA end-joining: from yeast to man.

Trends Biochem Sci 23: 394-398.

D'AMOURS, D., and S. P. JACKSON, 2002 The mre11 complex: at the crossroads of dna repair and checkpoint signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 3: 317-327.

DE ANTONI, A., and D. GALLWITZ, 2000 A novel multi-purpose cassette for repeated integrative epitope tagging of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene 246: 179-185.

DE JAGER, M., J. VAN NOORT, D. C. VAN GENT, C. DEKKER, R. KANAAR et al., 2001 Human Rad50/Mre11 is a flexible complex that can tether DNA ends. Mol. Cell 8: 1129-1135.

GALGOCZY, D. J., and D. P. TOCZYSKI, 2001 Checkpoint adaptation precedes spontaneous and damage-induced genomic instability in yeast. Mol. Cell. Biol. 21: 1710-1718.

GAME, J. C., and R. K. MORTIMER, 1974 A genetic study of x-ray sensitive mutants in yeast. Mutat Res 24: 281-292.

GRENON, M., C. GILBERT and N. F. LOWNDES, 2001 Checkpoint activation in response to double-strand breaks requires the Mre11/Rad50/Xrs2 complex. Nat. Cell Biol. 3: 844-847.

HABER, J. E., 1998 The many interfaces of Mre11. Cell 95: 583-586.

HABER, J. E., 1999 DNA recombination: the replication connection. Trends Biochem. Sci. 24: 271-275.

平岡 美奈, 2000 二倍体出芽酵母をモデルとしたヘテロ接合性の喪失 (LOH) の解析. 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 博士論文.

HIRAOKA, M., K. WATANABE, K. UMEZU and H. MAKI, 2000 Spontaneous loss of heterozygosity in diploid *Saccharomyces cerevisiae* cells. Genetics 156: 1531-1548.

HOEGE, C., B. PFANDER, G. L. MOLDOVAN, G. PYROWOLAKIS and S. JENTSCH, 2002 *RAD6*-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. Nature 419: 135-141.

- HUANG, H., A. KAHANA, D. E. GOTTSCHLING, L. PRAKASH and S. W. LIEBMAN, 1997 The ubiquitin-conjugating enzyme Rad6 (Ubc2) is required for silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 17: 6693-6699.
- IVANOV, E. L., V. G. KOROLEV and F. FABRE, 1992 *XRS2*, a DNA repair gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is needed for meiotic recombination. *Genetics* 132: 651-664.
- IVANOV, E. L., N. SUGAWARA, C. I. WHITE, F. FABRE and J. E. HABER, 1994 Mutations in *XRS2* and *RAD50* delay but do not prevent mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 14: 3414-3425.
- JOHNSON, R. E., S. T. HENDERSON, T. D. PETES, S. PRAKASH, M. BANKMANN et al., 1992 *Saccharomyces cerevisiae* *RAD5*-encoded DNA repair protein contains DNA helicase and zinc-binding sequence motifs and affects the stability of simple repetitive sequences in the genome. *Mol Cell Biol* 12: 3807-3818.
- JOHNSON, R. E., S. PRAKASH and L. PRAKASH, 1999 (a) Requirement of DNA polymerase activity of yeast Rad30 protein for its biological function. *J Biol Chem* 274: 15974-15977.
- JOHNSON, R. E., S. PRAKASH and L. PRAKASH, 1999 (b) Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, Poleta. *Science* 283: 1001-1004.
- JOHNSON, F. B., R. A. MARCINIAK, M. MCVEY, S. A. STEWART, W. C. HAHN et al., 2001 The *Saccharomyces cerevisiae* *WRN* homolog Sgs1p participates in telomere maintenance in cells lacking telomerase. *Embo J* 20: 905-913.
- KADYK, L. C., and L. H. HARTWELL, 1992 Sister chromatids are preferred over homologs as substrates for recombinational repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 132: 387-402.
- KADYK, L. C., and L. H. HARTWELL, 1993 Replication-dependent sister chromatid recombination in *rad1* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 133: 469-487.
- KAGAWA, W., H. KURUMIZAKA, S. IKAWA, S. YOKOYAMA and T. SHIBATA, 2001 Homologous pairing promoted by the human Rad52 protein. *J. Biol. Chem.* 276: 35201-35208.

川内 啓, 2003 出芽酵母相同組換え欠損によって誘発される点突然変異に関する解析. 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 修士論文.

KIRONMAI, K. M., and K. MUNIYAPPA, 1997 Alteration of telomeric sequences and senescence caused by mutations in *RAD50* of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* 2: 443-455.

KLEIN, H. L., 1995 Genetic control of intrachromosomal recombination. *Bioessays* 17: 147-159.

