

所属 (主指導教官)	原核生物分子遺伝学 (真木 寿治 教授)		
氏名	安島 潤	提出	平成16年 8月 2日
題目	ゲノムの安定維持における <i>SGS1</i> の役割 ～ <i>SGS1</i> と組換え修復および複製後修復との遺伝学的関係～		
要旨	<p>当研究室ではゲノムの遺伝的変動について、その発生や制御のメカニズムを解明することを目的に、二倍体出芽酵母で生じる多様な染色体異常や点突然変異を包括的かつ定量的に分子レベルで解析する系を開発し、ゲノムを維持する機構の解析を行ってきた。これまでの研究から、ゲノムの維持には組換え修復と複製後修復が互いに補完し合いながらゲノムの変化を抑制する様に働いているとともに、ゲノムの変化を引き起こす過程にも関与することが明らかとなった。本研究では、ゲノムの安定な維持に関わる因子として、RecQ helicase family に着目して研究を行った。RecQ helicase family とは大腸菌 <i>recQ</i> 遺伝子と相同な DNA helicase motif を持つ遺伝子群の総称であり、大腸菌からヒトに至るまで保存されている。近年、癌多発性や早老症状等を示す Bloom 症候群や Werner 症候群、及び、Rothmund-Tomson 症候群の原因遺伝子が RecQ helicase family の遺伝子であることが明らかにされた。これらの患者の細胞は、染色体不安定性や S 期の遅延を示すことが知られている。出芽酵母では <i>SGS1</i> が唯一の RecQ helicase family の遺伝子として同定されており、S 期に発現していることや、その欠損株でもヒトの遺伝病患者細胞と同様に染色体の維持に支障をきたすこと等が報告されている。以上のことから、RecQ 型 DNA helicase は DNA 複製中に生じた何らかの障害の解消に関与することで、ゲノムの維持に寄与すると考えられているが、その分子機構については余り明らかになっていない。</p> <p>そこで、本研究では細胞内でのゲノム維持における RecQ 型 helicase の役割を明らかにするために、我々の二倍体出芽酵母での解析系を用いて <i>SGS1</i> の欠損により誘発されるゲノムの変化を体系的に解析した。<i>sgs1</i> 欠損株では、様々な染色体異常・再編の発生頻度が野生株に比較して 10 倍程度に上昇しており、中でも、不等交叉や転座等の異所性の相同組換えの発生頻度や染色体喪失を伴う交叉の発生頻度が大きく上昇する傾向が観られた。<i>SGS1</i> の欠損により相同組換えの頻度が上昇したことは、<i>SGS1</i> に代わって組換え修復機構が働いたことを示しており、<i>SGS1</i> は組換え修復とは別の機構で、相同組換えを抑制する様に機能していることが考えられた。また、異所性の相同組換えが特に誘発されていたことから、<i>SGS1</i> は組換えの反応自体にも作用していることが示唆された。</p> <p><i>SGS1</i> が組換え修復とは別のゲノム維持機構で機能しているのであれば、これらを同時に欠損すると細胞増殖が強く妨げられることが予想されるが、最近、<i>SGS1</i> と組換え修復に関与する遺伝子との二重欠損株では組換え欠損株と同程度の生育遅延しか観られないことが報告された。そこで、ゲノム維持における <i>SGS1</i> と組換え修復との機能的な相互作用について明らかにする為に、<i>SGS1</i> と組換え修復に関与する <i>RAD50</i>、<i>RAD51</i>、<i>RAD52</i> との</p>		

多重欠損で誘発されるゲノムの変化を解析した。また、ゲノムの維持において組換え修復は複製後修復と補完し合えることが当研究室で示されていることから、*SGS1* と複製後修復の間にも機能的な相互作用がある可能性を考え、*SGS1* と複製後修復関連遺伝子 *RAD18* との関係についても解析した。

SGS1 と *RAD51* あるいは *RAD52* との二重欠損株では、それぞれ *RAD51* あるいは *RAD52* の単独欠損株と同様のゲノムの変化の発生パターンを示した。このことから、*SGS1* は遺伝学的に組換え修復の下位で機能することが明らかとなった。一方、DNA 二重鎖切断の組換え修復に機能する *RAD50* と *SGS1* との二重欠損株の場合には、全ての種類の染色体異常・再編の発生頻度が相乗的に上昇していた。このことは、ゲノムの安定な維持において、*SGS1* と *RAD50* との間には部分的に代替できる関係があり、一方の欠損を他方の機能によって補うことができることを示している。一方、*RAD18* と *SGS1* の二重欠損株では、全ての染色体異常・再編の発生頻度が相加的に上昇した。同様に *RAD18* と *RAD50* の二重欠損株の場合にも全ての染色体異常・再編の発生頻度が相加的に上昇しており、*SGS1* と *RAD50* は *RAD18* とは独立に機能していることが分かった。また、*RAD18* と *RAD52* の二重欠損株では染色体異常の発生頻度が相乗的に上昇し、そのほぼ全てが染色体喪失であることが当研究室の研究により明らかとなっているが、この株にさらに *SGS1* の欠損を加えても、ゲノムの維持に対する影響は観られなかった。以上のことから、*SGS1* は組換え修復や複製後修復とは異なるゲノムの維持機構に機能する訳ではなく、組換え修復の下位で、ゲノムの変化をもたらす組換えを抑制する形で機能するものの、複製後修復の欠損により誘発される相同組換えには関与しないことが示された。

近年、RecQ 型 helicase については、退行した複製フォーク（チキンフット構造）の巻き戻しに関わるとのモデルが提唱されている。このモデルを発展させて、今回の解析から判った *SGS1* とその他の修復機構の関係について考察した。複製フォークの退行とは、リーディング鎖側の鋳型 DNA 上に存在する損傷塩基等が複製の進行を妨げた際に、まず、新生鎖同士の間合によりフォーク構造を退行させ（チキンフットの形成）、ラギング鎖側の新生鎖を鋳型にすることで DNA 損傷に対応する部位の複製を凶するというものである。*SGS1* はチキンフットを巻き戻して複製フォークを正常な構造に戻すことに機能すると想定されている。*SGS1* は遺伝学的に組換え修復の下位で機能すること、および、チキンフット構造は本質的に組換え中間体の構造と見なせることから、*RAD51* や *RAD52* による組換え反応がチキンフット構造を生じさせると考えた。*RAD50* は、*SGS1* が欠損した際にチキンフットが解離されて生じる DNA 二重鎖断端の組換え修復を行っているか、あるいは、チキンフット内の二重鎖断端を介して組換え修復を行うことにより、*SGS1* と相乗的な関係を示すと考えられる。この様に、*SGS1* はチキンフットを巻き戻すことでチキンフット依存的な組換え修復の機会を低下させ、それに伴う組換えエラーの発生を低下させていると考えられる。さらに、*SGS1* は異常な組換えに繋がる組換え中間体の巻き戻しを行うことで、その発生を抑制している可能性もある。また、*SGS1* と *RAD50* は共に複製後修復の欠損を補う形で生じる組換え修復には関与しないことから、この場合の組換え反応では、チキンフットとは異なる組換え中間体が形成される、あるいは、複製後修復欠損下で形成されるチキンフットには *SGS1* が作用しないことが考えられた。以上の仮説の検討すべき点について、今後、さらに解析を進める予定である。

ゲノムの安定維持におけるSGS1の役割
～SGS1と組換え修復および複製後修復との遺伝学的関係～

安島 潤

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16年8月2日提出

目次

	頁
I 序論	p7-p30
I-1 出芽酵母二倍体をモデルとしたLOH解析系	
I-2 RecQ型ヘリカーゼとゲノムの維持	
I-3 野生株におけるLOH解析により得られた知見～相同組換えの関与～	
I-4 組換え修復関連遺伝子欠損株、および、複製後修復欠損株におけるLOH解析により得られた知見	
I-4-1 細胞内で生じる様々な自然DNA傷害	
I-4-2 相同組換え機構～複数の経路とそれぞれに関与する遺伝子	
I-4-3 自然DNA傷害の解消における組換え修復の役割	
I-4-4 複製後修復機構の概要	
I-4-5 自然DNA障害の解消における複製後修復の役割	
I-5 本研究の目的	
II 材料と方法	p31-p47
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>sgs1</i> 単独欠損株の作製	
II-5-2 <i>sgs1 rad50</i> 二重欠損株の作製	
II-5-3 <i>sgs1 rad51</i> 二重欠損株の作製	
II-5-4 <i>sgs1 rad52</i> 二重欠損株の作製	
II-5-5 <i>sgs1 rad18</i> 二重欠損株の作製	
II-5-6 <i>sgs1 rad18 rad52</i> 三重欠損株の作製	

II-6 PCR法

II-7 細胞の生育状態の解析

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 サザンブロッティング法

II-8-4 PCRによる*URA3*遺伝子挿入領域の構造解析～遺伝子変換と点突然変異の分類～

II-8-5 PCRによる*ADE2*遺伝子挿入領域の構造解析～*ADE2*マーカーのホモ化の解析～

II-8-6 PCRによる*MAT-HMR*間の染色体再編の同定

III 結果

p48-p79

III-1 LOH解析系の概略

III-2 *sgs1*欠損株では全種類の染色体異常の発生頻度が上昇する

III-3 *SGS1*と組換え修復の二重欠損株は組換え修復単独欠損株と同じLOHパターンを示す

III-4 *SGS1*とDSEの組換え修復遺伝子*RAD50*との二重欠損株では各種染色体異常の発生頻度が相乗的に上昇する

III-5 *SGS1*と複製後修復の二重欠損株は各単独欠損株のLOH発生頻度に対して相加的な上昇を示す

III-6 *RAD50*と複製後修復の二重欠損株は各単独欠損株のLOH発生頻度に対して相加的な上昇を示す

III-7 *SGS1*と組換え修復、複製後修復の三重欠損株は組換え修復と複製後修復との二重欠損株と同様のLOH発生パターンを示す

IV 考察

p80-p97

IV-1 *sgs1*欠損株より得られた知見

- IV-2 *SGS1*と組換え修復の二重欠損株より得られた知見
- IV-3 *SGS1*とDSEの組換え修復遺伝子*RAD50*の二重欠損株より得られた知見
- IV-4 *SGS1*と複製後修復の二重欠損株より得られた知見
- IV-5 *RAD50*と複製後修復の二重欠損株より得られた知見
- IV-6 *SGS1*と組換え修復、複製後修復の三重欠損株より得られた知見
- IV-7 本研究のまとめと今後の展望

謝辞 p98

参考文献 i-vii

I 序論

生物の遺伝情報の総体であるゲノムは、次世代へと受け継がれる際、あるいは生物個体における体細胞増殖時等に稀に変化が生じる。このようなゲノムの変化は突然変異と呼ばれ、生物に非常に大きな影響を与える現象である。例えば、生物種レベルで考えた場合では、生物の進化や多様性を生み出すことにゲノムの変化が深く関わっていることは、よく知られていることである。個体レベルでは、体細胞や生殖細胞に生じる突然変異の蓄積が、老化やがん、あるいは遺伝性疾患の一因となっていると考えられている。また一方で、突然変異は免疫系において抗体や T 細胞受容体の多様性を生み出すこと等に積極的に関わっていることも明らかにされている。このように、ゲノムの変化は生物に細胞や個体のレベルから種レベルまで多大な影響を及ぼしているが、その変化の大きさに着目すると、点突然変異といった「塩基配列」レベルのものから、転座や不等交叉といった大規模な「染色体」レベルの再編を伴うものまで、様々なものが存在する。点突然変異に関しては、大腸菌を始めとする様々な生物における *in vivo*、*in vitro* の研究が進んでおり、その発生や抑制のメカニズムが明らかにされつつある。一方で、染色体レベルの変化についての研究は、これまで主にがん細胞を対象とした細胞学的解析が中心となっており、染色体の異常や再編を体系的に解析する実験的アプローチが少ないために、その発生や制御の分子機序に結びつく情報は非常に限られているのが現状である。

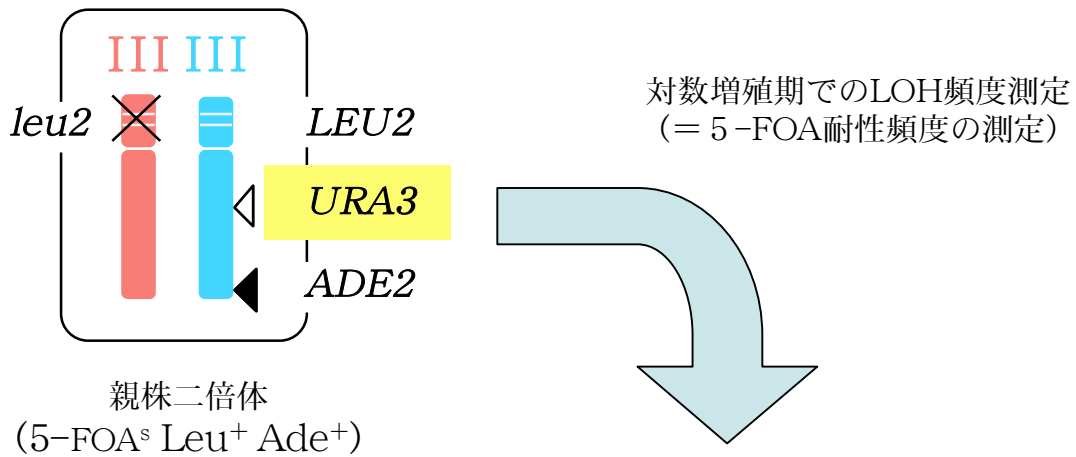
I-1 出芽酵母二倍体をモデルとした LOH 解析系

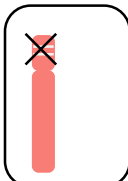
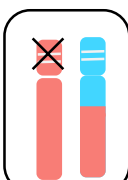
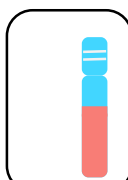
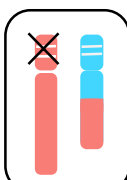
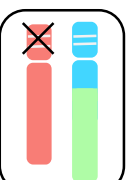
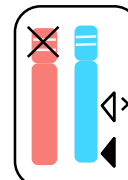
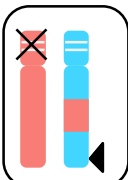
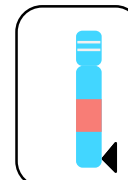
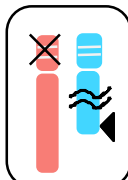
当研究室では、染色体レベルでの遺伝的変化の発生や抑制の分子メカニズムを明らかにすることを目標に、出芽酵母二倍体細胞をモデル生物とした LOH 解析系を構築し、研究を進めてきた (Hiraoka et al. 2000 ; Umezu et al. 2002)。出芽酵母をモデル生物とすることによる長所には様々な点が挙げられる。まず、実験を行う上での利点として、大きな細胞集団の取り扱いが容易であるため、定量的な解析が行いやすい。また、一倍体細胞を接合させて二倍体細胞を構築することができるため、一倍体細胞の段階で各種の変異や欠損を導入することにより、様々な遺伝的背景を持つ二倍体細胞を容易に作製することができる。さらに、出芽酵母は真核生物の中では最も早く全ゲノム情報の読み取りが完了しており、染色体の変化によって生じた新たな融合部位等について塩基配列レベルで同定できることが期待された。また、ゲノムの変化を検出する系として、特に二倍体細胞を用いた長所としては、二倍体細胞では片方の必須遺伝子を失ってしまっても生育することができるため、一倍体細胞では死に至ってしまうようなゲノムの変化をもとらえることが可能であ

る点が挙げられる。また、この解析系は第 III 染色体上で発生するゲノムの変化を包括的に捉えるものであるが、第 III 染色体では、複製開始点 (Newlon et al. 1991) や転写単位 (Oliver et al. 1992 ; Goffeau et al. 1996)、減数分裂時の組換えのホットスポット (Zenvirth et al. 1992)、トランスポゾンのホットスポット等 (Oliver et al. 1992 ; Goffeau et al. 1992) の解析が進んでいる。これらの情報をもとに、染色体上で作用しているさまざまな機能装置とゲノムの変化との関係を総合的に考察していけると考えている。

解析系の概要を図 I-1 に示す。この解析系は二倍体細胞中に存在する 1 つの遺伝マーカーが失われる際に生じる様々な遺伝的变化を包括的に捉えようとするものである。用いる二倍体細胞では、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 と表記する) に *URA3* 遺伝子マーカーを挿入している。このように相同染色体上の対立遺伝子座 (アレル) が異なる状態にあることをヘテロ接合性と呼ぶ。この解析系で用いている *URA3* 遺伝子の産物はウラシル生合成に関わっているが、本来の基質と類似した薬剤、5-FOA (5-フルオロオロチン酸) を基質とした場合には、最終代謝産物としてチミジル酸シンターゼの阻害剤を生じる。そのため、野生型の *URA3* 遺伝子を持つ細胞は、5-FOA を含有した培地では dTTP が枯渇してしまい生育できないが、*URA3* の機能が何らかの形で不活化した細胞では 5-FOA に耐性の表現型を示すようになる。この点を利用すると、解析系のヘテロに存在する *URA3* マーカーが失われること、すなわちヘテロ接合性の喪失 (Loss Of Heterozygosity ; LOH) の発生は、細胞集団中に生じる 5-FOA 耐性の発生頻度から測定することができる。*URA3* マーカーの LOH の原因となる遺伝的变化 (LOH イベント) は多岐にわたる (図 I-1) が、この解析系では *URA3* マーカーと同じ染色体上の左腕 III-91 領域に存在する *LEU2* 遺伝子、ならびに、右腕末端部 III-314 領域に挿入した *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、まず LOH イベントを染色体の大まかな構造に基づいて 3 つのクラスに分類している。5-FOA 耐性の表現型を獲得したクローンのうち、染色体の喪失によって第 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 (図 I-1A)。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* マーカーの間で他の染色体との組換えが生じ、右腕末端までの部分が別の染色体 (相同染色体や第 III 以外の染色体) に置き換わったものである (図 I-1B)。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* マーカー内にその機能を損なうような塩基配列の変異 (点突然変異) を生じたものや、*URA3* マーカーを失うような遺伝子変換や染色体内の欠失を生じたものが含まれる (図 I-1C)。

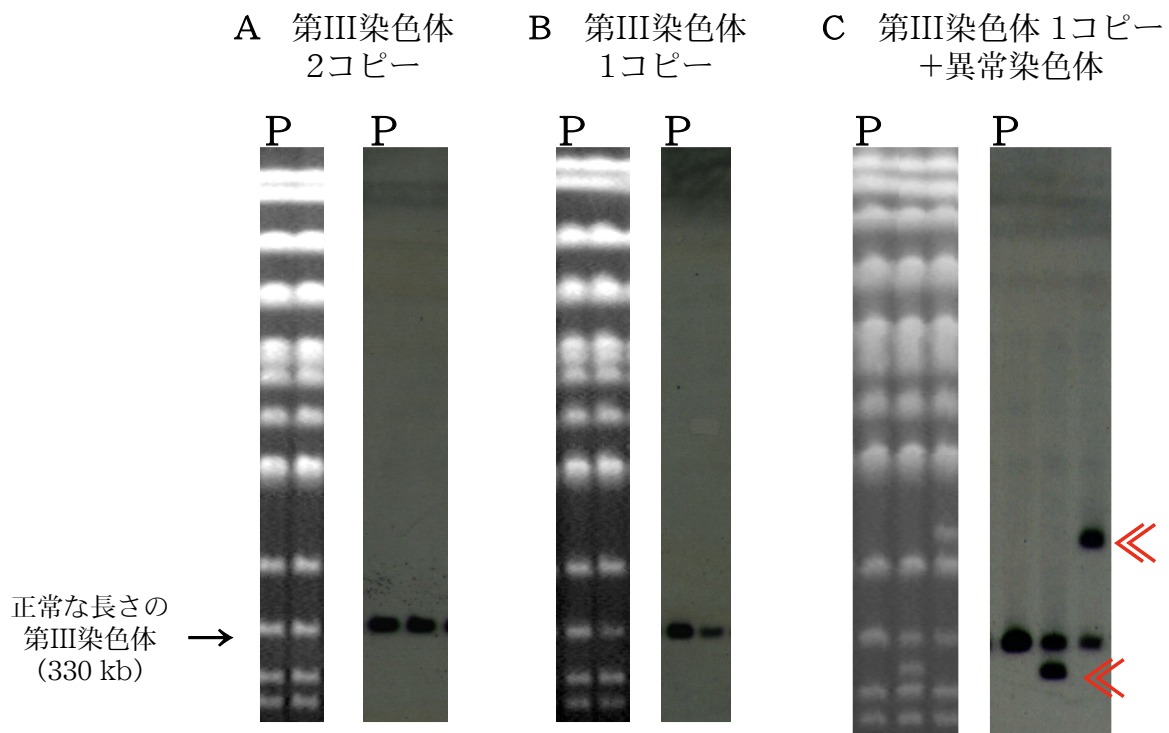
以上の様な表現型による遺伝学的な分類に加え、パルスフィールドゲル電気泳動 (以下 PFGE) と第 III 染色体を特異的に認識するプローブを用いたサザンブロットィング法により第 III 染色体のコピー数やサイズを観察することで、各グループ



		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	A 5-FOA ^r Leu ⁻ Ade ⁻		 a 染色体喪失
	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 
	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

MATa 一倍体株由来の第III染色体を青色で、MATα 一倍体株由来の第III染色体を赤色で示した。二倍体株はこれらの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。



図I-2 LOHクローンの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例

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、染色体内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が生じても第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。

内の遺伝的变化 (LOH イベント) をより細かく分類することが可能である (図 I-2)。染色体喪失では第 III 染色体が 1 コピー分のみとなり、これに加えて不等交叉・転座、染色体内欠失の場合は大小様々なサイズの異常染色体が認められる。交叉や *URA3* マーカー内の変異、遺伝子変換は正常な長さの第 III 染色体が 2 コピー分あるものとして同定される。この内、*URA3* マーカー内の変異と遺伝子変換に関しては、*URA3* 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。さらに、不等交叉や転座については、ゲノム・スキャンニング法 (Umezu et al. 2002) によって染色体の融合部位を特定する方法も確立している。

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な解析を組み合わせることにより、*URA3* マーカーの LOH に伴う様々なゲノムの変化を分類することが可能である。染色体レベルでの変化のうち、交叉と遺伝子変換は相同染色体アレル間の組換えで、転座・不等交叉や染色体内欠失は相同染色体アレル間以外、つまり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発生過程をまとめて「染色体再編」と呼ぶ。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、これに染色体喪失を加えて「染色体異常」と呼ぶ。さらに、染色体異常に加えて点突然変異等によって生じる *URA3* マーカー内変異の発生を含めた事象を「ゲノムの変化」と呼称する。

I-2 RecQ 型ヘリカーゼとゲノムの維持

ヒトには様々な遺伝性疾患が存在するが、特に患者の細胞において様々な染色体の異常 (染色体不安定性) が観察される一群の疾患が知られている (Surrallés et al. 2004)。近年、それらの中で、ウェルナー症候群、ブルーム症候群、ロスムンド・トムソン症候群の原因遺伝子 *WRN*、*BLM*、*RECQL4* が相次いで同定され、これらの原因遺伝子がいずれも大腸菌の *recQ* 遺伝子と相同な領域を持つことが明らかとなった (Brabant et al. 2000)。大腸菌の *recQ* 遺伝子は 7 カ所の領域からなる DNA ヘリカーゼ・モチーフを持っており、その産物は実際に 3'→5' DNA ヘリカーゼ活性を持つことが示されている (Umezu et al. 1990)。大腸菌 *recQ* 遺伝子の相同遺伝子は大腸菌からヒトに至るまで幅広く存在しており (Kusano et al. 1999)、これらは総称して RecQ ヘリカーゼ・ファミリーと呼ばれている。ヒトでは先に述べた遺伝病の原因遺伝子を含めて 5 つの相同遺伝子が同定されている。ウェルナー症候群は、臨床的知見として早老症を示す遺伝病としてよく知られた疾患であるが、がんの発生頻度が高いことも特徴である。細胞学的知見としては、"variegated translocation mosaicism" と呼ばれる、同一細胞株内のクローン毎に異なるタイプの転座や逆位などの異常染色体や染色体喪失が観察されることが特徴である (Peng Hu and Nathan A. Ellis 2003)。ブルーム症候群は、生育不全や免

疫不全、不稔、日光過敏症を示す遺伝病で、がんの種類は異なるが高発がん性を示す点はウェルナー症候群と類似している。細胞学的知見としては、野生株と比べて姉妹染色分体間の交換 (sister chromatid exchanges ; SCEs) の発生頻度が 10 倍以上に上昇することが特徴であるが、この他に様々なタイプの染色体異常が生じていることも報告されている (Peng Hu and Nathan A. Ellis 2003)。また、ウェルナー症候群やブルーム症候群の患者細胞では、細胞周期の S 期進行に遅延が見られたり、S 期チェックポイントに異常が見られることが報告されている (Franchitto and Pichierri 2002)。ロスムンド・トムソン症候群は上記 2 つの疾患に比べ稀な遺伝病であるが、ウェルナー症候群と同様に早老症を示すと共に、皮膚疾患を伴うことが知られ、やはり高発がん性を示す。細胞学知見としては、現在までに詳細は報告されていないが、第 VIII 染色体のトリソミーやその他の染色体異常が発生しやすいらしい (Kitao et al. 2003)。以上のように、これらの疾患では、その様式は異なるものの、いずれも染色体不安定性を示すことから、これらの遺伝病の原因遺伝子、RecQ 型ヘリカーゼの遺伝子が染色体の安定な維持に寄与することが強く示唆されるが、そのメカニズムについてはあまり明らかとなっていない。

出芽酵母では *SGS1* 遺伝子が唯一の RecQ 型ヘリカーゼをコードする遺伝子として同定されている (Gangloff et al. 1994)。SGS1 遺伝子の欠損株では、異なる染色体上に挿入された 2 つの相同配列の間での組換え頻度が上昇することや (Watt et al. 1996)、約 150 回の繰り返し構造を持つ rDNA 領域に導入された *URA3* マーカーが、野生株よりも失われやすいことが報告されており (Gangloff et al. 1994)、上記遺伝病の場合と同様、*sgs1* 欠損株においても染色体不安定性を示すことが分かっている。また、SGS1 は S 期特異的に発現していることも示されている (Frei and Gasser. 2000)。

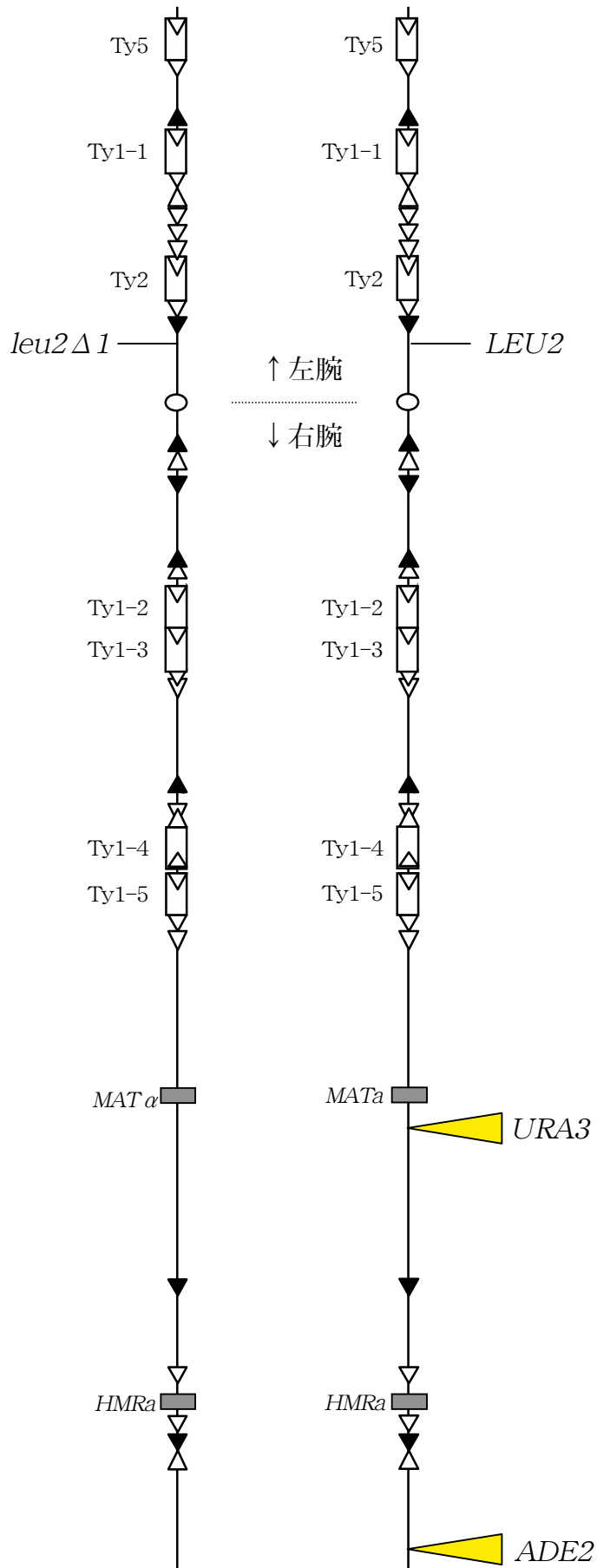
分裂酵母では *rqh1* が唯一の RecQ 型ヘリカーゼをコードする遺伝子として同定されている (Stewart et al. 1997 ; Murray et al. 1997 ; Davey et al. 1998)。分裂酵母では、*rqh1* は S 期において DNA に生じるなんらかの障害からの回復に機能することが示唆されていた (Stewart et al. 1997)。野生株では DNA 複製の阻害剤を投与すると、S 期チェックポイント応答により細胞周期が停止するため、細胞分裂が行われず細胞長の伸長が見られる。一方、チェックポイントの欠損株では、複製が終了していないにもかかわらず、細胞周期が進行して細胞分裂が行われてしまい、ゲノムが異常に分配される。この際、細胞の中央部に核を切断するように細胞壁が形成されることから、この現象は "cut-phenotype" と呼ばれ、S 期チェックポイント欠損の目安とされている。*rqh1* 欠損株では、複製の阻害剤を投与すると、細胞の伸長が見られるにもかかわらず、その後の過程で "cut" が生じることから、S 期チェックポイントそのものは正常であるが、その後の回復プロセスに異常があることが示唆された。また、この条件下において、相同染色体上にそれぞれ異なる変異を導入した同一遺伝子マーカー間での組換え頻度が、野生株の 10 倍以上に上昇

していたことから、*rqh1*欠損株においても染色体不安定性が高まることが示されている。

以上をまとめると、RecQ型ヘリカーゼは総じて、S期において発生する染色体不安定性を誘発するような要因に対して、それを解消するプロセスに機能することで、染色体の維持に寄与していることが明らかとなってきた。S期における問題の発生と、その問題からの回復といった点に関しては、これまでに当研究室で行われたLOH解析によっても、以下の様な知見が得られている。

I-3 野生株における LOH 解析により得られた知見～相同組換えの関与～

平岡らが LOH 解析系を用いて野生株に生じる LOH を解析した結果、以下のことが明らかとなった (Hiraoka et al. 2000 ; Umezu et al. 2002)。野生株における LOH の発生頻度は 1.2×10^{-4} であり、その原因となる遺伝的変化として主なものは、約半分が染色体喪失 (図 I-1 A-a)、次いで 30-35%が交叉型のアリル間組換え (図 I-1 B-a)、約 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り、この内、転座や不等交叉 (図 I-1 B-b) が全体の 6%、染色体内の欠失によるもの (図 I-1 C-c) が全体の 2%を占めていた。同じアリル間組換えでも *URA3* マーカーの局所に生じる遺伝子変換は発生頻度が 10^{-7} のオーダーと交叉型より 2桁低く、また、点突然変異の発生頻度は 10^{-8} のオーダーとなり、染色体の変化に比べて非常に低いことが分かった。サイズに変化を生じた異常染色体については、新たに生じた染色体の融合部を特定するために、定量的 PCR を利用したゲノムスキニング法を開発し、その塩基配列を決定した (Umezu et al. 2002)。その結果、解析を行った約 50 例の全てにおいて、融合部には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。転座や不等交叉の場合には、全ての融合部に 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であり、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出芽酵母のゲノムプロジェクトのデータをもとに判明している (Boeke 1991)。本研究に用いている株の第 III 染色体上には、ゲノムプロジェクトでは示されていないものも含め、5 コピーの Ty1 因子と複数の LTR 配列が存在していることを明らかにしている (図 I-3、Umezu et al. 2002)。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、異常染色体が染色体間もしくは染色体内のいずれで生じる場合でも、繰り返し配列の相同性を利用した組換え (異所性の相同組換え) により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、



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。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）。

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、交叉の約 6%が染色体喪失を伴ったものであったが（図 I-1 B-a'）、その発生頻度から考えて、これらのクローンは相同染色体アレル間の相同組換えに付随して染色体喪失が生じたものと考えられる（Hiraoka et al. 2000）。

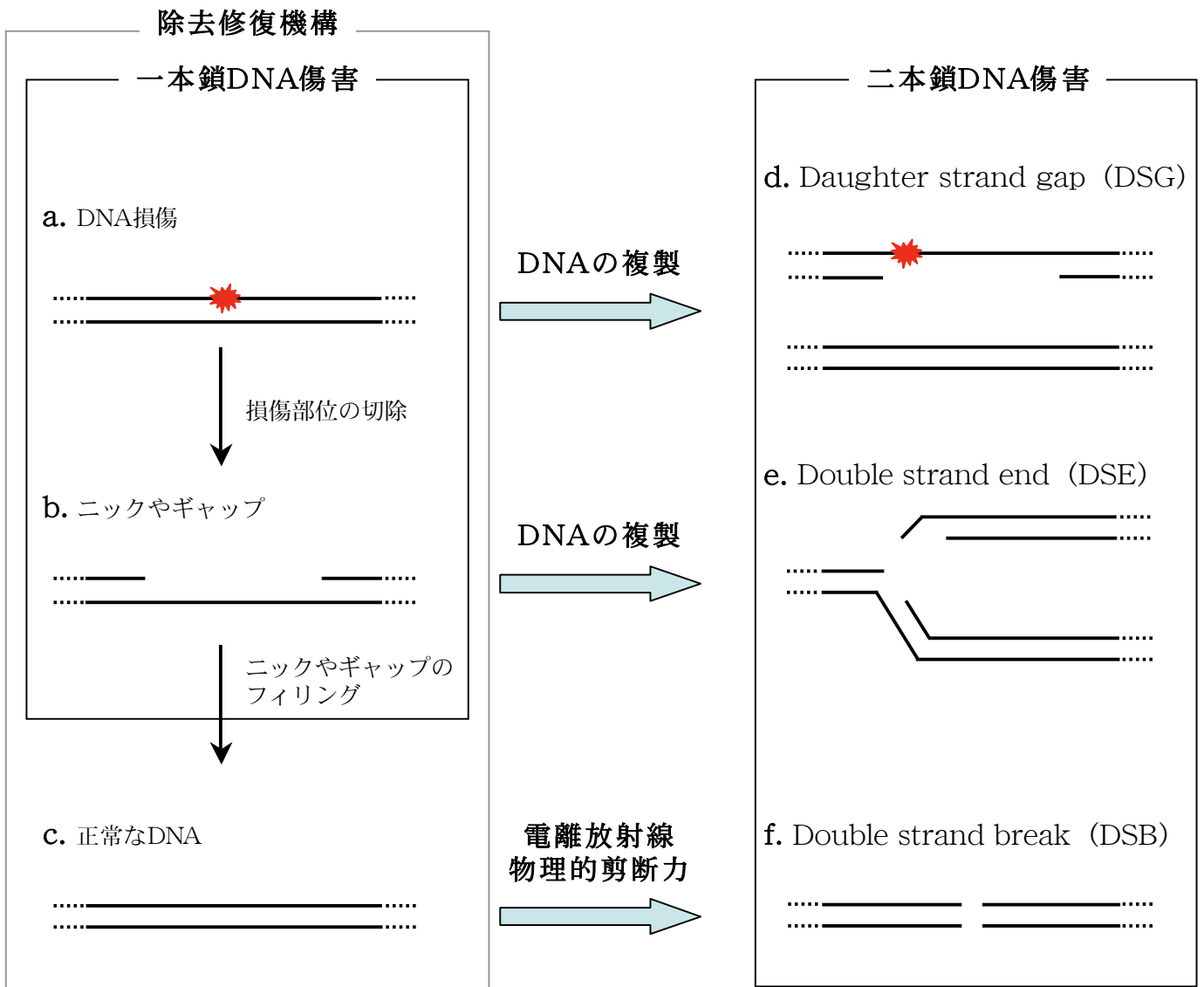
以上の様に、野生株では染色体再編のみならず、染色体喪失といった様々な LOH の発生過程に相同組換え機構が関与し、LOH イベントの大部分に寄与していることが示唆された。

I-4 組換え修復関連遺伝子欠損株、および、複製後修復欠損株における LOH 解析により得られた知見

相同組換え機構は、ゲノムの再編や DNA 修復に際して重要な働きをしていることが知られている。例えば、減数分裂時のキアズマ形成や出芽酵母における接合型変換に際した遺伝子カセットの再編において、相同組換えは必須の機能を果たしている。これらの場合、いずれも細胞が自身の二本鎖 DNA を切断することが知られており、この DNA の切断をきっかけとして相同組換え反応が開始される。また、相同組換えを担っている遺伝子を欠損させた細胞は、DNA に損傷を与える紫外線や電離放射線を照射すると感受性を示すことから、DNA 中に生じた損傷等により引き起こされる障害からの回復には、相同組換えが関与していると考えられている。この相同組換えによる回復プロセスは「組換え修復」と呼ばれている。以上のことから示唆されるのは、相同組換えは、どのような経緯によって生じたものにせよ、DNA に生じる切断や損傷等（これらを総称して「DNA 傷害」と呼ぶ）が引き金となって引き起こされるということである。野生株では相同組換えが LOH の発生に大きく関与していることが示唆されたが、この LOH 解析は、何ら外から DNA 傷害をもたらす様な処置なしに行ったものである。つまり、自然環境下で増殖している細胞中には相同組換えの基質となるような何らかの DNA 傷害が発生し（以下「自然 DNA 傷害」と呼ぶ）、それらが相同組換えによる LOH 発生の主要な原因となっていることが考えられた。以上のような考えに基づき、吉田らは、組換え修復が LOH の発生にどのように関わっているのか、また、組換え修復を必要とするような DNA 傷害の実態はどのようなものなのかについて注目し、組換え修復関連遺伝子の欠損株における解析を行った（Yoshida et al. 2003）。この解析に引き続き、吉田らは LOH として検出されるゲノムの変化の発生や抑制には、組換え修復だけではなく複製後修復と呼ばれる機構も大きく関わっていることを示した（吉田純平 博士論文 2003）。以下、吉田らの研究を始めとしたこれまでの解析から見てきたゲノムの変化を発生させる DNA 傷害と、ゲノムの変化の抑制に関わる機構について述べる。

I-4-1 細胞内で生じる様々な自然 DNA 傷害

細胞は自然環境下において DNA に様々な傷害を受けている。例えば、紫外線は DNA 中の連続したチミン塩基を架橋することが知られているし (DNA 中の塩基が何らかの化学的修飾を受ける場合を、ここでは特に「DNA 損傷」と呼ぶ)、細胞内で発生するフリーラジカルは反応性が高く、DNA に酸化損傷を与えることが示されている。このように、細胞は常に DNA 傷害を生じる様々な要因に曝されている。このような DNA 傷害は、DNA 複製や転写を阻害したり、あるいはゲノム情報の変化や欠損を引き起こすことで、細胞の維持や増殖に少なからず悪影響を及ぼしてしまう。DNA 傷害の内、DNA 損傷 (図 I-4a) は、主に塩基除去修復 (Base excision repair; 以下 BER と呼称) やヌクレオチド除去修復 (Nucleotide excision repair; 以下 NER と呼称) と呼ばれる一連の除去修復により修復される。これらは DNA 損傷部位を含む領域を切除し (図 I-4b)、次いで、残されたギャップを埋めて完了する (図 I-4c)。これらの修復で共通するのは、二本鎖 DNA の一方のみ DNA 損傷が存在し、それらを取り除いて生じたギャップは損傷の無い相補鎖を鋳型として正確に修復されることである。このように、二本鎖の一方のみに DNA 傷害が存在し、もう一方の鎖の情報を元に正確に修復できるようなものを一本鎖 DNA 傷害 (one-strand DNA lesions) と呼ぶ。この中には、除去修復のプロセスで見られるようなニックやギャップ (図 I-4b) も含まれる。一方、除去修復が DNA 損傷を除去する前に DNA 複製が差し掛かると、DNA 複製に機能する DNA ポリメラーゼは、このような損傷を乗り越えられないために複製が阻害される。このような場合、DNA 損傷のある鎖の反対側の鎖にはギャップが生じることになる (I-4d)。このような状況では、一方の鎖にはギャップが存在し、もう一方の鎖には DNA 損傷が存在しているため、互いに相手を鋳型として修復することができない。このような状況にある DNA 傷害を二本鎖 DNA 傷害 (two-strand DNA lesions) と呼び、ギャップと損傷が同時に存在するこの状況を、特に娘鎖ギャップ (daughter-strand gap; 以下 DSG) と呼ぶ。また、ニックやギャップに複製が差し掛かる場合には、複製フォークが崩壊して、DNA 末端が露出した状況が発生する (I-4e) が、この状況は DNA の末端以降どちらの鎖にも鋳型が存在しないことになり、この状況は二本鎖断端 (double strand end; 以下 DSE) と呼ばれる二本鎖 DNA 傷害である。DSG や DSE は、いずれも一本鎖 DNA 傷害に複製が差し掛かった際に生じる点が共通しており、つまりは両方とも S 期特異的に発生する傷害であると言える。さらに、二本鎖 DNA が電離放射線や物理的な力により切断されることがある (I-4f)。このような場合、どちらの鎖にもニックあるいはギャップが存在することになり、やはり修復に際して互いを鋳型として用いることができない。このような傷害を二本鎖切断 (double strand break; 以下 DSB) と呼び、これも二本鎖 DNA 傷害に含まれる。以上の様に、二本鎖 DNA 傷害に共



図I-4 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。二本鎖DNA傷害はDaughter strand gap (DSG) (d)、Double strand end (DSE) (e)、Double strand break (DSB) (f) の三種類に分類される。二本鎖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、一本鎖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。

通する特徴は、一本鎖 DNA 傷害とは異なり、二本鎖ともに DNA 合成の鋳型としての塩基情報配列を失っている点にある。つまり、傷害のある DNA 分子のみでは修復が行えないことになる。以下に詳しく述べるが、組換え修復はこれらの二本鎖 DNA 傷害に対し、鋳型となる情報を供給する様な相同な配列を持つ鎖（例えば S 期中に複製された姉妹染色分体や相同染色体、あるいは、他の染色体上に存在する繰り返し配列等；これらの鋳型を供給する配列を、以後、ドナー配列と呼ぶ）を組換え反応によって組み合わせることで、DNA の修復合成を可能にすることがその役割であると言える。

I-4-2 相同組換え機構～複数の経路とそれに関与する遺伝子～

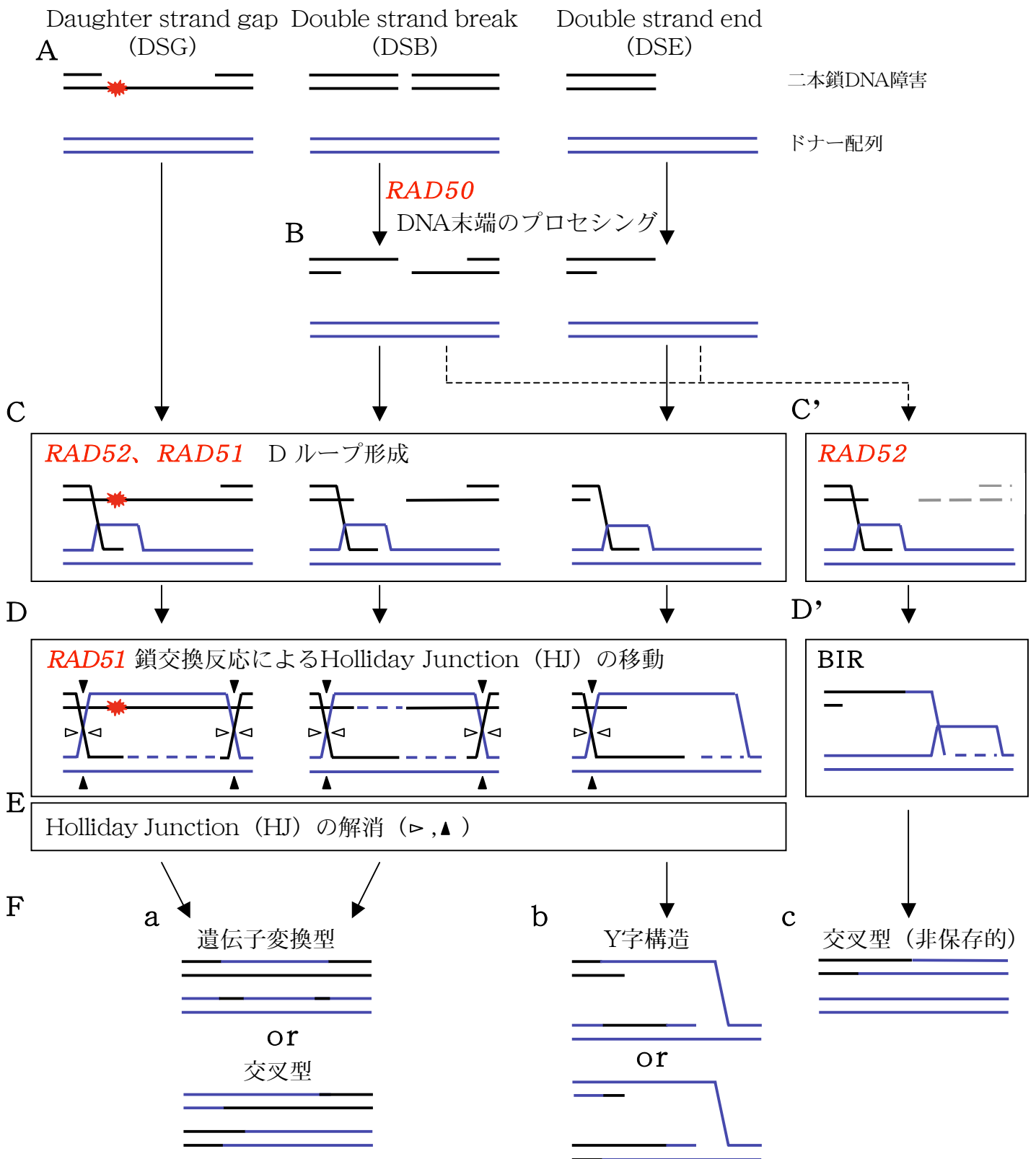
吉田らは組換え修復に機能する遺伝子 *RAD50*、*RAD51*、*RAD52* の欠損株における LOH 解析を行うことで様々な知見を得たが (Yoshida et al. 2003)、これらの結果は、後述する様に本研究にも深い関係がある。まず、これらの遺伝子が相同組換えにおいてどのような機能を持つのかについて以下にまとめた。