KLEIN, H. L., 2001 Spontaneous chromosome loss in *Saccharomyces cerevisiae* is suppressed by DNA damage checkpoint functions. *Genetics* 159: 1501-1509.

KOGOMA, T., 1996 Recombination by replication. *Cell* 85: 625-627.

KOWALCZYKOWSKI, S. C., 2000 Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem Sci* 25: 156-165.

KUPIEC, M., and G. SIMCHEN, 1984 Cloning and mapping of the *RAD50* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 193: 525-531.

KUZMINOV, A., 1999 Recombinational repair of DNA damage in *Escherichia coli* and bacteriophage lambda. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 751-813.

LAWRENCE, C. W., and R. B. CHRISTENSEN, 1979 Metabolic suppressors of trimethoprim and ultraviolet light sensitivities of *Saccharomyces cerevisiae rad6* mutants. *J Bacteriol* 139: 866-887.

LE, S., J. K. MOORE, J. E. HABER and C. W. GREIDER, 1999 *RAD50* and *RAD51* define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. *Genetics* 151: 143-152.

LEE, S. E., J. K. MOORE, A. HOLMES, K. UMEZU, R. D. KOLODNER et al., 1998 *Saccharomyces* Ku70, mre11/rad50 and RPA proteins regulate adaptation to G2/M arrest after DNA damage. *Cell* 94: 399-409.

LEMONTT, J. F., 1971 Mutants of yeast defective in mutation by ultraviolet light. *Genetics* 61: 21-33.

LIEFSHITZ, B., R. STEINLAUF, A. FRIEDL, F. ECKARDT-SCHUPP and M. KUPIEC, 1998 Genetic interactions between mutants of the 'error-prone' repair group of *Saccharomyces cerevisiae* and their effect on recombination and mutagenesis. *Mutat Res* 407: 135-145.

MALKOVA, A., E. L. IVANOV and J. E. HABER, 1996 Double-strand break repair in the absence of *RAD51* in yeast: a possible role for break-induced DNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 7131-7136.

MALONE, R. E., and R. E. ESPOSITO, 1980 The *RAD52* gene is required for homothallic interconversion of mating types and spontaneous mitotic recombination in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 503-507.

MALONE, R. E., T. WARD, S. LIN and J. WARING, 1990 The *RAD50* gene, a member of the double strand break repair epistasis group, is not required for spontaneous mitotic recombination in yeast. *Curr. Genet.* 18: 111-116.

MOORE, J. K., and J. E. HABER, 1996 Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16: 2164-2173.

森 昌昭, 1997 出芽酵母第III染色体における染色体欠失領域の構造解析. 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 修士論文.

MORRISON, D. P., and P. J. HASTINGS, 1979 Characterization of the mutator mutation *mut5-1*. *Mol Gen Genet* 175: 57-65.

MORRISON, A., E. J. MILLER and L. PRAKASH, 1988 Domain structure and functional analysis of the carboxyl-terminal polyacidic sequence of the *RAD6* protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 8: 1179-1185.

MORRISON, A., R. B. CHRISTENSEN, J. ALLEY, A. K. BECK, E. G. BERNSTINE et al., 1989 *REV3*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene whose function is required for induced

mutagenesis, is predicted to encode a nonessential DNA polymerase. *J Bacteriol* 171: 5659-5667.

MORTENSEN, U. H., C. BENDIXEN, I. SUNJEVARIC and R. ROTHSTEIN, 1996 DNA strand annealing is promoted by the yeast Rad52 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 10729-10734.

MORTIMER, R. K., R. CONTOPOULOU and D. SCHILD, 1981 Mitotic chromosome loss in a radiation-sensitive strain of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 5778-5782.

NELSON, J. R., C. W. LAWRENCE and D. C. HINKLE, 1996 Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase zeta. *Science* 272: 1646-1649.

NUGENT, C. I., G. BOSCO, L. O. ROSS, S. K. EVANS, A. P. SALINGER et al., 1998 Telomere maintenance is dependent on activities required for end repair of double-strand breaks. *Curr. Biol.* 8: 657-660.

OGAWA, T., A. SHINOHARA, A. NABETANI, T. IKEYA, X. YU et al., 1993 RecA-like recombination proteins in eukaryotes: functions and structures of *RAD51* genes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 58: 567-576.

PAQUES, F., and J. E. HABER, 1999 Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 349-404.

PAULOVICH, A. G., C. D. ARMOUR and L. H. HARTWELL, 1998 The *Saccharomyces cerevisiae* *RAD9*, *RAD17*, *RAD24* and *MEC3* genes are required for tolerating irreparable, ultraviolet-induced DNA damage. *Genetics* 150: 75-93.

PICKART, C. M., 2002 DNA repair: right on target with ubiquitin. *Nature* 419: 120-121.