出芽酵母の相同組換えに関わる遺伝子は、元々、放射線に対して感受性を示す変異株として同定された。これらの変異株は、放射線感受性が *rad52* 変異と二重にしても *rad52* 単独変異株と比べて増大しないことから、*RAD52* エピスタシス・グループとしてまとめられている (Game and Mortimer 1974)。現在では、相同組換えはいくつかの経路に分けて考えられているが (Paques and Haber 1999, Sung et al, 2000)、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ると考えられる (図 I-5)。この経路では DSG、DSB、DSE のいずれの場合 (図 I-5 A) も解消することが可能である。相同組換え反応の本質は、DNA 傷害によって生じた単鎖 DNA 部位へ Rad51p が結合し、この DNA-蛋白質複合体によって単鎖 DNA と相同な DNA 配列の検索および鎖交換反応が行われることである。DSB や DSE 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 (図 I-5 B)。この様にして形成された単鎖 DNA は通常は単鎖 DNA 結合蛋白質である RPA によって保護され、二次構造の形成やヌクレアーゼ等による DNA 分解から防がれているが、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、DNA とのフィラメント構造を形成すると考えられている。この様にして形成された Rad51p-DNA フィラメントは、単鎖 DNA の塩基配列情報をもとに相同な領域の検索を行い、次いで相同なドナー配列に侵入して D ループを形成し (図 I-5 C)、さらに続いて 2 つの相同配列間の鎖交換反応を開始する (図 I-5 D)。鎖交換反応は X 字状の組換え中間体 (Holliday Junction ; 以下 HJ と呼称す

る)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、HJがHJ特異的なエンドヌクレアーゼ(リゾルベース)によって解離した時点で終了する(図I-5 E)。DSGとDSBが反応の基質である際には2つのHJが形成されるが、HJ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まる(図I-5 F-a)。DSEが反応の基質である場合には一つのHJが形成され、どちらの方向から解離されてもY字型の構造が形成される(図I-5 F-b)。I章4-1項で述べた様に、DSEはDNA複製の際に複製フォークが崩壊することで生じると考えられているが、この一連の反応によってDNA複製フォークが再構築されることになる。このように、相同組換えにはRad52pとRad51pが主要な役割を果たしているが、特にDNAの二重鎖末端が露出するようなDNA傷害、DSEやDSBの組換え修復には、これらに加え、前述のMRX複合体の機能が大きく寄与していると考えられている(Cromie et al. 2001)。MRXは組換え修復だけではなく、non-homologous end joining (NHEJ)と呼ばれるDSBの修復にも関与することが知られている。またDNA末端に結合することで、DNA損傷チェックポイント応答におけるセンサーの役割を担っていることも示唆されている。この様に、MRXは組換え修復だけではなく、露出したDNAの末端が関与する様々なプロセスに多面的に機能していることが明らかにされている(D'Amours and Jackson 2002)。MRXのサブユニットであるRad50pに関しては、SMCファミリーに属する蛋白質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染色体の凝縮に関わるコンデンシンや姉妹染色分体を接着するコヒーシン等、染色体高次構造の制御に関わる蛋白質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ている(Hopfner et al. 2002)。

相同組換えには以上の様な経路の他に、鎖交換反応の亜種的なものとしてBIR(Break induced replication)が知られている(図I-5 D')。この経路は元々、*rad51*欠損株でDSBを生じさせた場合に、セントロメアを持つ方の染色体部分が持たない方の染色体部分を失い、他の染色体部分に置き換わった形になることから見出された(Malkoba et al. 1996)。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(図I-5 C')、その後、Holliday構造の移動と解消が行われる代わりに、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と考えられている。そのため、最終的な組換え体としては交叉型として検出される(図I-5 F-c)。この経路には少なくともRAD52の遺伝子機能が必須であるが(Malkoba et al. 1996 ; Le et al. 1999 ; Signon et al. 2001)、最近、Rad52pに限られた相同領域を介した鎖侵入反応やDループ形成を行えることが*in vitro*の解析から示されており(Kagawa et al. 2002)、おそらくRad51pが無い場合でもRad52pにより形成されたDループが端緒となってBIRが生じていることが考えられる。

以上述べてきた様々な相同組換え経路では、いずれの場合も、ドナー配列として



図I-5 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、DNA損傷を✱で、二本鎖DNA傷害が発生したDNA分子を黒色で、それらに相同なドナー配列（姉妹染色分体や相同染色体、異所性の相同配列）を青色で示した。また、HJがリゾルベースにより解離される方向を白抜き、あるいは黒の矢頭で示した。DSGやDSEにはHJが2つ存在するが、そのどちらもが白抜き、あるいは黒の矢頭方向から解離されると遺伝子変換を生じ、2つのHJの一方が白抜き、もう一方が黒の矢頭方向から解離されると交叉を生じることになる。DSEにはHJが1つ存在し、いずれの方向から解離されてもY字構造を生じることになる。

姉妹染色分体を用いた場合には、ゲノムの変化を伴わずに DNA 傷害の修復や複製の再開が行われるが、その他の染色体上の相同配列がドナー配列となった場合には、交叉や不等交叉、転座等の染色体再編を引き起こしてしまうと考えられる。

I-4-3 自然 DNA 傷害の解消における組換え修復の役割

以上の点を踏まえ、吉田らによる組換え修復関連遺伝子の欠損株における LOH 解析 (Yoshida et al. 2003) によって見出された知見について以下にまとめた。*rad52* 欠損株の場合には、あらゆる種類の染色体再編の発生頻度が野生株のおおむね 1/10 程度と大きく減少していたことから、野生株で見られた染色体再編の大半は組換え修復に依存していることが示された。一方、LOH イベントの内、染色体喪失が全体の 99%以上を占め、その発生頻度は 3.3×10^{-3} であり、野生株の約 50 倍と劇的に上昇していた。組換え修復が行えない状況では、自然 DNA 傷害を解消できない場合がかなりの頻度で発生し、結果として染色体が失われてしまったと考えられる。つまり、通常の増殖を行っている細胞では、組換え修復を必要とする様な自然 DNA 傷害が頻繁に発生しており、野生株では LOH として検出されない形で (以後、エラーフリーと呼称する)、組換え修復 (おそらく姉妹染色分体間の組換え) が染色体の安定な維持に大きく寄与していることが強く示唆された。*rad51* 欠損株や *rad50* 欠損株でも染色体喪失の発生頻度はそれぞれ野生型の 34 倍、42 倍と大きく上昇しており、自然 DNA 傷害のエラーフリーな組換え修復 (姉妹染色分体間組換え) には、これらの因子が協調して機能していると考えられた。

染色体喪失以外の LOH については *rad51* 欠損、*rad50* 欠損それぞれに特異的な影響が見られた。*rad51* 欠損の場合には、交叉や遺伝子変換といった相同染色体アレル間の組換えの発生頻度に関しては野生型よりも低下していたのに対し、転座・不等交叉や染色体内欠失等の異所性組換えの発生頻度は野生株のそれぞれ 14 倍と 8.7 倍と大きく上昇していた。*RAD51* は鎖交換反応に際して姉妹染色分体や相同染色体アレル部位等の相同性の高い配列を優先的に相同組換えのパートナーとして選択することで、“忠実度の高い”組換えを積極的に行うとともに、異所性組換えにつながるような相同性の低い部位での組換え反応を抑制する様に機能していることが示唆された。*rad51* 欠損によって誘発された異所性組換えは、さらに *rad52* を欠損させると *rad52* 単独欠損株と同程度までに大きく低下したことから、*rad51* 欠損下では *RAD52p* によって異所性の相同性の低い部位で形成された D ループから BIR によって転座や不等交叉が生じていると考えられた (図 I-5 D')。

rad50 欠損株の特徴は、全ての種類の染色体再編の発生頻度が野生株に対して大きく上昇していたことである (詳細は「結果」の章を参照)。これらの染色体再編の頻度の上昇は、さらに *rad52* を欠損させると *rad52* 単独欠損株と同程度まで

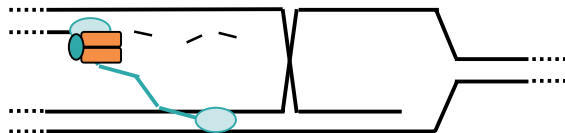
に大きく低下したことから、*rad50* 欠損により誘発される染色体再編の大部分は *RAD52* に依存して生じていることが示された。さらに、*RAD50* は相同組換えに依存したこれらの染色体再編の発生を抑制していることが示された。MRX 複合体を構成するサブユニットを欠損した株では、いずれの場合も放射線によって誘発される姉妹染色分体間の組換えが低下することが報告されており (Bressan et al. 1998 ; Bressan et al. 1999 ; Ivanov et al 1992)、MRX 複合体は姉妹染色分体を組換えのドナー配列として用いる場合に重要な働きをされると考えられている。*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 傷害は解消できずに染色体喪失を引き起こしてしまう。一部の自然 DNA 傷害に関しては、姉妹染色分体以外で利用可能なドナー配列を代わりに用いて相同組換えを行い、染色体再編を生じているのではないかと推測された。先に述べた Rad50p の持つコヒーシン様の構造は、姉妹染色分体間の保持に機能することが示唆されている (図 1-6)。

以上まとめると、相同組換え機構は主に姉妹染色分体間の組換えによって自然 DNA 傷害をエラーフリーに回避する働きをしており、この過程は *RAD52*、*RAD51* および *RAD50* 遺伝子全てが関与することで効率的に行われる、「主要組換え経路」と言うべきものであると考えられた。その他のタイプの相同組換え反応も含めて、*RAD52* 遺伝子はほぼ全ての組換え経路に関与するのに対して、*RAD50* や *RAD51* の遺伝子機能の内のいずれかが失われた場合には、残された機能で行える範囲内で相同組換えが継続されることが示された。つまり、野生株で LOH として検出された染色体異常、特に染色体再編は、頻繁に生じている自然 DNA 傷害を相同組換え機構が極力正確に修復しようとする過程で、姉妹染色分体間の正確な組換え以外での相同組換えによりごく稀に生じているものと考えられた。

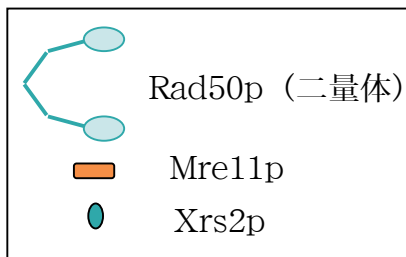
I-4-4 複製後修復の機構の概要

以上述べてきた組換え修復関連遺伝子の欠損株における解析において、*rad51* および *rad52* の単独欠損株ではさらに、点突然変異の発生頻度が野生株の 25 倍程度と大きな上昇を示していた (Yoshida et al. 2003)。このことは、通常は組換え修復により解消されているある種の DNA 傷害が、組換え修復が欠損した際には、代わりに点突然変異を生じる様なプロセスにより修復されていることを示唆する。S 期の DNA 傷害の修復において点突然変異を誘発する様なメカニズムとしては、DNA 損傷部位に何らかの塩基を挿入して複製を継続させる「損傷乗り越え DNA 合成」が知られている。損傷乗り越え DNA 合成が機能する基質は DSG やそれに類するものと考えられることから、上記の結果は、組換え修復の欠損時に損傷乗り越え DNA 合成が代わりに機能したことによる可能性が示唆された。その後の研究により、自然 DNA 傷害の回避プロセスには損傷乗り越え DNA 合成の機構も関与していることが示され (吉田純平 博士論文 2003)、本研究においても後述する理

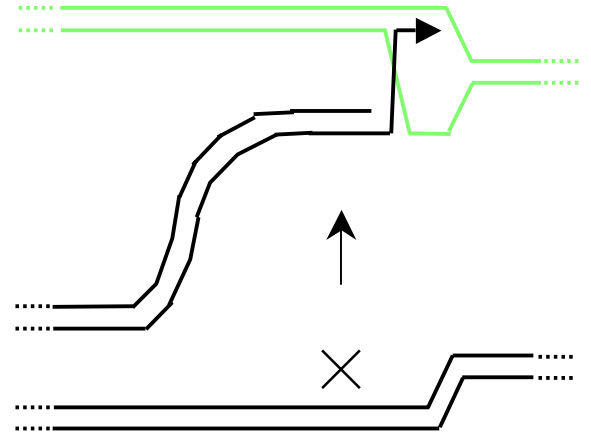
a. RAD50存在下



姉妹染色分体同士の保持



b. RAD50非存在下



図I-6 MRX複合体の姉妹染色分体間の組換えにおける役割

MRXの存在下では姉妹染色分体間の保持が行われるため、姉妹染色分体間の組換えが行いやすい状況にあると考えられる (a)。MRXの非存在下では、姉妹染色分体間の保持が行われないため、代わりに他の染色体との相同組換えの機会が上昇するものと考えられる (b)。

由により、この機構と *SGS1* 遺伝子との関連を調べることになった。この項ではまず、損傷乗り越え DNA 合成を含めた複製後修復機構について概要を述べる。

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ている。近年の研究から、複製後修復は最上位で *RAD6* 遺伝子と *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 (Broomfield and Xiao 2001)。*RAD6* と *RAD18* は、それぞれユビキチン共役酵素 E2 (Rad6p) とユビキチン付加酵素 E3 (Rad18p) をコードしており、その遺伝子産物は複合体を形成していることが知られている。通常の DNA 複製では、複製型のポリメラーゼは PCNA と相互作用して機能しているが、最近、UV 等で DNA に損傷を与えると PCNA が Rad6p-Rad18p 複合体に依存して非蛋白質分解性のモノユビキチン修飾を受けることが示され (Hoegge et al. 2002)、さらにこの修飾に依存して損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼ pol η (後出) が PCNA と相互作用することが *in vitro* の解析より示された (Kannouche et al. 2004)。このことから、DNA 損傷により複製に支障を来して DSG が形成されると、Rad6p-Rad18p 複合体により PCNA が修飾を受け、DNA 複製モードから損傷乗り越え DNA 合成モードにスイッチするというモデルが想定されている。*RAD30* 遺伝子は上記の pol η をコードし (Johnson et al. 1999a)、*REV3* 遺伝子は別の損傷乗り越え型 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 (Morrison et al. 1989)。*in vitro* の解析により、これらの DNA ポリメラーゼは通常の複製に用いられるポリメラーゼとは異なり、鋳型 DNA 上の損傷に対して効率的に塩基を挿入することが知られている (Nelson et al. 1996 ; Johnson et al. 1999b)。*RAD5* 遺伝子はユビキチン付加酵素 E3 (Rad5p) を、また、*RAD5* と同じ経路に属する *MMS2*、*UBC13* 遺伝子はユビキチン共役酵素複合体 E2 (Mms2p-Ubc13p) をコードしており、これらの遺伝子産物は複合体を形成していることが分かっている (Ulrich and Jentsch. 2000)。Rad5p-Mms2p-Ubc13p 複合体は、上記の Rad6p-Rad18p 複合体が PCNA をモノユビキチン修飾した後、引き続き非蛋白質分解性のポリユビキチンを付加することが知られているが、その後のプロセスについては明らかとなっていない。*RAD5* の関与する経路は主にエラーフリーに修復を行うことが示唆されている (Broomfield and Xiao 2001)。

I-4-5 自然 DNA 傷害の解消における複製後修復の役割

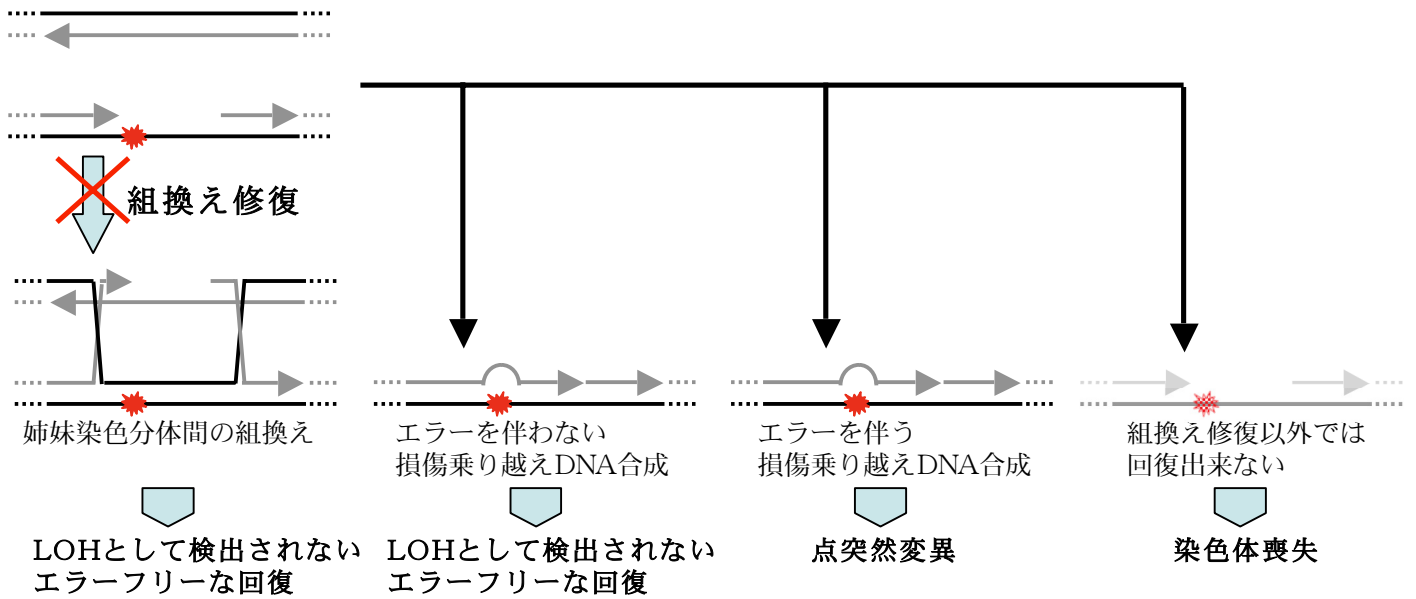
以上の点を踏まえ、複製後修復欠損株における LOH 解析によって見出された知見について以下にまとめた。(吉田純平 博士論文 2003)。

複製後修復を最上位で損なっている *rad18* 欠損株の LOH 解析を行ったところ、LOH 全体の発生頻度は野生株の 12 倍程度に上昇しており、その内の 6 割が染色

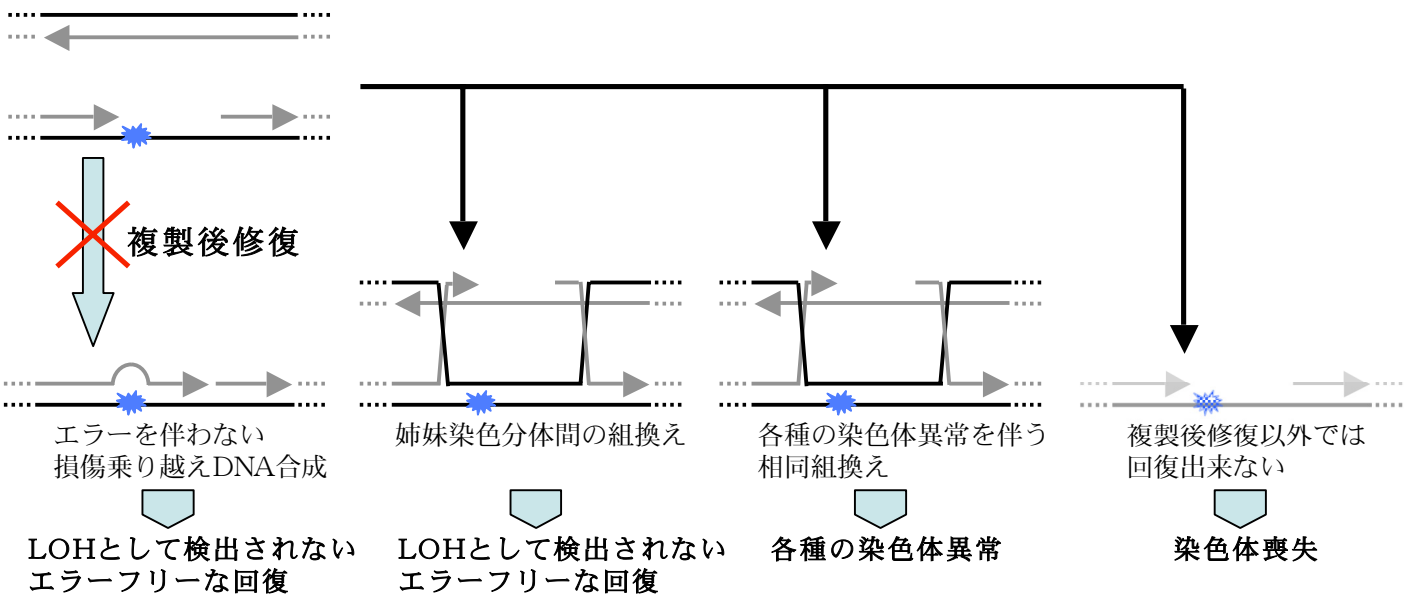
体喪失、残りの 4 割が染色体再編であった。染色体再編は様々なものが野生型の 10 倍程度の発生頻度を示したが、遺伝子変換の場合には野生株の約 300 倍と劇的に上昇していた。*rad18* 欠損によって染色体再編が大きく上昇したことから、本来は複製後修復機構が修復していた自然 DNA 傷害について、一部は組換え修復が代替して修復することができるが、その結果、LOH として検出される染色体再編、特に遺伝子変換を大きく上昇させてしまう様な組換え反応を誘発してしまうことが示唆された。言い換えれば、複製後修復機構はこのような自然 DNA 傷害に作用することで、染色体再編を伴ってしまう様な不正確な修復プロセスを抑制していると言える。また、*rad18* 欠損によって染色体喪失の発生頻度が野生株よりも上昇したことは、複製後修復でしか回避できない自然 DNA 傷害が存在し、*rad18* 欠損では結果として染色体が失われてしまったことを示唆している。*rad18 rad52* 二重欠損株における染色体再編の発生頻度は、*rad52* 単独欠損株と同程度にまで減少したことから、*rad18* 欠損によって誘発された染色体再編は組換え修復に依存していたことが確認された。しかしながら、LOH 全体の発生頻度は、*rad18* 欠損株と *rad52* 欠損株の頻度の合計を大きく上回る値 (6.5×10^{-3}) を示し、その 99.8% を染色体喪失が占めていた。このことから、複製後修復と組換え修復は、どちらか一方が損なわれている場合には、もう片方の修復経路が代わりに機能してエラーフリーに DNA 傷害を解消することもできることが示された。

以上をまとめると (図 I-7)、DSG 型の自然 DNA 傷害には、組換え修復が優先して作用するものと (図 I-7A)、複製後修復が優先して作用するもの (図 I-7B) があると想定される。組換え修復が欠損した際には、元々組換え修復が作用していた DSG の内 (図 I-7A)、一部は複製後修復により代替され、エラーフリーな形で修復されるが、一部のものは点突然変異を伴う形でプロセスされてしまう。また、こちらのタイプの DSG 中には、組換え修復以外では回避できないものも存在し、その帰結として染色体喪失が発生するのだと考えられる。一方、複製後修復が欠損した際には、元々複製後修復が作用していた DSG の内 (図 I-7B)、一部は組換え修復による姉妹染色分体間の組換えでエラーフリーな形修復されるが、一部のものは各種の染色体異常を伴う形の組換えでプロセスされてしまう。また、こちらのタイプの DSG 中には、複製後修復以外では回避できないものも存在し、その帰結として染色体喪失が生じるものと考えられる。両方の経路が欠損した際には、それぞれの経路のみで担っていた DNA 傷害と、双方が互いに代替して修復することが可能であった DNA 傷害が、全て回避できなくなるため、そのほとんどが染色体喪失を引き起こし、相乗的に LOH として顕在化するものと考えられる。逆に言えば、それぞれの経路が優先的に作用している DSG は、他方の経路が作用すると、ゲノムの変化を引き起こしてしまう可能性があるため、通常はゲノムの変化を抑える様に、それぞれの経路が働いていることが考えられる。

A. 組換え修復が優先的に作用するDaughter strand gap (DSG)



B. 複製後修復が優先的に作用するDaughter strand gap (DSG)



図I-7 Daughter strand gap (DSG) における
組換え修復と複製後修復の機能的な相互作用

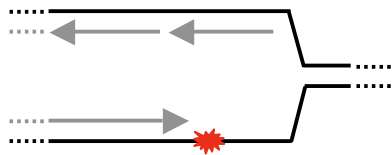
組換え修復が優先的に作用するDSGのDNA損傷を★で、複製後修復が優先的に作用するDSGのDNA損傷を★で、二本鎖DNAを二本の実線で示した。また、新生鎖を灰色の矢印で示した。DSG型のDNA傷害には、組換え修復が優先的に機能するDNA損傷に由来するもの(A)と、複製後修復が優先的に機能するDNA損傷に由来するもの(B)があると考えられる。組換え修復、あるいは、複製後修復が欠損した際には、もう一方の修復機構が一部はエラーフリーに代替することが出来る。しかし、一部についてはゲノムの変化を伴う形で不完全に代替してしまうことになる。また、一部については代替されず、その帰結として染色体喪失を生じてしまう。そのため、通常はそれぞれの経路がエラーフリーに機能できるDNA損傷に由来するDNA傷害に優先的に機能することで、他方の経路により不完全なゲノムの維持が行われてしまうリスクを回避しているとも見なせる。

I-5 本研究の目的

以上示してきた様に、DNA 複製時、つまり S 期には、単に DNA 損傷だけではなく、複製に依存して様々な DNA 傷害が発生しており、それらは組換え修復や複製後修復により大半はエラーフリーに回避されているが、その過程で LOH として検出されるエラーが一部に生じてしまうことが明らかとなってきた。一方で、これらの結果は、我々の LOH 検出系が S 期で生じるトラブルに依存して発生するゲノムの変化を捉えていることを示している。このことから、LOH 検出系を用いることで、出芽酵母における RecQ 型ヘリカーゼ、SGS1 の役割を解析できると考えた。これまでの研究から、出芽酵母や分裂酵母では RecQ 型ヘリカーゼの欠損により、測定に用いられた「特定の部位での組換え」の発生頻度が上昇すること、および、ウェルナー症候群やブルーム症候群等の患者細胞では様々な染色体異常が生じやすいことが示されてはいるが、それぞれ"どのような"タイプの染色体異常が"どの程度"生じやすいのかを一元的に解析した例は報告されていない。以上のことから、LOH 解析系を用いて *sgs1* 欠損株におけるゲノムの変化を詳細に解析し、SGS1 がゲノムの維持にどのように寄与しているのかについて明らかにすることを目的として本研究を行った。

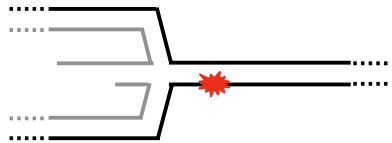
また、本研究開始後、分裂酵母 *rqh1* の遺伝学的解析から、退行した複製フォークを巻き戻す過程に RecQ 型ヘリカーゼが機能することが提唱された (Doe et al. 2000 ; 図 I-8)。複製フォークの退行とは、複製フォークのリーディング鎖の鋳型に DNA 損傷が存在して複製の進行が阻害された場合 (図 I-8a)、リーディング鎖側の新生鎖がラギング鎖側の新生鎖と対合することでフォーク構造が退行するというものである (この退行した構造を以下チキンフットと呼称する ; 図 I-8b)。その後、損傷に対応する部位がラギング鎖側の新生鎖を鋳型として複製され、元の状態のフォーク構造への巻き戻しが起こると (図 I-8c)、リーディング鎖側の新生鎖は損傷部位を乗り越えたことになり (図 I-8d)、DNA 複製の継続が可能となる。このモデルは元々、ヒト細胞を DNA 傷害剤で処理した際に、ラベルした新生鎖同士が対合した場合の密度に相当する DNA 産物が同定され、その DNA が十字構造を取っていることが電子顕微鏡により観察されたことから提唱されたものである (Higgins et al. 1976)。その後、大腸菌においても、遺伝学的な解析からチキンフット様の構造が存在することが示唆された (Seigneur et al. 1998)。以上のことから、フォークの退行は、組換え修復や複製後修復とは別にゲノムの維持機構に関わる一形態ではないかと考えられる様になった。さらに、分裂酵母において、*rqh1* 欠損株の DNA 傷害剤に対する感受性が、HJ 特異的なエンドヌクレアーゼ (リゾルベース) である RusA の過剰発現により部分的に回復することが見出され、*rqh1* 欠損株では HJ 様構造、すなわちチキンフット構造が蓄積していることが示唆された。この結果より Rqh1p は DNA ヘリカーゼとしてチキンフットを巻き戻していることが提唱された。また、先に述べた様に、*rqh1* 欠損株では組換え頻度が上昇

a. リーディング鎖における複製の進行阻害



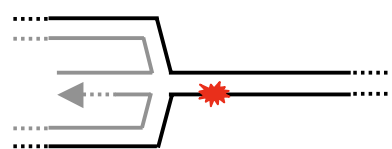
↓ 新生鎖同士の対合

b. チキンフットの形成



↓ ランギング鎖を
鋳型とした鎖伸長

c. 損傷に対応する部位の複製

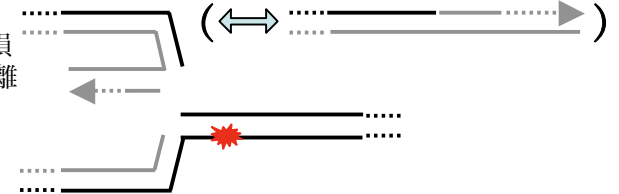


↓ RecQヘリカーゼによる
巻き戻し

d. 複製の再開

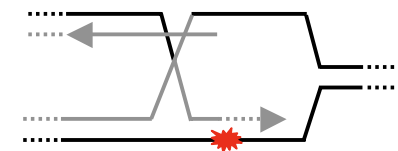


e. DSEの発生



↓ 組換え修復

f. 複製フォークの再構成



図I-8 複製フォークの退行モデルと、想定されるRecQヘリカーゼの役割

DNA損傷を★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。リーディング鎖側の鋳型鎖上にDNA損傷が存在しDNA複製が妨げられると(a)、新生鎖同士が対合して複製フォークが退行する(b)と想定されている。この複製フォークが退行した構造はチキンフットと呼ばれる。ランギング鎖側の新生鎖を鋳型にして損傷に対応する部位を複製した後(c)、RecQヘリカーゼが二本鎖新生鎖を巻き戻すことで、複製フォークの構造に戻せると同時に、損傷該当部位をエラーフリーに通過したことになる(d)。RecQヘリカーゼが欠損した際には、チキンフット構造が解離されてDSEが生じ(e)、組換え修復により複製フォーク構造が再構築される(f)。

することについては、チキンフット構造が何らかの形で切断されて DSE が生じ (図 I-8e)、この DSE が相度組換え機構に依存して修復された結果ではないかと想定された (図 I-8f)。同様に、ブルーム症候群の患者細胞で姉妹染色分体間の組換えが頻繁に発生することについても、DSE が大量に生じるためと解釈できる。このモデルは、*in vitro* の解析においてヒトの Blmp が HJ を巻き戻すことが可能であることが報告されたことから支持され (Karow et al. 2000)、また、ブルーム症候群の患者細胞では、上記 Higgins らの解析法により、チキンフット様の構造が野生株の 6 倍程度蓄積している (Waters et al. 1978) との過去の知見とも一致する。以上より、RecQ 型ヘリカーゼはチキンフットの巻き戻しに機能するとの考えが支持されるようになった。本研究において得られた *sgs1* 単独欠損株での知見は、このモデルと一致するものと考えられた (Ajima et al. 2002 ; 本稿 III-1 参照)。

しかしながら、DNA 傷害剤による感受性について、組換え修復遺伝子 *RAD52* と *SGS1* との二重欠損株が *rad52* 単独欠損株と同程度の薬剤感受性を示すことや (Onoda et al. 2001)、*sgs1 srs2* 二重欠損株が示す合成致死性が、組換え修復遺伝子 *RAD51* の欠損を導入することで回復し、しかも *rad51* 単独欠損と同等の生育を示すこと (Gangloff et al. 2000) 等、先のモデルと矛盾する結果が報告された。先のモデルによれば、RecQ 型ヘリカーゼの欠損下ではチキンフットは DSE の形にプロセスされ、相同組換えに依存して修復されるため、組換え修復をさらに欠損すると、細胞増殖の遅延や阻害がもたらされるはずである。いずれにせよ以上の結果は、*SGS1* が組換え修復と何らかの機能的な関係を持つことを示唆している。また、前述の様に組換え修復と複製後修復との間には、密接な機能的相互作用が見られたことから、*SGS1* は複製後修復とも関係している可能性が考えられた。

これまで、ゲノムの維持に関わる様々な遺伝子間の機能的な相互作用を解析する遺伝学的なアプローチとしては、各種遺伝子の多重欠損株が示す DNA 傷害剤に対する感受性や生育に及ぼす影響について解析する方法が用いられてきた。つまり、特定の DNA 傷害処理に対するエピスタシス群の分類や生育の遅延の程度から、同一のゲノムの維持機構に関与するの否かを判断するものである。この様な判断は、ある特定の遺伝子同士が異なるゲノムの維持機構で機能する場合には、二重欠損によってゲノムの維持がより困難になるはずであるとの前提に基づく。しかしながら、ゲノムの維持に実際に影響を及ぼしているのか、また、及ぼしているとすればどの様な影響なのかについては、余り明確にされてはいなかった。また、この様な解析法では、異なるゲノムの維持機構の関係、例えば、互いに独立して機能しているのか、あるいは、代替し合える関係にあるのか等に関しては明確にすることが難しい。我々の LOH 解析系では、例えば *rad18 rad52* 二重欠損株の解析で示した様に (吉田純平 博士論文 2003)、特定の遺伝子間の機能的な相互作用について、ゲノムの変化に及ぼす影響について包括的に捉えることから判断できる。また、ゲノムの変化に及ぼす影響を定量的に解析できることで、ゲノムの維持機構の相対的な寄与度や相互作用の程度についても、量的な解析が可能になる。

以上の点から、SGS1 と組換え修復や複製後修復に関与する遺伝子との多重欠損株について LOH 解析系を用いて解析し、SGS1 とこれら経路との間にどのような機能的な関係があるのかを明らかにすることが可能であると考え、これらの解析を通じて SGS1 のゲノム維持における役割の理解を深めることを目的とした。

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 YP-Gal 培地 (1% Bacto yeast extract, 2% Bacto pepton, 2% Galactose) を用いた。YPD 培地、SC-drop out 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。URA3 マーカーを失って Ura⁻ の表現型を獲得したクローンの選択、および、URA3 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 μg/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 μm 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 を解析する際の培養には、YPD 培地にウラシルを終濃度 20 μg/ml、アデニンを終濃度 20 μg/ml になるように加え、マーカーに対する選択がかからない様にした。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 μm 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 Geneticin (以下 G418, GIBCO BRL 社) を 500 μg/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 μm 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 μg/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製は、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 の調製は Gen とるくん (酵母・グラム陽性菌用、TAKARA 社) を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/gietz/Trafo.html>) を用いた。

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) を用いた。

II-4 プラスミド DNA

YCp1305 (Onoda et al., 2000) は、pRS314 の *XhoI-SacI* 部位に *SGS1* を含む *XhoI-SacI* 部位 5.6 kb が挿入されているプラスミドであり、東北大学の榎本武

美教授より分与を受けた。

pRS314 (Sikorski and Hieter, 1989) は、pBluescript 由来の大腸菌の複製起点と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、*TRP1* マーカーを持つ大腸菌-出芽酵母のシャトルベクターである。

pRS317 (Sikorski and Hieter, 1989) は、pRS314 の *TRP1* マーカーの代わりに *LYS2* マーカーを持つプラスミドである。

pMO317 は pRS317 の *Bsa I-Eag I* 部位に、*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 (当研究室吉田作製)、*rad52* 欠損株における *RAD52* 遺伝子機能の相補に用いた。

pKU8 は、pRS317 の *ApaI-SacI* 部位に YCp1305 由来の *SGS1* を含む *XhoI-SacI* 部位 5.6 kb 断片が挿入されたプラスミドであり (当研究室梅津作製)、*sgs1* 欠損導入の際の *SGS1* 遺伝子機能の相補に用いた。

pU6H2MYC (De Antoni and Gallwitz 2000) は大腸菌の複製起点とアンピシリン耐性遺伝子を持つプラスミドであり、6His-2MYC-loxP-*kanMX*-loxP カセットが挿入されている。PCR による遺伝子破壊断片の作製に際して用いた (図 II-1 A)。

pSH62 (Gueldener et al 2002) は、pBluescript 由来の大腸菌の複製起点と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、*HIS3* マーカーを持つ大腸菌-出芽酵母のシャトルベクターで、バクテリオファージ P1 の部位特異的組換え酵素である Cre recombinase をコードする遺伝子が出芽酵母の *GAL1* プロモーター制御下に挿入されている。6His-2MYC-loxP-*kanMX*-loxP カセットを用いて遺伝子を破壊した株から、Cre/loxP 部位特異的組換えにより *kanMX* マーカーを切除する際に用いた。

pSH63 (Gueldener et al 2002) は、pSH62 の *HIS3* マーカーの代わりに *TRP1* マーカーを持つプラスミドである。

pU6H2MYC、pSH62、pSH63 は東京工業大学の白髭克彦助教授より分与を受けた。

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 S288c 株と同系統の FY 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) を表記した (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

表II-1 菌株リスト

菌株	遺伝子型	入手方法
一倍体		
YKU23	<i>MATa lys2Δ202 leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 ade2Δ::hisG</i>	梅津桂子助手より分与
YKU34	<i>MATa lys2Δ202 leu2Δ1 ura3-52 trp1Δ63 LEU2 ade2Δ::hisG III-205::URA3¹ III-314::ADE2²</i>	梅津桂子助手より分与
YKU35	pKU8を保持すること以外はYKU23と同じ	梅津桂子助手より分与
YKU36	pKU8を保持すること以外はYKU34と同じ	梅津桂子助手より分与
YMO2	pMO317を保持し <i>rad52Δ::hisG</i> であること 以外はYKU23と同じ	吉田純平博士より分与
YMO4	<i>rad50Δ::hisG</i> であること以外はYKU23と同じ	吉田純平博士より分与
YMO6	<i>rad51Δ::hisG</i> であること以外はYKU23と同じ	吉田純平博士より分与
YMO7	<i>rad50Δ::hisG</i> であること以外はYKU34と同じ	吉田純平博士より分与
YMO8	<i>rad51Δ::hisG</i> であること以外はYKU34と同じ	吉田純平博士より分与
YMO9	pMO317を保持し <i>rad52Δ::hisG</i> であること 以外はYKU34と同じ	吉田純平博士より分与
YMO74	<i>rad18Δ::loxP rad50Δ::kanMX</i> であること以外はYKU23と同じ	吉田純平博士より分与
YMO75	<i>rad18Δ::loxP rad50Δ::kanMX</i> であること以外はYKU34と同じ	吉田純平博士より分与
YSX1	pKU8を保持し <i>sgs1Δ::kanMX³</i> であること以外はYKU23と同じ	本研究
YSX2	pKU8を保持し <i>sgs1Δ::kanMX³</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究
YSX7	pMO317を保持し <i>rad52Δ::hisG sgs1Δ::kanMX</i> であること 以外はYKU23と同じ	本研究
YSX8	pMO317を保持し <i>rad52Δ::hisG sgs1Δ::kanMX</i> であること 以外はYKU34と同じ	本研究
YSX9	pKU8を保持し <i>rad50Δ::hisG</i> であること以外はYKU23と同じ	本研究
YSX10	pKU8を保持し <i>rad50Δ::hisG</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究
YSX11	pKU8を保持し <i>rad51Δ::hisG</i> であること以外はYKU23と同じ	本研究
YSX12	pKU8を保持し <i>rad51Δ::hisG</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究
YSX13	pKU8を保持し <i>rad50Δ::hisG sgs1Δ::kanMX</i> であること 以外はYKU23と同じ	本研究
YSX14	pKU8を保持し <i>rad50Δ::hisG sgs1Δ::kanMX</i> であること 以外はYKU34と同じ	本研究
YSX15	<i>rad50Δ::hisG sgs1Δ::kanMX</i> であること以外はYKU23と同じ	本研究
YSX16	<i>rad50Δ::hisG sgs1Δ::kanMX</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究
YSX17	pKU8を保持し <i>rad51Δ::hisG sgs1Δ::kanMX</i> であること 以外はYKU23と同じ	本研究
YSX18	pKU8を保持し <i>rad51Δ::hisG sgs1Δ::kanMX</i> であること 以外はYKU34と同じ	本研究
YSX19	<i>rad51Δ::hisG sgs1Δ::kanMX</i> であること以外はYKU23と同じ	本研究
YSX20	<i>rad51Δ::hisG sgs1Δ::kanMX</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究
YSX21	<i>rad52Δ::hisG sgs1Δ::kanMX</i> であること以外はYKU23と同じ	本研究
YSX22	<i>rad52Δ::hisG sgs1Δ::kanMX</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究
YSX23	pKU8を保持し <i>sgs1Δ::kanMX</i> であること以外はYKU23と同じ	本研究
YSX24	pKU8を保持し <i>sgs1Δ::kanMX</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究
YSX57	pKU8を保持し <i>sgs1Δ::loxP</i> であること以外はYKU23と同じ	本研究
YSX58	pKU8を保持し <i>sgs1Δ::loxP</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究
YSX81	pKU8を保持し <i>rad18Δ::kanMX sgs1Δ::loxP</i> であること 以外はYKU23と同じ	本研究
YSX82	pKU8を保持し <i>rad18Δ::kanMX sgs1Δ::loxP</i> であること 以外はYKU34と同じ	本研究

YSX103	pMO317を保持し <i>rad52</i> Δ:: <i>hisG sgs1</i> Δ:: <i>loxP</i> であること 以外はYKU23と同じ	本研究
YSX104	pMO317を保持し <i>rad52</i> Δ:: <i>hisG sgs1</i> Δ:: <i>loxP</i> であること 以外はYKU34と同じ	本研究
YSX107	pMO317を保持し <i>rad18</i> Δ:: <i>kanMX rad52</i> Δ:: <i>hisG sgs1</i> Δ:: <i>loxP</i> であること以外はYKU23と同じ	本研究
YSX108	pMO317を保持し <i>rad18</i> Δ:: <i>kanMX rad52</i> Δ:: <i>hisG sgs1</i> Δ:: <i>loxP</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究
YSX111	<i>rad18</i> Δ:: <i>kanMX sgs1</i> Δ:: <i>loxP</i> であること以外はYKU23と同じ	本研究
YSX112	<i>rad18</i> Δ:: <i>kanMX sgs1</i> Δ:: <i>loxP</i> であること以外はYKU34と同じ	本研究
YSX121	<i>rad18</i> Δ:: <i>kanMX rad52</i> Δ:: <i>hisG sgs1</i> Δ:: <i>loxP</i> であること 以外はYKU23と同じ	本研究
YSX122	<i>rad18</i> Δ:: <i>kanMX rad52</i> Δ:: <i>hisG sgs1</i> Δ:: <i>loxP</i> であること 以外はYKU34と同じ	本研究
#775	<i>MATa his3</i> Δ1 <i>leu2</i> Δ0 <i>met15</i> Δ0 <i>ura3</i> Δ0 <i>sgs1</i> Δ:: <i>kanMX</i> ³⁾	白髭克彦博士より分与