ROCHE, H., R. D. GIETZ and B. A. KUNZ, 1995 Specificities of the *Saccharomyces cerevisiae* *rad6*, *rad18*, and *rad52* mutators exhibit different degrees of dependence on the *REV3* gene product, a putative nonessential DNA polymerase. *Genetics* 140: 443-456.

ROSE, M. D., F. WINSTON and P. HIETER, 1990 *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory*

Course Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

ROUSH, A. A., M. SUAREZ, E. C. FRIEDBERG, M. RADMAN and W. SIEDE, 1998 Deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* gene *RAD30* encoding an *Escherichia coli* *DinB* homolog confers UV radiation sensitivity and altered mutability. *Mol Gen Genet* 257: 686-69.

SAMBROOK, J., E. F. FRITSCH and T. MANIATIS, 1989 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Ed. 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

SAMBROOK, J., and D. W. RUSSELL, 2001 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Ed. 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

SANDELL, L. L., and V. A. ZAKIAN, 1993 Loss of a yeast telomere: arrest, recovery, and chromosome loss. *Cell* 75: 729-739.

SCHIESTL, R. H., S. PRAKASH and L. PRAKASH, 1990 The *SRS2* suppressor of *rad6* mutations of *Saccharomyces cerevisiae* acts by channeling DNA lesions into the *RAD52* DNA repair pathway. *Genetics* 124: 817-831.

SCHIESTL, R. H., R. D. GIETZ, P. J. HASTINGS and U. WINTERSBERGER, 1990 Interchromosomal and intrachromosomal recombination in *rad18* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 222: 25-32.

SCHIESTL, R. H., J. ZHU and T. D. PETES, 1994 Effect of mutations in genes affecting homologous recombination on restriction enzyme-mediated and illegitimate recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 14: 4493-4500.

SHIBATA, T., T. NISHINAKA, T. MIKAWA, H. AIHARA, H. KURUMIZAKA et al., 2001 Homologous genetic recombination as an intrinsic dynamic property of a DNA structure induced by RecA/Rad51-family proteins: a possible advantage of DNA over RNA as genomic material. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 8425-8432.

SHINOHARA, A., H. OGAWA and T. OGAWA, 1992 Rad51 protein involved in repair and recombination in *S. cerevisiae* is a RecA-like protein. *Cell* 69: 457-470.

SIEDE, W., A. A. FRIEDL, I. DIANOVA, F. ECKARDT-SCHUPP and E. C. FRIEDBERG,

1996 The *Saccharomyces cerevisiae* Ku autoantigen homologue affects radiosensitivity only in the absence of homologous recombination. *Genetics* 142: 91-102.

SIGNON, L., A. MALKOVA, M. L. NAYLOR, H. KLEIN and J. E. HABER, 2001 Genetic requirements for *RAD51*- and *RAD54*-independent break-induced replication repair of a chromosomal double-strand break. *Mol. Cell. Biol.* 21: 2048-2056.

SUNG, P., K. M. TRUJILLO and S. VAN KOMEN, 2000 Recombination factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat. Res.* 451: 257-275.

TSUBOUCHI, H., and H. OGAWA, 1998 A novel *mre11* mutation impairs processing of double-strand breaks of DNA during both mitosis and meiosis. *Mol. Cell. Biol.* 18: 260-268.

UMEZU, K., M. HIRAOKA, M. MORI and H. MAKI, 2002 Structural analysis of aberrant chromosomes that occur spontaneously in diploid *Saccharomyces cerevisiae*. retrotransposon Ty1 plays a crucial role in chromosomal rearrangements. *Genetics* 160: 97-110.

USUI, T., H. OGAWA and J. H. PETRINI, 2001 A DNA damage response pathway controlled by Tel1 and the Mre11 complex. *Mol. Cell* 7: 1255-1266.

渡辺 圭一, 2001 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. 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 博士論文.

WATANABE, K., J. MORISHITA, K. UMEZU, K. SHIRAHIGE and H. MAKI, 2002 Involvement of *RAD9*-dependent damage checkpoint control in arrest of cell cycle, induction cell death, and chromosome instability caused by defects in origin recognition complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Euk. Cell* 1: 200-212.

WEINERT, T. A., and L. H. HARTWELL, 1988 The *RAD9* gene controls the cell cycle response to DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 241: 317-322.

XIAO, W., B. L. CHOW, S. BROOMFIELD and M. HANNA, 2000 The *Saccharomyces cerevisiae* *RAD6* group is composed of an error-prone and two error-free postreplication repair pathways. *Genetics* 155: 1633-1641.

YAMASHITA, Y. M., T. OKADA, T. MATSUSAKA, E. SONODA, G. Y. ZHAO et al.,

2002 *RAD18* and *RAD54* cooperatively contribute to maintenance of genomic stability in vertebrate cells. *Embo J* 21: 5558-5566.