二倍体

RD301	<i>MATa/MATα lys2</i> Δ202/ <i>lys2</i> Δ202 <i>LEU2/leu2</i> Δ1 <i>ura3-52/ura3-52 trp1</i> Δ63/ <i>TRP1 HIS3/his3</i> Δ200 <i>ade2</i> Δ:: <i>hisG/ade2</i> Δ:: <i>hisG III-205::URA3/III-205</i> <i>III-314::ADE2/III-314 ::ADE2</i>	YKU23 x YKU34
RD307	<i>sgs1</i> Δ:: <i>kanMX</i> ³⁾ / <i>sgs1</i> Δ:: <i>kanMX</i> ³⁾ であること以外はRD301と同じ	YSX1 x YSX2
RD323	<i>rad18</i> Δ:: <i>kanMX</i> / <i>rad18</i> Δ:: <i>kanMX rad50</i> Δ:: <i>hisG/rad50</i> Δ:: <i>hisG</i> であること以外はRD301と同じ	YMO74 x YMO75
RD324	<i>rad50</i> Δ:: <i>hisG/rad50</i> Δ:: <i>hisG sgs1</i> Δ:: <i>kanMX</i> / <i>sgs1</i> Δ:: <i>kanMX</i> であること以外はRD301と同じ	YSX15 x YSX16
RD325	<i>rad51</i> Δ:: <i>hisG/rad51</i> Δ:: <i>hisG sgs1</i> Δ:: <i>kanMX</i> / <i>sgs1</i> Δ:: <i>kanMX</i> であること以外はRD301と同じ	YSX19 x YSX20
RD326	<i>rad52</i> Δ:: <i>hisG/rad52</i> Δ:: <i>hisG sgs1</i> Δ:: <i>kanMX</i> / <i>sgs1</i> Δ:: <i>kanMX</i> であること以外はRD301と同じ	YSX21 x YSX22
RD327	<i>rad18</i> Δ:: <i>kanMX/rad18</i> Δ:: <i>kanMX rad52</i> Δ:: <i>hisG/rad52</i> Δ:: <i>hisG</i> <i>sgs1</i> Δ:: <i>loxP</i> / <i>sgs1</i> Δ:: <i>loxP</i> であること以外はRD301と同じ	YSX111 x YSX112
RD328	<i>rad18</i> Δ:: <i>kanMX/rad18</i> Δ:: <i>kanMX sgs1</i> Δ:: <i>loxP</i> / <i>sgs1</i> Δ:: <i>loxP</i> であること以外はRD301と同じ	YSX121 x YSX122

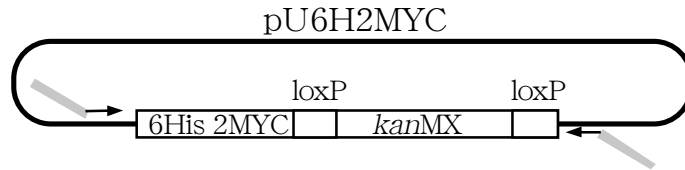
-
- 1) III-205::*URA3* は、第III染色体の左腕テロメアから205 kbの位置に*URA3* 遺伝子マーカー断片が挿入されていることを示している。
 - 2) III-314::*ADE2* は、第III染色体の左腕テロメアから314 kbの位置に*ADE2* 遺伝子マーカー断片が挿入されていることを示している。
 - 3) この*sgs1* 欠損に用いた*kanMX*マーカーは、*Saccharomyces genome deletion project*において様々な遺伝子の破壊に用いられたものである（詳細は本稿II-5-5を参照）。その他の*kanMX*マーカーに関しては、pU6H2MYC (De Antoni and Gallwitz 2000) 由来の6His-2MYC-loxP-KanMX-loxPカセットを使用した。

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 (*MAT α* 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 *MAT α* 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ホモ欠損株を構築した。

II-5-1 *sgs1* 単独欠損株の作製

sgs1 単独欠損株の作製に関しては、YKU23 と YKU34 それぞれを pKU8 で形質転換し、*SGS1* をあらかじめ相補させた YKU35 および YKU36 を作製し (表 II-1)、これらの株を、*SGS1* 遺伝子を破壊した形の DNA 断片で形質転換した。この際用いた遺伝子破壊用の DNA 断片は、*Saccharomyces genome deletion project* で作製された *sgs1 Δ ::kanMX* 株 (表 II-1 #775、東京工業大学の白髭克彦博士より分与) より抽出したゲノム DNA を鋳型とし、*sgs1 Δ ::kanMX* 部位を周辺領域を含む形 PCR 増幅を行い、その産物を電気泳動ゲルから精製することで得た (図 II-1 B)。この DNA 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 137 bp と下流 186 bp の相同な配列を持つものである。*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ため、*KanMX* 形質転換体は G418 を含む SC-Lys 寒天培地で選択した。得られたクローンは再度 G418 を含む SC-Lys 寒天培地に画線培養して単離した。標的部への *kanMX* マーカーの挿入は PCR 法によって確認した。PCR による *SGS1* ORF 完全欠失の検定について、概要を図 II-2 に示す。親株 YKU35 および YKU36 には、染色体上の *SGS1* 遺伝子座とプラスミド上の *SGS1* 遺伝子の 2 カ所に欠損導入の標的が存在する。目的の株は、染色体上の *SGS1* 遺伝子座に欠損が導入されたものであり (図 II-2B)、プラスミド上の *SGS1* 遺伝子に欠損が導入されたもの (図 II-2A) と区別する必要がある。*SGS1* ORF の上流側に、プラスミドと染色体の両方に対合するプライマー F2 と、染色体の場合のみ対合するプライマー F1 を作製し、これらのプライマーをそれぞれ *kanMX4* マーカー内のプライマー R1 と組み合わせて、マーカー導入位置の上流側境界部を挟み込む形で PCR を行った。プライマー F1 と F2 に由来する増幅産物が両方とも得られれば染色体上 *SGS1* 遺伝子座にマーカー遺伝子が導入されたものと判断し (図 II-2B)、プライマー F2 由来の増幅産物のみが得られた場合には、プラスミド上の *SGS1* 遺伝子に欠損が導入されたと判断した (図 II-2A)。得られた目的のクローンについては、マーカー導入位置の下流側境界部についても PCR で同様に確認し、さらに、*SGS1* ORF 全長を挟み込む形の PCR を行って、対応する増幅産物が得られることを確認した。(図 II-2B、C)。使用したプライマーのリストを表 II-2 に示した。YKU35 と YKU36 のゲノム上の



A プラスミド pU6H2MYCを鋳型とした場合

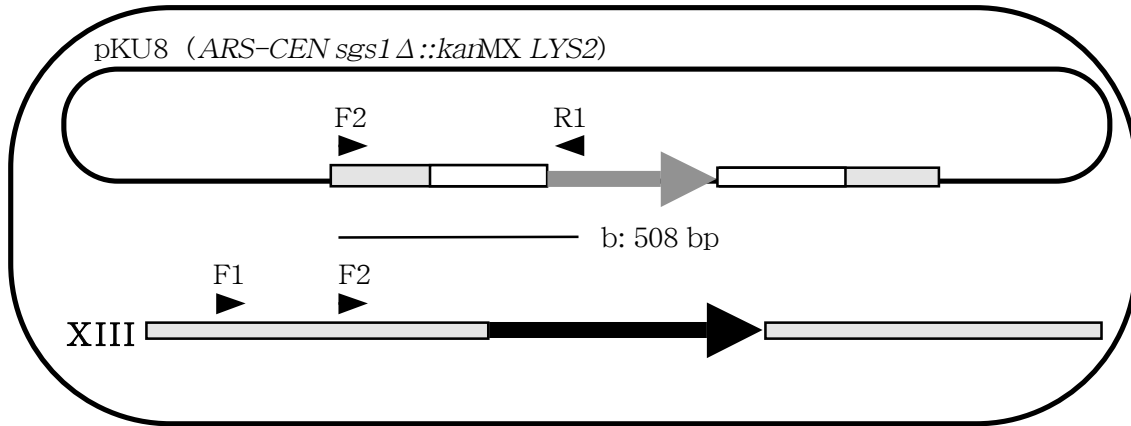


B *sgs1*欠損株ゲノムDNAを鋳型とした場合 (*SGS1* 遺伝子破壊)

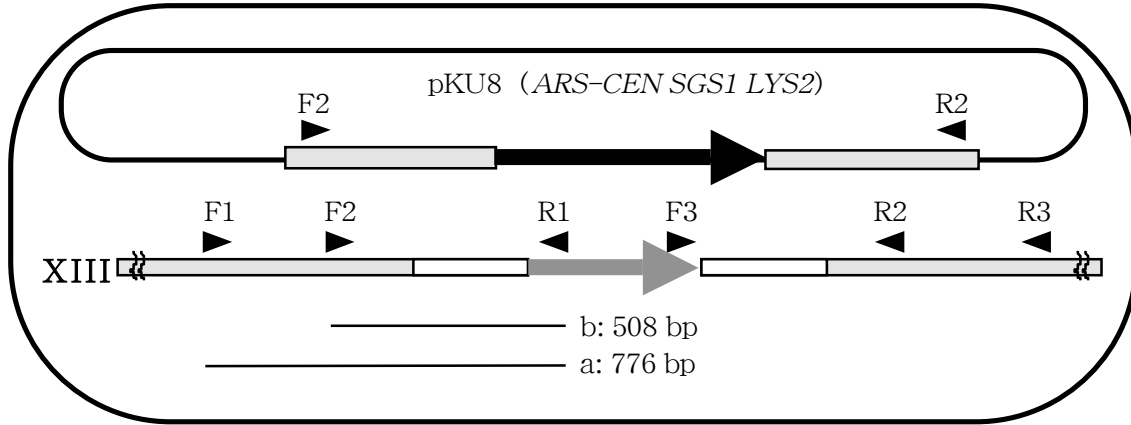
図II-1 PCR法を用いた遺伝子破壊断片の作製

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 (75 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*sgs1* 欠損株 (#775) より抽出したゲノムDNAを鋳型とし、*sgs1*Δ::*kanMX*部位を周辺領域を含む形で増幅する。この場合、*SGS1* 遺伝子ORFの上流または下流に相同な配列の長さはそれぞれ、137 bp、186 bpとなる。

A. プラスミド上のSGS1遺伝子ORF欠失株



B. 染色体SGS1遺伝子ORF欠失株



C.

primerの組み合わせ	F1+R1	F2+R1	F3+R2	F3+R3	F1+R3	F2+R2
増幅産物	a : 776 bp	b : 508 bp	c : 2641 bp	d : 800 bp	e : 4076 bp	f : 4724 bp f' : 1967 bp

図II-2 PCRによるkanMXマーカを用いたsgs1欠損導入の検定

SGS1遺伝子ORFを黒矢印、第XIII染色体を灰色の四角、kanMXマーカ遺伝子を灰色矢印、マーカ遺伝子に付加したSGS1遺伝子座と相同な配列を白四角、プライマーを矢頭で示す。SGS1 ORFより上流領域に対合するプライマーの内、プラスミド上のSGS1遺伝子とSGS1遺伝子座双方に対合するF2 (d13C645.4、表2-2)、および、SGS1遺伝子座のみに対合するF1 (d13C645.7、表II-2) それぞれを、マーカ遺伝子内に設計したプライマーR1 (dkanB、表II-2) と組み合わせPCRを行った。F1とR1に由来する増幅産物a、および、F2とR1に由来する増幅産物bの両方が検出されればSGS1遺伝子座にマーカが導入された細胞 (B)、増幅産物bのみが検出されればプラスミド上のSGS1遺伝子にマーカが導入された細胞 (A) として区別した。SGS1遺伝子座にマーカが導入された細胞として区別したのものについては、さらに、プライマーF3、R2、R3 (順にdkanC、d13W641、d13W638.9、表2-2) を組み合わせPCRを行い、マーカ導入位置の下流側境界部や染色体構造変化についても検定を行った (C)。Cに示した全てのPCR増幅産物が検出されたクローンを、SGS1遺伝子座のSGS1 ORFに完全欠失変異が導入されたものとして判断した。プライマーF2とR2を用いたPCRでは、プラスミド上のSGS1遺伝子ORFに由来する増幅産物fと、SGS1遺伝子座に導入されたマーカ遺伝子に由来する増幅産物fが同時に検出される。プラスミド脱落細胞を選択する際にはF2とR2を用いたPCRを行い、増幅産物fが検出されないことを確認した。

SGS1 が欠損した株をそれぞれ YSX1、YSX2 と命名した (表 II-1)。LOH 解析に用いる際には、毎回これらの株を接合した後に滅菌水に溶解して YPD 寒天培地に塗布後、pKU8 を失って表現型が 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て用いた。その際、PCR による解析 (図 II-6C、プライマー F2+R2) と SC-Lys プレートに生育出来なくなることでプラスミドの脱落を確認した。このようにして構築される *sgs1* 単独欠損二倍体株を RD307 と命名した (表 II-1)。

II-5-2 *sgs1 rad50* 二重欠損株の作製

sgs1 rad50 二重欠損株の作製に関しては、*sgs1* 単独欠損株の作製の場合と同様に、*rad50* 欠損株である YMO4 と YMO7 (吉田純平博士より供与) に pKU8 を形質転換した YSX9 と YSX10 を作製し (表 II-1)、SGS1 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 DNA 断片には、6His-2MYC-loxP-KanMX-loxP カセットを使用した。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 (75 nt) を付加したプライマー (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 SGS1 ORF の上流と下流に相同な配列を 75 bp ずつ持つことになる。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には、*sgs1* 単独欠損株の作製時と同様の手法 (本稿 II-5-1) を用いた。YSX9 と YSX10 に *sgs1* 欠損が導入された株を、それぞれ YSX13、YSX14 と命名した (表 II-1)。これらの株から *sgs1* 単独欠損株の時と同様の手法でプラスミド pKU8 を脱落した株を選択し、それぞれ YSX15、YSX16 と命名した (表 II-1)。YSX15 と YSX16 を接合させて構築される *sgs1 rad50* 二重欠損二倍体株を RD324 と命名した。

II-5-3 *sgs1 rad51* 二重欠損株の作製

sgs1 rad51 二重欠損株の作製に関しては、*sgs1* 単独欠損株の作製の場合と同様に、*rad51* 欠損株である YMO6 と YMO8 (吉田純平博士より供与) に pKU8 を形質転換した YSX11 と YSX12 を作製し (表 II-1)、SGS1 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には、*sgs1 rad50* 二重欠損株の作製時と同様の手法 (本稿 II-5-2) を用いた。YSX11 と YSX12 に *sgs1* 欠損が導入さ

れた株を、それぞれ YSX17、YSX18 と命名した (表 II-1)。これらの株から *sgs1* 単独欠損株の時と同様の手法でプラスミド pKU8 を脱落した株を選択し、それぞれ YSX19、YSX20 と命名した (表 II-1)。YSX19 と YSX20 を接合させて構築される *sgs1 rad51* 二重欠損二倍体株を RD325 と命名した。

II-5-4 *sgs1 rad52* 二重欠損株の作製

sgs1 rad52 二重欠損株の作製に関しては、*rad52* 欠損株である YMO2 と YMO9 に *RAD52* 遺伝子をプラスミド pMO317 で相補した株に (吉田純平博士より供与)、*SGS1* 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には、*sgs1 rad50* 二重欠損株の作製時と同様の手法 (本稿 II-5-2) を用いた。標的遺伝子の破壊の確認は、標的部位の外側に設定したプライマーで PCR を行い、標的部位が *kanMX* マーカーに置換されたことに由来する増幅産物が得られることを指標とした。その後、*kanMX* マーカー内に設計したプライマーと標的部位の外側のプライマーとを用いて PCR を行い、遺伝子置換の境界部の増幅産物が得られることも確認した。YMO2 と YMO9 に *sgs1* 欠損が導入された株を、それぞれ YSX7、YSX8 と命名した (表 II-1)。これらの株から *sgs1* 単独欠損株の時と同様の手法で *RAD52* 遺伝子を相補するプラスミドを脱落した株を選択し、それぞれ YSX21、YSX22 と命名した (表 II-1)。YSX21 と YSX22 を接合させて構築される *sgs1 rad52* 二重欠損二倍体株を RD326 と命名した。

II-5-5 *sgs1 rad18* 二重欠損株の作製

sgs1 rad18 二重欠損株の作製に際しては、6His-2MYC-loxP-KanMX-loxP カセットによる *SGS1* 遺伝子破壊 DNA 断片を用いて (本稿 II-5-2)、*sgs1* 単独欠損株の作製法と同様の方法により (本稿 II-5-1) 改めて *sgs1* 単独欠損株を作製し、それぞれ YSX23、YSX24 と命名した。これらの株から *kanMX* マーカーを Cre/loxP 系による部位特異的組換えで切除するため、YSX23 には pSH62 を、YSX24 には pSH63 を形質転換した。これらの株をそれぞれ 2 ml の YP-Gal 培地に適量懸濁して、二時間穏やかに攪拌しながら培養した後、SC-Lys 寒天培地に塗布した。*kanMX* を失い表現型が G418 感受性になったクローンは SC-Lys G418 寒天培地にレプリカすることによって同定し、それらを SC-Lys 寒天培地から回収した。PCR にて *KanMX* が切除されたことに由来する増幅産物が得られることを確認した後、滅菌水に溶解して SC-Lys 寒天培地に塗布した。pSH62、あるいは、pSH63 を失

い表現型が His⁻、あるいは、Trp⁻になったクローンは SC-Lys-His、あるいは、SC-Lys-Trp 寒天培地にレプリカすることによって同定し、得られたクローンをそれぞれ YSX57 と YSX58 と命名した。これらの株に *RAD18* 遺伝子破壊 DNA 断片を形質転換することにより、*sgs1 rad18* 二重欠損株を作製した。この際に用いた遺伝子破壊断片の作製および断片が導入されたクローンの選択には、*sgs1 rad50* 二重欠損株の作製時と同様の手法（本稿 II-5-2）を用い、遺伝子破壊確認は *sgs1 rad52* 二重欠損株の場合と同様に行った（本稿 II-5-4）。YSX57 と YSX58 に *rad18* 欠損が導入された株を、それぞれ YSX81、YSX82 と命名した（表 II-1）。これらの株から *sgs1* 単独欠損株の時と同様の手法でプラスミド pKU8 を脱落した株を選択し、それぞれ YSX111、YSX112 と命名した（表 II-1）。YSX111 と YSX112 を接合させて構築される *sgs1 rad18* 二重欠損二倍体株を RD328 と命名した。

II-5-6 *sgs1 rad18 rad52* 三重欠損株の作製

sgs1 rad18 rad52 三重欠損株の作製は、*sgs1 rad18* 二重欠損株の時と同様の方法で YSX7 と YSX8 から *kanMX* を切除した株を作製し（YSX103、YSX104 と命名）、さらにこれらの株に *sgs1 rad18* 二重欠損株の時と同様の方法で *rad18* 欠損を導入することにより行い、それぞれ得られた株を YSX107、YSX108 と命名した。これらの株から *sgs1* 単独欠損株の時と同様の手法で *RAD52* 遺伝子を相補するプラスミドを脱落した株を選択し、それぞれ YSX121、YSX122 と命名した（表 II-1）。YSX121 と YSX122 を接合させて構築される *sgs1 rad18 rad52* 三重欠損二倍体株を RD327 と命名した。

II-6 PCR 法

PCR 法に関しては、特に記載のない限り *Ex Taq* polymerase（TAKARA 社）を用い、添付された 10 x buffer と dNTP 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。標準の PCR 反応は 95°C 1 分の DNA 変性の後、92°C 1 分、58°C 0.5 分、72°C は増幅する DNA 1 kb/0.5 分の三段階を 32 サイクルの条件で行った。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を表 II-2 にまとめた。

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')
dRAD18pU6HF	<i>RAD18</i> 遺伝子破壊断片の作製	AAGTGAAAACTAAGTACCACTTGAGCAATGC CACATTAGAAGAAAAACCATCCGCAAGTGAGC ATCACAGCTACTAAGAAAAGGCCATTTTTACTA CTCtcccaccaccatcatcatcac ²⁾
dRAD18pU6HR	<i>RAD18</i> 遺伝子破壊断片の作製	TGTCATCTTTTTATGCATTTATATTTTTGCCCATTT TTAAATAAAATTATTAATTAACAAATGTGCACAA GCTAACAAACAGGCCTGATTACATATACACACC actatagggagaccggcagat
dSGS1pU6HF	<i>SGS1</i> 遺伝子破壊断片の作製 ¹⁾	GGCTAGAGGAAAGGAAAAAATACAGATTATTG TTGTATATATTTAAAAAATCATAACACGTACACA CAAGGCGGTAtcccaccaccatcatcatcac
dSGS1pU6HR	<i>SGS1</i> 遺伝子破壊断片の作製 ¹⁾	CTAAAAAAGTGCCCAAAAAGAATGCTTGGCGA ATGGTGTCTAGTTATAAGTAACACTATTTTATT TTTCTACTCTtgactatagggagaccggcagatc
d13C645.7	<i>SGS1</i> 遺伝子破壊断片の作製	GGATTTGTGGCTTTIACCGTTTATG
d13W640.7	<i>SGS1</i> 遺伝子破壊断片の作製	CAATGTGCACACCACAATATGTG
d3W231	<i>RAD18</i> 遺伝子破壊の確認	GCTCTTCTATGGTATAATCAATTGC
d3C233	<i>RAD18</i> 遺伝子破壊の確認	AGTGAAGTTATTTTCAGCACTTAACG
d13C645.7	<i>SGS1</i> 遺伝子破壊の確認 (F1)	AGAGACTTCGTGATCTGCCTG
d13C645.4	<i>SGS1</i> 遺伝子破壊の確認 (F2)	GGATTTGTGGCTTTIACCGTTTATG
d13W641	<i>SGS1</i> 遺伝子破壊の確認 (R2)	ACACCACAATATGTCTGTGGTTG
d13W638.9	<i>SGS1</i> 遺伝子破壊の確認 (R3)	CTCCGAGCAGTTATTGGACAAG
dkanB	<i>KanMX</i> マーカーを使った 遺伝子破壊の確認 (R1)	CTGCAGCGAGGAGCCGTAAT
dkanC	<i>KanMX</i> マーカーを使った 遺伝子破壊の確認 (F3)	TGATTTTGACGAGCGTAAT

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
d3W197	<i>MAT-HMR</i> 間の染色体再編の同定	AACTATGTCTGCAAACAGCTTGG
d3C294	<i>MAT-HMR</i> 間の染色体再編の同定	CATTATCAATCCTTGCATCCAGC
d3W54	サザンブロッティング用の 第III染色体検出プローブ作製	CTCACACGATCTGACTGTGACC
d3C54	サザンブロッティング用の 第III染色体検出プローブ作製	CGTAAATGGTAACATCTTCGCTG
d3W102	サザンブロッティング用の 第III染色体検出プローブ作製	CGTAAATGGTAACATCTTCGCTG
d3C102	サザンブロッティング用の 第III染色体検出プローブ作製	TCGTTATAATCAAAGGCGTGAGG

- 1) この場合の*SGS1* 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) 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。

II-7 細胞の生育状態の解析

各種遺伝子の欠損が生育に及ぼす影響を調べるため、LOH 解析の場合と同じ培養条件で二倍体株の生育状態を解析した。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 5 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 $40 \mu\text{g/ml}$ 、ウラシルを $20 \mu\text{g/ml}$ 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、光学顕微鏡下で細胞形体の観察と細胞数の測定を行った。O.D. は BECKMAN 社製 DU640 を用いて波長 600 nm で測定した。細胞数の測定には改良ノイバウエル型血球計算板を用いた。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。

II-8 LOH 解析

II-8-1 表現型による分類

LOH 解析に際しては、測定毎に二倍体細胞の構築を毎回行った。まず、目的の変異を持つ株について、それぞれ接合型が 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。得られた細胞について、混入した一倍体細胞を除外し、また、二倍体細胞の 3 つの遺伝子マーカーの保持を保証するために、5 ml の SC-Ade-Leu-Ura-His-Trp 液体培地にて予備培養した。この培養液から 100 cfu 相当の細胞を取り、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 $40 \mu\text{g/ml}$ 、ウラシルを $20 \mu\text{g/ml}$ 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 $\text{Ade}^- \text{Ura}^-$ となった細胞に対し、負の選択圧がかからない様にするためである。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、適宜希釈して、それぞれ YPD、5-FOA、5-FOA-Leu、5-FOA-Ade-Leu の各寒天培地に塗布した。 5×10^7 cfu/ml まで増殖しない欠損株に関しては、対数増殖が停止した時点で集菌した。このプレートに 3~5 日間培養し、生育してきたコロニーを数えて各種 5-FOA 耐性クローンの頻度を測定した。5-FOA 耐性クローンの頻度から 5-FOA 耐性 Leu^+ クローンの頻度を減ずることで 5-FOA 耐性 Leu^- クローンの頻度を、5-FOA 耐性 Leu^+ クローンの頻度から 5-FOA 耐性 $\text{Leu}^+ \text{Ade}^+$ クローンの頻度を減ずることで 5-FOA 耐性 $\text{Leu}^+ \text{Ade}^-$ クローンの頻度を算出した。1 グループを 4~7 実験区として 3~

4 グループの解析を行い、それぞれのグループ毎の中間値（メディアン値）を求め、その平均値を最終的な頻度とした。頻度の統計学的な評価は、3~4 つの中間値の標準偏差（SD 値）を求めることによって行った。以前は、全ての実験区より中間値を求めていたが、実験誤差について評価するために、上記の様に LOH 算出法を改変した。各欠損株について解析を行った合計実験区数は以下の通りである。カッコ内には 5×10^7 cfu/ml に至らなかった欠損株について飽和時の平均生菌濃度 ($\times 10^7$ cfu/ml) を示す。sgs1 欠損株 ; 28 実験区、sgs1 rad50 二重欠損株 ; 22 実験区 (1.49)、sgs1 rad51 二重欠損株 ; 21 実験区 (4.29)、sgs1 rad52 二重欠損株 ; 14 実験区 (2.27)、sgs1 rad18 二重欠損株 ; 18 実験区、rad18 rad50 二重欠損株 ; 20 実験区 (2.39)、rad50 rad51 二重欠損株 ; 15 実験区 (2.92)、rad18 rad52 sgs1 三重欠損株 ; 13 実験区 (1.19)。

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、LOH クローンについて第 III 染色体のサイズとコピー数を解析するために PFGE を用いた。

PFGE に用いるゲノム DNA 試料は巨大な DNA 分子であるため、調製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、並びに除蛋白質処理を行う。このようにして調製した 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 cells を包埋し、溶菌処理の後、1mg/ml Proteinase K (TAKARA 社) にて除蛋白質処理を行った。一回の泳動につき、プラグの約 1/3 量 (2×10^7 cells 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% の濃度で用い、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°C 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 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、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、その相対比から第 III 染色体のコピー数を決定した。

II-8-3 サザンブロットィング法

サザンブロット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) を用い、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 プローブの調製は、親株二倍体のゲノム DNA を鋳型とし、表 II-2 に示した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、Gene Images Random Prime Labelling Module (Amersham 社) を用いて標識した。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 CDP-Star detection module (Amersham 社) を用いた。

II-8-4 PCR による URA3 遺伝子挿入領域の構造解析～遺伝子変換と点突然変異の分類～

PFGE では見分けられない遺伝子変換と URA3 内変異については、第 III 染色体上の URA3 挿入領域を挟み込むように設定したプライマーセット (表 II-2) で PCR を行い、得られた増幅産物から URA3 ORF の有無を確認することにより行った。すなわち、野生型株、および、URA3 内変異を生じたクローンでは、URA3 ORF の存在に由来する増幅産物と URA3 ORF が存在しないことによる増幅産物の双方が得られるのに対して、遺伝子変換が生じたクローンでは URA3 ORF が存在しないことによる増幅産物のみが得られることを指標とした。

II-8-5 PCR による ADE2 遺伝子挿入領域の構造解析～ADE2 マーカーのホモ化の解析～

ADE2 マーカーのホモ化の有無については、第 III 染色体上の ADE2 挿入領域を挟み込むように設定したプライマーセット (表 II-2) で PCR を行い、得られた

増幅産物から *ADE2* マーカーの有無を確認することにより行った。すなわち、野生型株、および、*ADE2* マーカーのホモ化を伴わない LOH クローンでは、*ADE2* マーカーの存在に由来する増幅産物と *ADE2* マーカーが存在しないことによる増幅産物の双方が得られるのに対して、ホモ化が生じたクローンでは *ADE2* マーカーが存在すること、あるいは、存在しないことによる増幅産物のみが得られることを指標とした。

II-8-6 PCR による *MAT-HMR* 間の染色体内欠失の同定

MAT-HMR 間の染色体内欠失は、第 III 染色体上の *MAT* 遺伝子と同一腕上で 90 kb 離れた距離に位置する相同配列 *HMR* との間で生じる相同組換えにより発生する (Hiraoka et al. 2000)。この欠失の同定は、*MAT-HMR* 間の染色体内欠失が生じた第 III 染色体上の融合部を挟み込むように設定したプライマーセット (表 II-2) で PCR を行い、増幅産物が得られることを確認することにより行った。相同染色体間で *MAT-HMR* 間の不等交叉が生じる場合については、5-FOA 耐性 Leu^+ Ade^- クローンで同様の PCR を行い確認した。

III 結果

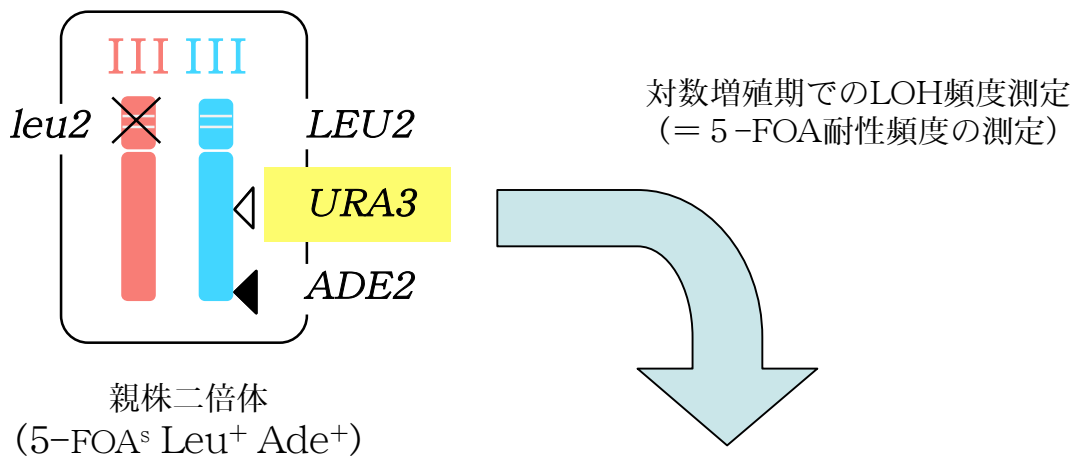
III-1 LOH 解析系の概略

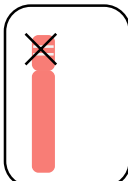
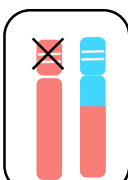
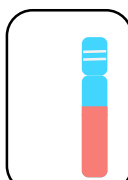
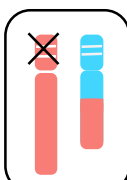
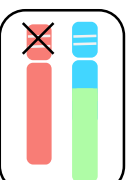
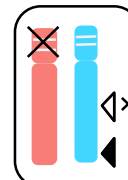

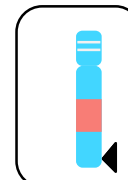
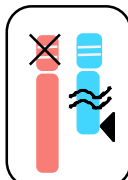
当研究室では、出芽酵母二倍体細胞をモデル生物とし、点突然変異から染色体異常や再編を広く体系的に検出し、さらにそれを分類して変異の種類毎に定量的に比較する解析系を構築してきた (Hiraoka et al. 2000, Umezu et al. 2002)。解析系の基本構想を図 III-1 に示した。この系では親株となる二倍体細胞を富栄養条件下で培養し、その過程で第 III 染色体上に発生する様々なゲノムの変化を検出する。この検出では、二本ある第 III 染色体の内、片方にのみ存在する *URA3* マーカーの機能が失われた細胞、つまり LOH を生じた細胞が 5-FOA 耐性を示すことを指標としている。同時に、同じ染色体上の *LEU2* 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* マーカーの不活化に伴う染色体構造の変化を同定する。この段階でゲノムの変化は、クラス A ; 「染色体喪失」 (5FOA 耐性 $Leu^- Ade^-$)、クラス B ; 「染色体間の組換え」 (5FOA 耐性 $Leu^+ Ade^-$)、クラス C ; 「*URA3* 遺伝子内の変異」・「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できる。このよう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 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 に伴うゲノムの変化を更に詳細に分類すること (図 III-1, a-c 及び a'-b') が可能である。さらに、定量的 PCR を利用して異常染色体に生じた新たな融合領域を特定する方法を開発し、染色体切断点の塩基配列を決めることも行っている (Umezu et al. 2002)。

この LOH 解析系の特徴は、同じ細胞集団で発生した様々なゲノムの変化を同時に 1 つの解析系で検出できることである。序論でも述べた様に、ゲノムの変化の発生には複数の修復機構が相互に影響を及ぼし合っていることが分かってきたが、これらの機構間の関係を解析するためには、それぞれの機構がもたらすゲノムの変化を包括的に捉える必要がある。我々の LOH 解析系では、ある遺伝子の欠損がどの修復機構に欠損をもたらすかと同時に、その欠損が新たに別の修復機構により補われている状況を LOH の変化として検出することができる。また、内在的要因により細胞内で実際に生じているゲノム変化を検出していることもこの解析系の特徴の 1 つである。

なお、比較のために用いる野生株のデータに関しては、最近、当研究室の中磯らにより最初に報告したもの (Hiraoka et al. 2000) よりも詳細な野生株の解析がなされたため (未発表)、本研究ではこのデータを以下に用いることとした。また、本研究において示す組換え修復関連遺伝子や複製後修復関連遺伝子の LOH 発生頻

度は、吉田らの解析結果 (Yoshida et al. 2003、吉田純平 博士論文 2003) に基づいているが、本研究では LOH 発生頻度の算出法を若干改変しているため (II 章 8-1 項参照)、本稿と吉田らの論文の間で一部、数値が若干異なるが、これらの違いは議論に影響を及ぼす本質的な変化ではないことを注記しておく。



		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
	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III-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。二倍体株はこれらの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 (a) によるLOHに分類される。

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。

III-2 *sgs1* 欠損株では全種類の染色体異常の発生頻度が上昇する

sgs1 欠損によりどのようなゲノム異常が発生するのかを定量するために、両方のアリの *SGS1* 遺伝子を完全に欠失した LOH 解析系二倍体細胞を構築し(表 II-1)、*sgs1/sgs1* 欠損株 (以下、簡略化のため *sgs1* 欠損株と表記) で生じる LOH について解析した。

LOH の表現型による分類では、*sgs1* 欠損株ではクラス A ; 「染色体喪失」、クラス B ; 「染色体間の組換え」、クラス C ; 「*URA3* 遺伝子内の変異」・「遺伝子変換」・「染色体内欠失」いずれの発生頻度も野生株に対して 10 倍以上と明確に上昇していた (表 III-1)。染色体の喪失の発生頻度に関しては、5FOA 耐性 *Leu⁻ Ade⁻* の表現型を示すクローンの発生頻度をそのまま用いたが、この内、20 クローンについては PFGE と第 III 染色体に特異的なサザンブロッティングにより、実際に第 III 染色体が 1 本失われていることを確認した。

染色体喪失以外の LOH イベント、すなわちクラス B とクラス C のクローンについては、PFGE、サザンブロッティング法、PCR を用いて、更に詳細にゲノムの変化について解析した。まず、1 実験区につき、5-FOA 耐性 *Leu⁺ Ade⁻* クローン (クラス B) を 10 個体、5-FOA 耐性 *Leu⁺ Ade⁺* クローン (クラス C) を 10 個体ずつランダムにピックアップし、8 実験区分、各クラスそれぞれ計 80 クローンについて PFGE とサザンブロッティング法を用いて分類を行った (表 III-2)。クローンをピックアップする際、5-FOA-*Leu* プレートにはクラス B、C 双方のクローンが生育しているが、クラス B のクローンは *ADE2* 遺伝子を失っているため、赤いコロニーを形成することから判別することが出来る (*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)。これらのクローンについては、さらに 5-FOA-*Leu*-*Ade* プレートに生育しないことを確認した上でクラス B であると同定したが、極希に生育してしまうクローンが存在したため (80 クローン中 3 クローン)、そのようなクローンは解析から除外した。結果として解析数が 10 に満たなかった実験区に関しては、合計解析数が 10 に相当する様に、比例計算によって検出頻度を補正した (表 III-2 参照)。野生株の場合に比べ、PFGE でサイズが変化した異常な第 III 染色体が検出される割合が上昇する傾向が観られたが、それぞれのイベントの発生頻度については、以下に示した *ADE2* マーカーの解析結果を加味した後に検討することとする。

クラス C のクローンの内、上記の PFGE やサザンブロッティング法による解析で、完全長の第 III 染色体が 2 コピー認められたクローンについては、遺伝子変換か *URA3* 遺伝子マーカー内の変異のどちらかとなるが、さらに、PCR 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した (II 章 8-4 項参照)。その結果、*sgs1* 欠損株ではクラス C の 80 クローン中に *URA3* 遺伝子マーカー内の変異を持つものは 1 つも検出されなかった (発生頻度 < 8.6×

10⁻⁷)。

rad50 欠損株の解析の際に、一部の細胞集団では *ADE2* マーカーがホモ化していることが明らかとなっていた (図 III-2、Yoshida et al. 2003)。これは、*URA3* マーカーの LOH とは独立に、*ADE2* マーカーがおそらくはアレル間組換えによって相同染色体にもコピーされる現象である。これらの細胞に LOH が発生すると、本来クラス B として分類されるべき事象が 5-FOA 耐性 *Leu*⁺ *Ade*⁺ クローン (クラス C) として検出されてしまう (図 III-2)。そこで、クラス C としてピックアップした 80 クローン全てについて、*ADE2* マーカー挿入領域の構造を PCR 法により確認したところ (図 III-3)、*sgs1* 欠損株においても *ADE2* マーカーのホモ化クローンが多数認められることが分かった (表 III-3)。この点について、*rad50* 欠損株の解析例に倣い、以下のような補正をした (Yoshida et al. 2003)。正常な長さの第 III 染色体を 2 コピー保持する 40 クローンの内、*ADE2* ホモ化クローンは 34 例検出され、その頻度は 2.9×10^{-5} であった。これらのクローンでは *ADE2* マーカーがホモ化したとともに、交叉 (図 III-2a) か遺伝子変換 (図 III-2c) のいずれかが生じたものと推定されるが、それを判別することは不可能である。そこで、*ADE2* のホモ化を生じていないクローン中で、遺伝子変換と判別できるものの頻度 0.52×10^{-5} (表 III-3) と交叉の頻度 35×10^{-5} (表 III-2) の比を用いて、ホモ化したクローンを比例配分した。

他の染色体再編についても、基本的に同様の考え方で補正を行った。*MAT-HMR* 間の染色体再編に関しては、クラス B からは *MAT-HMR* 間の不等交叉は全く検出されなかったため、ホモ化したクローンのものは全てクラス C の *MAT-HMR* 間の欠失で生じたものとした。その他のサイズ変化を示す染色体再編に関しては、クラス C からは *ADE2* マーカーのホモ化を伴わないものが検出されなかったため、ホモ化したクローンのものは全てクラス B の不等交叉・転座によるものとした。正常な長さの第 III 染色体を 1 コピーのみ保持するクローンに関しては、遺伝子変換+染色体喪失 (図 III-2c') と交叉+染色体喪失 (図 III-2a') のいずれかにより生じたものと考えられるが、その判別は不可能である。しかしながら、以下の点から、これらのクローンは全て交叉に伴って染色体喪失が生じたもの (図 III-2a') と見なした。第一に、クラス C からこのような染色体喪失型の LOH クローンが見出されるのは、*ADE2* のホモ化の頻度が高い *sgs1* 欠損株と *rad50* 欠損株のみである。しかも、後述する *sgs1 rad51* 二重欠損株の解析結果から示される様に (III-5-参照)、*ADE2* マーカーのホモ化は *RAD51* 遺伝子に依存して生じており、ここで問題にしている形のクローンも全く検出されなかった。この点は、*rad50 rad51* 二重欠損株の場合も同様である (未発表データ)。これらの結果から、*sgs1* 欠損株や *rad50* 欠損株で観られるクラス C の染色体喪失型クローンは、*ADE2* マーカーのホモ化の影響を強く受けて生じている、つまり *ADE2* マーカーのホモ化に依存してクラス C に分類されてしまう現象 (交叉+染色体喪失) と判断するのが妥当であると考えた。以上の解析結果に基づいてそれぞれの LOH イベントの割合を決定し、

クラス B もしくはクラス C の発生頻度に乗じることで、それぞれの LOH イベントについての最終的な発生頻度を算出した。

sgs1 欠損株における LOH イベント毎の頻度を表 III-4 にまとめて示し、さらに、図 III-4 には、これらの頻度の野生株に対する増減を示した。*sgs1* 欠損株では、LOH 全体の発生頻度が野生株の 14 倍に上昇し、各種染色体異常の発生頻度が LOH に占める割合は野生株とほぼ同程度であった。つまり、*sgs1* 欠損株での LOH 発生の分布パターンは、野生株の分布パターンをそのまま 14 倍に引き延ばしたような形を示した。しかしながら、この 14 倍の上昇を基準とすると、交叉、遺伝子変換、*MAT-HMR* 間欠失の上昇の程度は低く、一方、転座・不等交叉の上昇は高い傾向が観られた (表 III-4)。交叉や遺伝子変換は姉妹染色分体間の組換えに次いで正確な組換えと言える。*MAT-HMR* 間の欠失は、おそらくは同一染色体上における交叉型の組換え、あるいは、姉妹染色分体間での不等交叉によるものではないかと考えられるが、他の染色体や相同染色体との異所性組換え、つまり転座や不等交叉よりは正確な相同組換えと見なせるのかもしれない。以上まとめると、まず、*sgs1* 欠損により点突然変異を除く染色体異常・再編全般の発生頻度が、野生株と同様の分布を保ちながら大きく上昇したことについては、*sgs1* 欠損下では組換え修復を必要とする様な DNA 傷害が増大しており、その結果、組換え修復のエラーが上昇したためであると解釈できる。この結果は、先に述べた「退行フォークの巻き戻しモデル」(I 章 5 項、図 I-6) とも一致している。また、*sgs1* 欠損により染色体喪失や異所性の組換えを生じる様な相同組換えにより大きな上昇が見られたことから、*SGS1* はこれらの「不正確な組換え」の抑制にも寄与していることが示唆された (Ajima et al. 2002)。

表III-1 *sgs1*単独欠損株におけるLOHのクラス分類

クラス ²⁾	表現型	頻度±標準偏差 × 10 ⁻⁵ (fold ×) ³⁾ [%] ⁴⁾	
		野生株 ¹⁾	<i>sgs1</i>
A	5-FOA耐性Leu ⁻	5.5 ± 2.7 (1) [47]	94 ± 34 (17) [57]
B	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁻	6.0 ± 0.3 (1) [50]	64 ± 17 (11) [39]
C	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁺	0.33 ± 0.055 (1) [2.8]	6.9 ± 1.5 (21) [4.2]
	合計	12 (1) [100]	170 (14) [100]

1) 野生株 (RD301) のデータは当研究室中磯らの研究によるものである (未発表)。

2) 5-FOA耐性クローンの表現型によるクラス分類は図III-1に示している。

3) () 内の数値は、野生株に対する頻度比を示している。

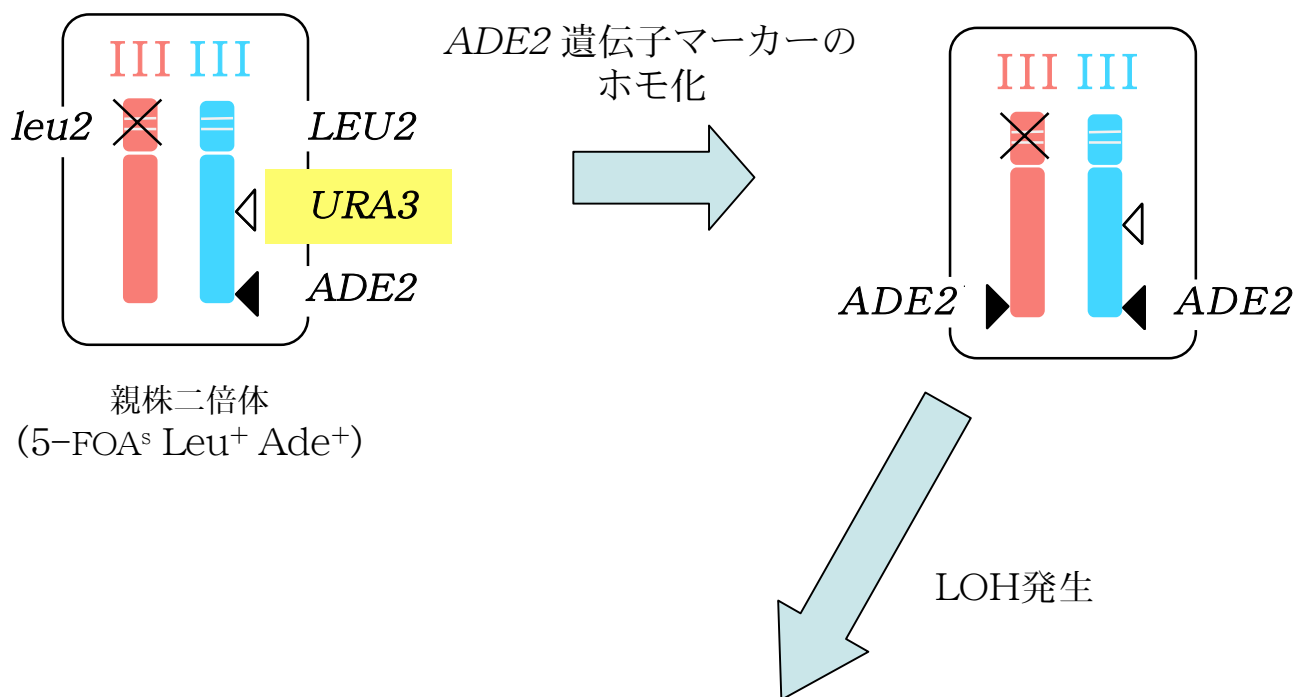
4) []内の数値は、各株毎のLOH頻度の総計における割合を示している。

表III-2 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
sgs1欠損株のLOHクローンの分類

頻度 (検出クローン数 / 解析クローン数) × 10 ⁻⁵							
株	表現型	クラス	頻度 (× 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 ³⁾	1:1 (MAT-HMRΔ ⁴⁾)	1:1 (non MAT-HMRΔ ⁵⁾)	1:0
野生株 ¹⁾	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁻	B	6.0	4.4 (104/140=0.74)	<0.035 (0/140<0.0071)	1.0 (24/140=0.17)	0.052 (12/140=0.086)
	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁺	C	0.33	0.093 (48/170=0.28)	0.23 (119/170=0.70)	0.0019 (1/170=0.0059)	<0.0019 (0/170<0.0059)
sgs1	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁻	B	64	35 (43.5/79.7=0.54)	<0.83 (0/79.7<0.013)	23 (26.8/79.7=0.34)	7.7 (9.4/79.7=0.12)
	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁺	C	6.9	3.5 (40/80=0.50)	0.90 (10/80=0.13)	1.7 (19/80=0.24)	0.97 (11/80=0.14)

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クローンの分類を行った。解析に供したクローンは、sgs1では1実験区につき10クローンを8の独立した実験区からランダムにピックアップした。ピックアップ数が10に満たなかった実験区に関しては、合計が10となるよう比例計算して補正を行った。

- 1) 野生株 (RD301) のデータは当研究室中磯らの研究によるものである (未発表)。
- 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とサザンブロットニング法により解析した。
- 3) 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 (II-8-5参照)。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野生株 ; 170クローン中2クローン、sgs1欠損株 ; 未検出。これらのイベントの頻度は表III-7にまとめた。
- 4) MAT-HMR 間の欠失はPCR法により検出した (II-8-7参照)。
- 5) MAT-HMR 間の欠失以外の異常染色体のことを示す。



		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 染色体内欠失</p>

図III-2 ADE2 遺伝子マーカーのホモ化を伴ったLOHイベントの分類

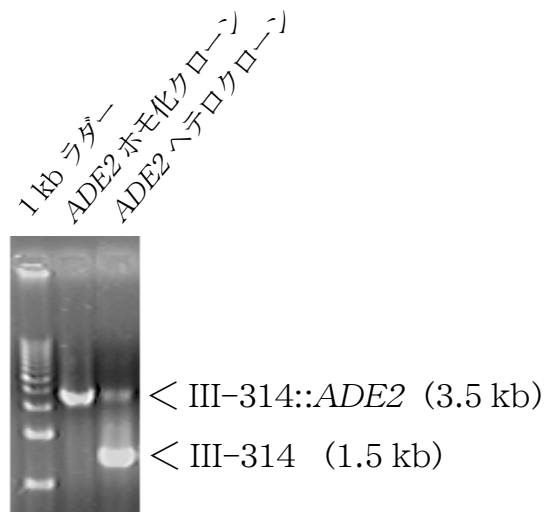
LOHが発生する前の段階でADE2 遺伝子マーカーのホモ化が生じた場合、5-FOA^r Leu⁺ Ade⁺の表現型を示すクローンには本来クラスBで検出されるLOHイベント；交叉や転座・不等交叉を生じたものが含まれる場合がある。

表III-3 *ADE2* 遺伝子マーカー挿入領域の構造に基づいた
*sgs1*欠損株の5-FOA耐性Leu⁺Ade⁺クローンの分類

株	<i>ADE2</i> 遺伝子マーカー 挿入の有無 (遺伝子型) ²⁾	頻度 × 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 ⁴⁾	1:1 (<i>MAT-HMRΔ</i>)	1:1 (non <i>MAT-HMRΔ</i>)
野生株 ¹⁾	+ (<i>ADE2</i> / <i>ADE2</i> or <i>ADE2</i> /0)	0.0079 (4)	<0.0019 (ND)	0.0019 (1)
	+/- (<i>ADE2</i> / III-314)	0.086 (44)	0.23 (119)	<0.019 (ND)
	合計	0.094 (48)	0.23 (119)	0.0019 (1)
<i>sgs1</i>	+ (<i>ADE2</i> / <i>ADE2</i> or <i>ADE2</i> /0)	2.9 (34)	0.52 (6)	1.6 (19)
	+/- (<i>ADE2</i> / III-314)	0.52 (6)	0.35 (4)	<0.078 (ND)
	合計	3.4 (40)	0.87 (10)	1.6 (19)

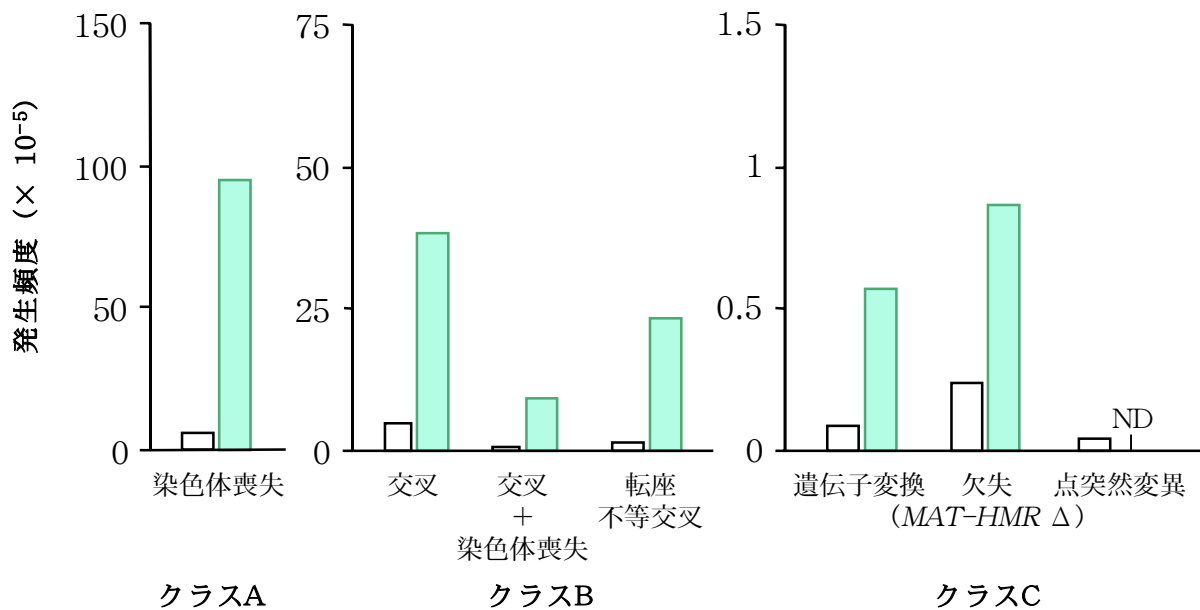
NDは未検出であることを示している。

- 1) 野生株 (RD301) のデータは当研究室中磯らの研究によるものである (未発表)。
- 2) *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-3)。
- 3) この分類は、表III-2と同様のものである。
- 4) 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をPCR解析により確認したものである。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-3 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。



図III-4 *sgs1*単独欠損がLOHイベントに及ぼす影響

□は野生株を、■は*sgs1*欠損株を示している。NDは未検出を示す。

表III-4 *sgs1*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 × 10 ⁻⁵ (fold ×) ²⁾ [%] ³⁾	
	野生株 ¹⁾	<i>sgs1</i>
クラスA		
染色体喪失	5.5 (1) [47]	94 (17) [57]
クラスB⁴⁾		
交叉	4.4 (1) [37]	38 (8.6) [23]
交叉+染色体喪失	0.52 (1) [4.4]	8.8 (17) [5.3]
不等交叉・転座	1.0 (1) [8.5]	23 (23) [14]
クラスC⁴⁾		
遺伝子変換	0.086 (1) [0.73]	0.56 (6.5) [0.34]
染色体内欠失		
<i>MAT-HMR</i> Δ	0.23 (1) [2.0]	0.86 (3.7) [0.52]
それ以外の欠失	<0.0019 (-) [-]	<0.086 (-) [-]
<i>URA3</i> 内変異	0.0040 (1) [0.034]	<0.086 (-) [-]
合計	12 (1) [100]	170 (14) [100]

1) 野生株二倍体 (RD301) のデータは当研究室中磯らの研究によるものである (未発表)。

2) () 内の数値は、野生株に対する頻度の比を示している。

3) [] 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。

4) 各株の頻度に関しては、表III-3に示した*ADE2* 遺伝子マーカーのホモ化を考慮して補正を行った (詳細は本文中)。

III-3 SGS1 と組換え修復の二重欠損株は組換え修復単独欠損株と同じ LOH 発生パターンを示す

I 章 5 項で詳しく述べた様に、*SGS1* が組換え修復と何らかの機能的な関係を持つことを示唆する知見が、最近相次いで報告された (Gangloff et al. 2000 ; Onoda et al. 2001)。ただし、これらの研究では、細胞の薬剤の感受性や増殖の程度から *SGS1* と組換え修復の関係を見ているのみであるため、これらの遺伝子がどの様に関わってゲノムの維持に機能しているのかについては明らかになっていない。そこで、この点についてゲノムの変化に対する影響からアプローチすることを目的に、*SGS1* と組換え修復の中心となる遺伝子である *RAD52*、*RAD51* それぞれについて二重欠損株を作製し (表 II-1)、二倍体ホモ欠損株での LOH 解析を行った。

それぞれの株について、表現型によるクラス分類を行った結果を表 III-5 にまとめ、図 III-5 にはクラス毎の LOH 発生頻度をグラフで示した。*RAD52* は出芽酵母の相同組換え経路において、最も機能する経路の範囲が広い遺伝子である。この遺伝子の欠損株では、組換え修復がほぼ完全に損なわれていることを反映し、クラス B の染色体間組換えの発生頻度が 0.44×10^{-5} と、野生株の 6.0×10^{-5} と比べて 1/14 程度にまで減少する。クラス C に関しては、その発生頻度が *rad52* 欠損株と野生株とで共に 0.33×10^{-5} と同等の値を示すものの、野生株はそのほぼ全てを染色体内欠失や遺伝子変換による染色体再編が占めているのに対し、*rad52* 欠損株ではその 1/3 程度をこれらの染色体再編が占めているにすぎず、残りは全て点突然変異である (Yoshida et al. 2003)。また、クラス A の染色体喪失の発生頻度は、野生株の 5.5×10^{-5} に対して 360×10^{-5} と約 50 倍の大きな上昇を示しており、これは相同組換え欠損株に共通して見られる特徴である。このことは、野生株が通常の増殖を行っている状態において、組換え修復の大半を占めると考えられる正確な相同組換え、つまり姉妹染色分体間の組換えが行えなくなった結果、上手く修復されなかった DNA 傷害から染色体の崩壊が引き起こされているものと考えられる。このように、*rad52* 欠損株は野生株よりも染色体喪失の発生頻度が大きく上昇し、染色体間の組換え頻度が大きく減少する LOH 発生パターンを示す。一方、*sgs1* 単独欠損株の場合には、III 章 2 項で示したように、染色体異常・再編全般の発生頻度が大きく上昇したことが特徴であった。これら 2 つの欠損を合わせて *sgs1 rad52* 二重欠損にすると、*sgs1* 単独欠損株に比べて、クラス B (染色体間組換え) およびクラス C (遺伝子変換、染色体内欠失、点突然変異) とともに発生頻度が劇的に減少し、*rad52* 単独欠損株と同程度の値を示した (表 III-5、図 III-5A)。クラス A (染色体喪失) の頻度は *sgs1* 単独欠損株よりも上昇し、こちらの場合も *rad52* 単独欠損株と同程度の頻度を示した。つまり、*sgs1* 欠損によって誘発される染色体再編は、ほぼ全てが *RAD52* に依存した相同組換えによるものであることが分かった。

RAD51 の遺伝子産物は組換えの鎖交換反応を担うことが知られており、相同組

換えにおいて中心的な役割を果たす遺伝子である。この遺伝子の欠損株では、正確な組換え反応を行う機能、および、相同性の低い配列間の組換え反応を中止する機能の2つが損なわれることにより、特徴的な LOH の発生パターンを示す (Yoshida et al. 2003)。*rad51* 欠損株ではクラス B の染色体間組換えは 7.9×10^{-5} と野生株と同程度の値を示すが、その内訳は野生株とは大きく異なっており、その大半を転座・不等交叉が占めている (図 III-6、表 III-8)。クラス C に関しても、発生頻度は 3.1×10^{-5} と野生株の 10 倍程度に上昇しているが、その大半は染色体内欠失によるものである。つまり、欠損株で上昇している染色体再編は、全て、異所性の組換えによるものである。また、点突然変異の発生頻度が野生株の約 50 倍に上昇していることや、クラス A の染色体喪失の発生頻度が 210×10^{-5} と野生株に対して大きな上昇を示すことは、*rad52* 欠損の場合と共通して見られる特徴である。自然 DNA 傷害の修復プロセスにおいて、後者は姉妹染色分体間の組換えが行えなくなった結果であり、また、前者は複製後修復によって組換え修復が代替された結果であると考えられる (Yoshida et al. 2003; 吉田純平 博士論文 2003)。*rad51* 欠損による染色体喪失は *rad52* 欠損の場合程には発生頻度が上昇しないが、このことは *rad51* 欠損下でも *RAD52* 依存的なある種の相同組換え活性が残存しているためであると考えられる。*sgs1 rad51* 二重欠損株の場合には (表 III-5、図 III-5B)、クラス B (染色体間組換え) の発生頻度が *sgs1* 単独欠損株に比べて大きく減少し、*rad51* 単独欠損株と同程度の頻度を示した。クラス A (染色体喪失) の発生頻度は *sgs1* 単独欠損株に比べて上昇し、やはり *rad51* 単独欠損株の場合と同程度の値であった。クラス C (遺伝子変換・染色体内欠失・点突然変異) の発生頻度に関しても *rad51* 欠損を加えることで大きく減少し、*rad51* 単独欠損株と同程度かやや低い値を示した。

先に述べたように、*rad51* 単独欠損株でのクラス B やクラス C のクローンでは、さらに内容を分類することで、異所性の組換えや点突然変異の発生頻度が上昇するといった特徴的な LOH 発生パターンが観られる。そこで、*sgs1 rad51* 二重欠損株についてより詳細に LOH イベントを解析し、その発生パターンを *rad51* 単独欠損株と比較検討することとした。*sgs1 rad51* 二重欠損株で得られたクラス B およびクラス C のクローンそれぞれについて、各実験区から 10 クローンずつ、8 実験区から計 80 クローンをピックアップし、PFGE やサザンブロッティング法、次いで PCR を用いて LOH イベントの分類を行った (表 III-6)。なお、*sgs1* 単独欠損株において *ADE2* マーカーのホモ化が観られたことを考慮して、*sgs1 rad51* 二重欠損株についても *ADE2* マーカーのホモ化についての検討を行った (表 III-7)。実際には、*sgs1 rad51* 二重欠損株から得られたクラス C クローンの 80 例の内、*ADE2* マーカーのホモ化を生じているクローンは一例のみであった。*sgs1* 単独欠損株では *ADE2* マーカーのホモ化を生じたものがクラス C クローン中に数多く認められたが (表 III-3 6.9×10^{-5} 中の 6.4×10^{-5})、これらは *rad51* 欠損を加えることで劇的に減少していた (表 III-7 1.6×10^{-5} 中の 0.02×10^{-5})。 *ADE2* マーカ

一のホモ化も *URA3* マーカーのアリル間組換えによる LOH と同様、*RAD51* に大きく依存していることが分かる。*sgs1 rad51* 二重欠損株のクラス C クローンには染色体を 1 本しかも持たないものは (図 III-1)、*rad51* 単独欠損株の場合と同様、全く検出されなかった。この結果に基づいて、*sgs1* 単独欠損株で見られたクラス C の染色体喪失例は、全て *ADE2* マーカーのホモ化を伴う形で「交叉」による染色体喪失が生じたものであると判断したことは、III-2 項で述べた通りである。

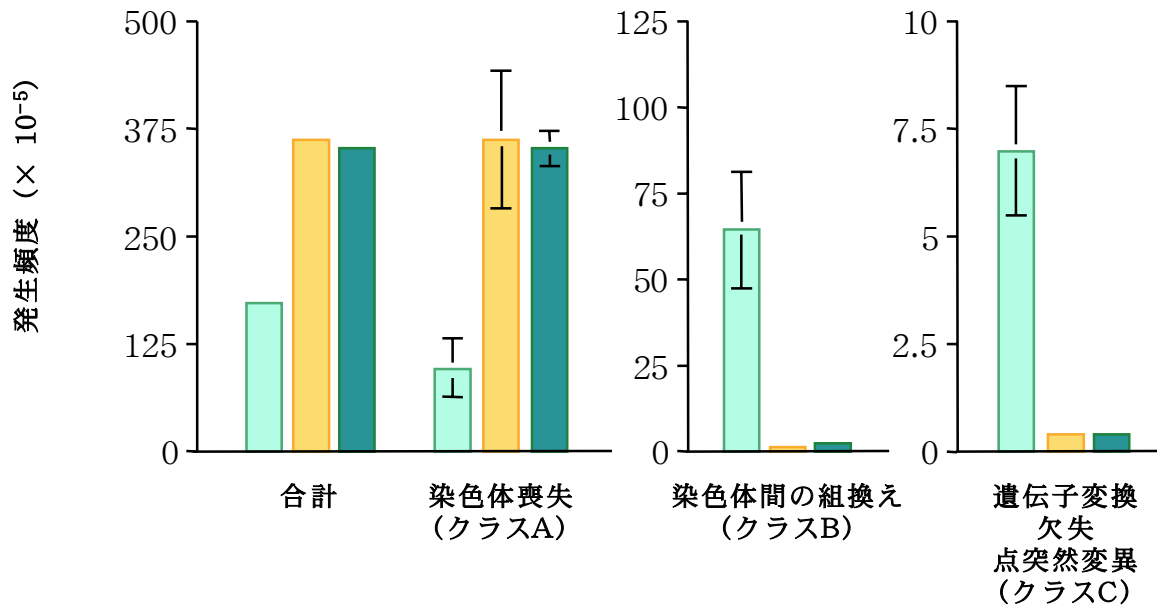
以上の解析結果をまとめて表 III-8 に示し、図 III-6 には各々の LOH イベント頻度をグラフにして示した。*sgs1* 単独欠損により誘発されていたクラス B の交叉や交叉+染色体喪失、転座・不等交叉の発生頻度はいずれも *sgs1 rad51* 二重欠損株では大きく減少し、*rad51* 単独欠損株と同様の発生パターンを示した。クラス C で生じる LOH イベントについても、*sgs1 rad51* 二重欠損株は基本的に *rad51* 単独欠損株と同様のパターンを示していることが分かる。*sgs1* 単独欠損によって遺伝子変換と *MAT-HMR* 間の欠失が野生型の数倍に誘発されるが、*rad51* 欠損と二重にすることで、遺伝子変換の頻度が劇的に減少し、一方、*MAT-HMR* 間やそれ以外の染色体内欠失、および、点突然変異の発生頻度が上昇した。*sgs1 rad51* 二重欠損株で上昇するこれらの LOH イベントの発生頻度は *rad51* 単独欠損株の場合と比較して若干低く見える。しかし、クラス C クローン 80 例中に占めるそれぞれの LOH イベントの割合は 2 つの株の間で極めて類似していることから (表 III-6、表 III-7)、*sgs1 rad51* 二重欠損株での LOH の発生パターンは *rad51* 単独欠損株の場合と良く似ていると考えた。

以上まとめると、*sgs1 rad52* 二重欠損株と *sgs1 rad51* 二重欠損株の両方の場合において、染色体再編がそれぞれ *rad52* もしくは *rad51* 単独欠損株と同程度にまで減少したことより、*sgs1* 欠損下で生じる染色体再編は組換え修復に依存して発生していることが示された。また、染色体喪失の発生頻度はいずれの二重欠損株の場合も、それぞれ *rad52* もしくは *rad51* 単独欠損株と同程度にまで上昇した。以上の変化も含め、どちらの二重欠損株においても、全てのクラスの LOH イベントの発生頻度が、それぞれ *rad52* もしくは *rad51* 単独欠損株の場合と同程度であった。以上のことから、*SGS1* は LOH の発生に関して、*RAD51* および *RAD52* のエピスタシス・グループに属しており、遺伝学的に組換え修復経路の下で機能していることが示された。

表III-5 組換え修復欠損と*sgs1*との二重欠損株におけるLOHのクラス分類

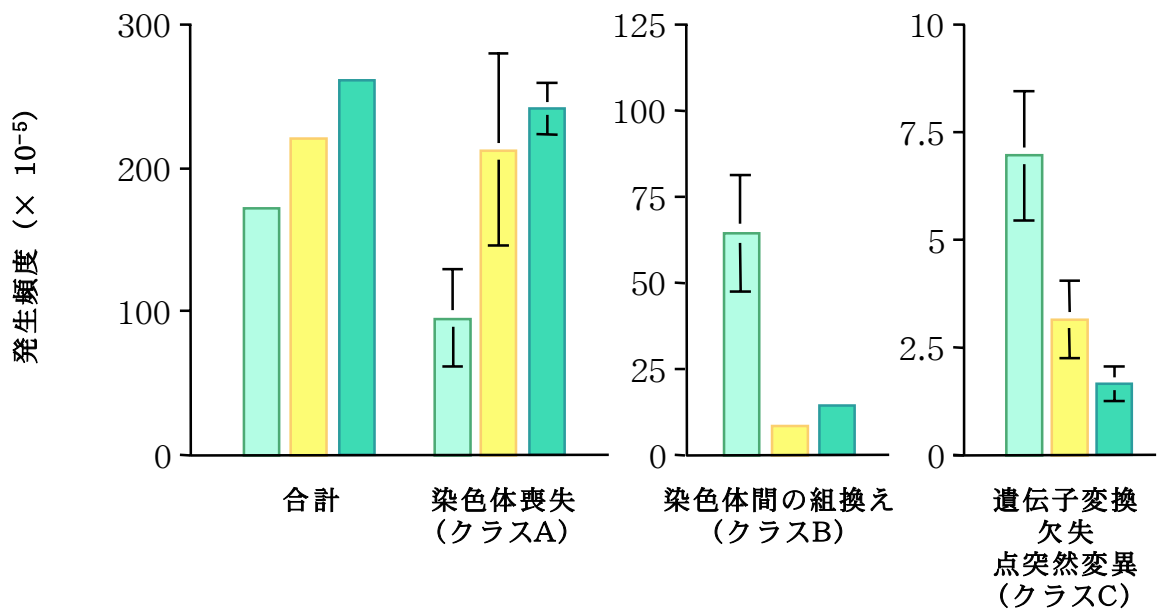
クラス ²⁾	表現型	頻度±標準偏差 × 10 ⁻⁵ (fold ×) ³⁾ [%] ⁴⁾				
		<i>sgs1</i>	<i>rad51</i> ¹⁾	<i>sgs1 rad51</i>	<i>rad52</i> ¹⁾	<i>sgs1 rad52</i>
A	5-FOA耐性 Leu ⁻	94 ± 34 (17) [57]	210 ± 67 (38) [95]	240 ± 18 (44) [94]	360 ± 79 (66) [99.8]	350 ± 21 (64) [99.4]
B	5-FOA耐性 Leu ⁺ Ade ⁻	64 ± 17 (11) [39]	7.9 ± 1.6 (1.3) [3.5]	14 ± 1.4 (2.3) [5.5]	0.44 ± 0.15 (0.073) [0.12]	1.7 ± 0.34 (0.28) [0.48]
C	5-FOA耐性 Leu ⁺ Ade ⁺	6.9 ± 1.5 (21) [4.2]	3.1 ± 0.89 (9.4) [1.4]	1.6 ± 0.41 (4.8) [0.62]	0.33 ± 0.11 (1.0) [0.091]	0.36 ± 0.075 (1.1) [3.1]
	合計	170 (14) [100]	220 (18) [100]	260 (22) [100]	360 (30) [100]	350 (29) [100]

- 1) *rad51* (RD305)、および*rad52* (RD308) のデータはYoshida et al. (2003) によるものである。
- 2) 5-FOA耐性クロンの表現型によるクラス分類は図III-1に示している。
- 3) ()内の数値は、野生株に対する頻度の比を示している。
- 4) []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。



図III-5A *sgs1 rad52* 二重欠損がLOHイベントに及ぼす影響

■は*sgs1*単独欠損株を、■は*rad52*単独欠損株を、■は*sgs1 rad52*二重欠損株を示す



図III-5B *sgs1 rad51*二重欠損がLOHイベントに及ぼす影響

■は*sgs1*単独欠損株を、■は*rad51*単独欠損株を、■は*sgs1 rad51*二重欠損株を示す

図III-5 組換え修復欠損と*sgs1*との二重欠損が各LOHイベントに及ぼす影響

表III-6 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
*sgs1 rad51*二重欠損株の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)	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 ⁴⁾)	1:1 (non <i>MAT-HMR</i> Δ ⁵⁾)	1:0
<i>rad51</i> ¹⁾	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁻	B	8.1	0.65 (4/50=0.08)	<0.16 (0/50<0.02)	7.3 (45/50=0.90)	0.16 (1/50=0.02)
	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁺	C	3.1	0.19 (3/50=0.060)	2.8 (46/50=0.92)	0.062 (1/50=0.020)	<0.062 (0/50<0.02)
<i>sgs1 rad51</i>	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁻	B	14	1.8 (10/80=0.13)	<0.18 (0/80<0.013)	11 (62/80=0.78)	1.4 (8/80=0.10)
	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁺	C	1.6	0.048 (5/80=0.063)	1.5 (73/80=0.91)	0.04 (2/80=0.025)	<0.021 (0/80<0.013)

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、1実験区につき10クローンを*sgs1 rad51*では8の独立した実験区からランダムにピックアップした。

1) *rad51* (RD305) のデータはYoshida et al. (2003) によるものである。

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とサザンブロットィング法により解析した。

3) 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 (II-8-5参照)。*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*rad51* ; 3クローン全て、*sgs1 rad51* ; 4クローン。これらのイベントの頻度は表III-8にまとめた。

4) *MAT-HMR* 間の欠失はPCR法により検出した (II-8-7参照)。

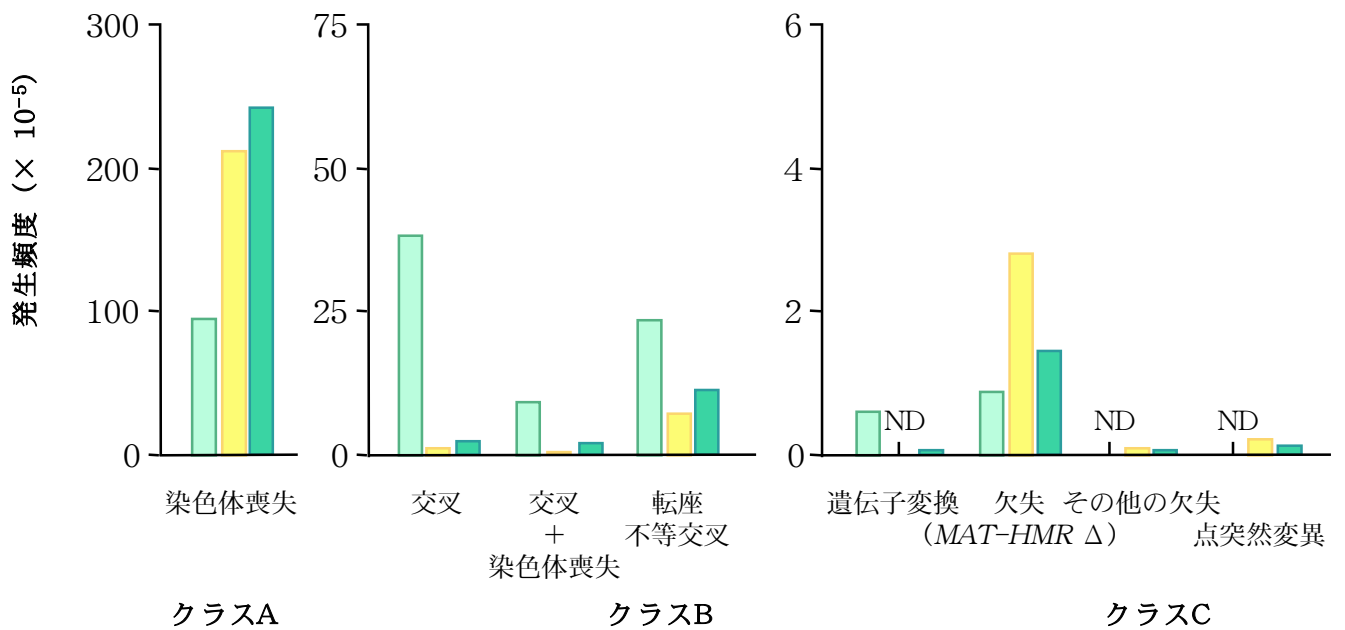
5) *MAT-HMR* 間の欠失以外の異常染色体のことを示す。

表III-7 *ADE2* 遺伝子マーカー挿入領域の構造に基づいた *sgs1 rad51* 二重欠損株の5-FOA耐性Leu⁺Ade⁺クローンの分類

株	<i>ADE2</i> 遺伝子マーカー挿入の有無 (遺伝子型) ²⁾	頻度 × 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 ⁴⁾	1:1 (<i>MAT-HMR</i> Δ)	1:1 (non <i>MAT-HMR</i> Δ)
<i>rad51</i> ¹⁾	+ (<i>ADE2</i> / <i>ADE2</i> or <i>ADE2</i> /0)	<0.08 (ND)	<0.08 (ND)	<0.08 (ND)
	+/- (<i>ADE2</i> / III-314)	<0.08 (ND)	3.7 (46)	0.08 (1)
	合計	<0.08 (ND)	3.7 (46)	0.08 (1)
<i>sgs1 rad51</i>	+ (<i>ADE2</i> / <i>ADE2</i> or <i>ADE2</i> /0)	<0.021 (ND)	0.021 (1)	<0.021 (ND)
	+/- (<i>ADE2</i> / III-314)	0.021 (1)	1.4 (72)	0.04 (2)
	合計	0.021 (1)	1.4 (73)	0.04 (2)

NDは未検出であることを示している。

- 1) *rad51* (RD305) のデータはYoshida et al. (2003) によるものである。
- 2) *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-3)。
- 3) この分類は、表III-6と同様のものである。
- 4) このクローンは*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、遺伝子変換が生じているものと考えられる。



図III-6 *sgs1 rad51* 二重欠損がLOHイベントに及ぼす影響

■は*sgs1* 単独欠損株、■は*rad51* 単独欠損株、■は*sgs1 rad51* 二重欠損株を示す。NDは未検出を示す。

表III-8 *sgs1 rad51* 二重欠損株に生じた各LOHイベントのまとめ

LOHイベント	頻度 × 10 ⁻⁵ (fold ×) ¹⁾ [%] ²⁾		
	<i>sgs1</i>	<i>rad51</i> ³⁾	<i>sgs1 rad51</i>
クラスA			
染色体喪失	94 (17) [57]	210 (38) [95]	240 (44) [94]
クラスB⁴⁾			
交叉	38 (8.6) [23]	0.63 (0.14) [0.29]	1.8 (0.41) [0.70]
交叉+染色体喪失	8.8 (17) [5.3]	0.16 (0.31) [0.072]	1.4 (2.7) [0.55]
不等交叉・転座	23 (23) [14]	7.1 (7.1) [3.2]	11 (11) [4.3]
クラスC⁴⁾			
遺伝子変換	0.56 (6.5) [0.34]	<0.062 (-) [-]	0.021 (0.021) [0.0082]
染色体内欠失			
<i>MAT-HMR</i> Δ	0.86 (3.7) [0.52]	2.8 (12) [1.3]	1.4 (6.1) [0.55]
それ以外の欠失	<0.075 (-) [-]	0.062 (>33) [0.028]	0.04 (>21) [0.016]
<i>URA3</i> 内変異	<0.075 (-) [-]	0.19 (48) [0.086]	0.08 (20) [0.031]
合計	170 (14) [100]	220 (18) [100]	260 (22) [100]

1) ()内の数値は、野生株に対する頻度の比を示している。

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) *rad51* (RD305) のデータはYoshida et al. (2003) によるものである。

4) 各株の頻度に関しては、表III-7に示した*ADE2* 遺伝子マーカーのホモ化を考慮して補正を行った。

III-4 SGS1 と DSE の組換え修復遺伝子 RAD50 との二重欠損株では各種染色体異常の発生頻度が相乗的に上昇する

DNA 二重鎖末端 (DSE) の組換え修復には、*RAD50* 遺伝子が機能していることが知られている (I 章 4-2 項 参照)。「退行フォークの巻き戻しモデル」(図 I-8) で想定されている様に、*sgs1* 欠損下ではチキンフット構造が DSE にプロセスされ、これが組換え修復によって修復されているのであれば、*SGS1* と *RAD50* との間に機能的な関係が見出されることが予想される。そこで、自然 DNA 傷害の修復プロセスにおけるこれら 2 つの遺伝子間の相互作用について、ゲノムの変化を通して解析するために、*sgs1 rad50* 二重欠損株を作製し(表 II-1)、二倍体ホモ欠損株での LOH 解析を行った。*RAD50* は DNA 末端のプロセッシングや姉妹染色分体間の保持に機能することで、*RAD51* や *RAD52* による相同組換え反応が姉妹染色分体間で行われる様に作用していると考えられている。そのため、*rad50* 欠損株では、染色体喪失の発生頻度は *rad51* や *rad52* の欠損株と同様、非常に大きく上昇するが、一方、染色体再編については、*rad51* や *rad52* の欠損株とは異なり、アリル間組換えか異所性組換えかに関わらず、全体の発生頻度が 10 倍程度に上昇する (表 III-11、図 III-7)。これは相同組換えの中でも特に姉妹染色分体間の組換えが行われ難くなり、代わりに他の染色体をドナー配列として用いて相同組換えを行ってしまったためであると考えられる (Yoshida et al. 2003)。

sgs1 rad50 二重欠損株で生じる LOH について、表現型によるクラス分類を行った結果を表 III-9 にまとめた。表には *sgs1* 単独欠損株と *rad50* 単独欠損株で見られるそれぞれのクラスの発生頻度と共に、これらを加算した値を対照として示している。*sgs1 rad50* 二重欠損株では、A、B、C いずれのクラスの発生頻度も、それぞれの単独欠損株での頻度を加算した値よりかなり高く、単独欠損に対して相乗的な上昇が見られた。*sgs1 rad50* 二重欠損株で得られたクラス B およびクラス C のクローンそれぞれについて、各実験区から 10 クローンずつ、6 実験区から計 60 クローンをピックアップし、PFGE やサザンブロットィング法、次いで PCR を用いて LOH イベントの分類を行った(表 III-10)。なお、この解析の過程において *sgs1 rad50* 二重欠損株では、それぞれの単独欠損株の場合と同様、高い頻度で *ADE2* マーカーのホモ化が認められた (表 III-11)。*ADE2* マーカーのホモ化による影響については、他の株の場合と同様の方法で補正を行った。

以上の解析結果をまとめたものを表 III-12 に示し、また、図 III-7 には各々の LOH イベントの発生頻度をグラフで示した。グラフには *sgs1* 単独欠損株と *rad50* 欠損株で見られるそれぞれの LOH イベントの発生頻度と共に、これらを加算した値を対照として示している (図 III-7、点線)。*sgs1 rad50* 二重欠損株では、それぞれの単独欠損株の場合と同様、点突然変異は全く検出されなかったのに対して、それ以外の全ての LOH イベントである染色体異常・再編の発生頻度は、それぞれの単独欠損株の頻度を合計した値を大きく上回って上昇していた。これらの発生頻度に

対する相乗的な効果について、その程度を LOH イベント毎に比較すると、*MAT-HMR* 間の染色体内欠失の上昇の程度が他の LOH イベントに比べてやや高いものの、*sgs1 rad50* 二重欠損によって特に特定のイベントのみが顕著に誘発、あるいは抑制されている訳ではない。結果として *sgs1 rad50* 二重欠損株での各々の LOH イベントに対する割合 (LOH の発生パターン) は、基本的に *RAD50* の単独欠損株と同様であった。以上の結果より、ゲノムの維持に関わるプロセスにおいて、*RAD50* と *SGS1* との間には部分的に代替できる関係があり、一方の欠損を他方の機能によって部分的に補うことができることが示された。この関係には、2つの因子が同じ作用点で互いにオーバーラップした機能を持っており、相互に欠損を補いつ合っている場合と、それぞれが連続して作用しており、上流側の機能の欠損を下流側の機能によって補っている場合の2通りが考えられる。「退行フォークの巻き戻しモデル」(図 I-8) の場合は後者の例 (この場合は *sgs1* 欠損の *RAD50* による補完) として説明できるが、これらの点については他の欠損株の結果も含めて V 章の考察で詳しく検討する。

表III-9 *sgs1 rad50* 二重欠損株におけるLOHのクラス分類

クラス ²⁾	表現型	頻度±標準偏差 × 10 ⁻⁵ (fold ×) ³⁾ [%] ⁴⁾			
		A ; <i>sgs1</i>	B ; <i>rad50</i> ¹⁾	C ; <i>sgs1 rad50</i>	AとBを加算したもの
A	5-FOA耐性 Leu ⁻	94 ± 34 (17) [57]	290 ± 10 (24) [79]	640 ± 51 (120) [70]	380 (69) [72]
B	5-FOA耐性 Leu ⁺ Ade ⁻	64 ± 17 (11) [39]	71 ± 1.6 (12) [19]	260 ± 25 (43) [28]	140 (23) [25]
C	5-FOA耐性 Leu ⁺ Ade ⁺	6.9 ± 1.5 (21) [4.2]	5.4 ± 3.1 (16) [1.5]	15 ± 8.0 (45) [1.6]	12 (36) [2.3]
	合計	170 (14) [100]	370 (31) [100]	920 (77) [100]	530 (44) [100]

- 1) *rad50* (RD311) のデータはYoshida et al. (2003) によるものである。
- 2) 5-FOA耐性クローンの表現型によるクラス分類は図III-1に示している。
- 3) ()内の数値は、野生株に対する頻度の比を示している。
- 4) []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。

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
sgs1 rad50 二重欠損株のLOHクローンの分類

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 ³⁾	1:1 (<i>MAT-HMR</i> Δ ⁴⁾)	1:1 (non <i>MAT-HMR</i> Δ ⁵⁾)	1:0
<i>rad50</i> ¹⁾	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁻	B	71	44 (31/50=0.62)	1.4 (1/50=0.02)	17 (12/50=0.24)	8.5 (6/50=0.12)
	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁺	C	5.4	3.2 (30/50=0.30)	0.76 (7/50=0.14)	1.1 (10/50=0.20)	0.32 (3/50=0.060)
<i>sgs1 rad50</i>	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁻	B	260	150 (29/50=0.58)	<5.2 (0/50<0.02)	73 (14/50=0.28)	36 (7/50=0.14)
	5-FOA耐性Leu ⁺ Ade ⁺	C	15	5.1 (17/50=0.34)	6.3 (21/50=0.42)	2.1 (7/50=0.14)	1.5 (5/50=0.10)

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クローンの分類を行った。解析に供したクローンは、*sgs1 rad50*では1実験区につき10クローンを5の独立した実験区からランダムにピックアップした。

1) *rad50* (RD306) のデータはYoshida et al. (2003) によるものである。

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) 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 (II-8-5参照)。*URA3* 遺伝子マーカー内の変異として分類されたクローンは*rad50*; 未検出、*rad50 sgs1*欠損株; 未検出。これらのイベントの頻度は表III-11にまとめた。

4) *MAT-HMR* 間の欠失はPCR法により検出した (II-8-7参照)。

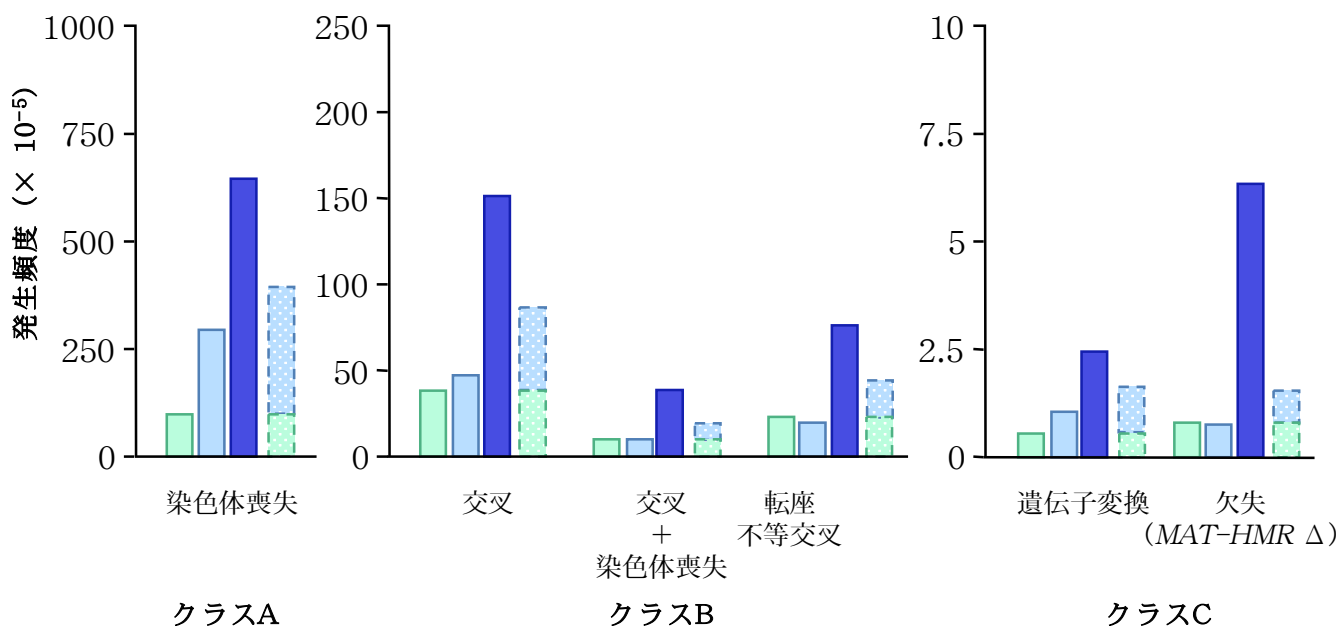
5) *MAT-HMR* 間の欠失以外の異常染色体のことを示す。

表III-11 *ADE2* 遺伝子マーカー挿入領域の構造に基づいた
*sgs1 rad50*二重欠損株の5-FOA耐性Leu⁺Ade⁺クローンの分類

株	<i>ADE2</i> 遺伝子マーカー 挿入の有無 (遺伝子型) ²⁾	頻度 × 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 ⁴⁾	1:1 (<i>MAT-HMR</i> Δ)	1:1 (non <i>MAT-HMR</i> Δ)
<i>rad50</i> ¹⁾	+ (<i>ADE2</i> / <i>ADE2</i> or <i>ADE2</i> /0)	2.3 (21)	0.11 (1)	1.1 (10)
	+/- (<i>ADE2</i> / III-314)	0.97 (9)	0.65 (6)	<0.11 (ND)
	合計	3.3 (30)	0.23 (7)	1.1 (1)
<i>sgs1 rad50</i>	+ (<i>ADE2</i> / <i>ADE2</i> or <i>ADE2</i> /0)	2.7 (9)	0.9 (3)	2.1 (5)
	+/- (<i>ADE2</i> / III-314)	2.4 (8)	5.4 (18)	<0.3 (ND)
	合計	5.1 (17)	6.3 (21)	2.1 (5)

NDは未検出であることを示している。

- 1) *rad50* (RD306) のデータはYoshida et al. (2003) によるものである。
- 2) *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-3)。
- 3) この分類は、表III-10と同様のものである。
- 4) 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をPCR解析により確認している。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-7 *sgs1 rad50* 二重欠損がLOHイベントに及ぼす影響

■は*sgs1* 単独欠損株、■は*rad50* 単独欠損株、■は*sgs1 rad50* 二重欠損株を示す。また、二重欠損の各LOHイベントの右隣には*sgs1* 単独欠損と*rad50* 単独欠損の頻度の和を積み上げて薄い破線で示した。

表III-12 *sgs1 rad50* 二重欠損株に生じた各LOHイベントのまとめ

LOHイベント	頻度 × 10 ⁻⁵ (fold ×) ¹⁾ [%] ²⁾			
	A ; <i>sgs1</i>	B ; <i>rad50</i> ³⁾	C ; <i>sgs1 rad50</i>	AとBを加算したもの
クラスA				
染色体喪失	94 (17) [57]	290 (53) [79]	640 (116) [70]	380 (69) [72]
クラスB⁴⁾				
交叉	38 (8.6) [23]	46 (10) [13]	150 (34) [16]	80 (18) [16]
交叉+染色体喪失	8.8 (17) [5.3]	8.8 (17) [2.4]	38 (73) [4.2]	18 (35) [3.3]
不等交叉・転座	23 (23) [14]	19 (19) [5.2]	75 (75) [8.2]	42 (42) [7.9]
クラスC⁴⁾				
遺伝子変換	0.56 (6.5) [0.34]	1.0 (12) [0.27]	2.4 (28) [0.26]	1.6 (19) [0.29]
染色体内欠失				
<i>MAT-HMR</i> Δ	0.86 (3.7) [0.52]	0.69 (3.0) [0.19]	6.3 (27) [0.69]	1.6 (7.0) [0.29]
それ以外の欠失	<0.086 (-) [-]	<0.11 (-) [-]	<0.30 (-) [-]	- (-) [-]
<i>URA3</i> 内変異	<0.086 (-) [-]	<0.11 (-) [-]	<0.30 (-) [-]	- (-) [-]
合計	170 (14) [100]	190 (16) [100]	910 (76) [100]	520 (43) [100]

1) ()内の数値は、野生株に対する頻度の比を示している。

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。

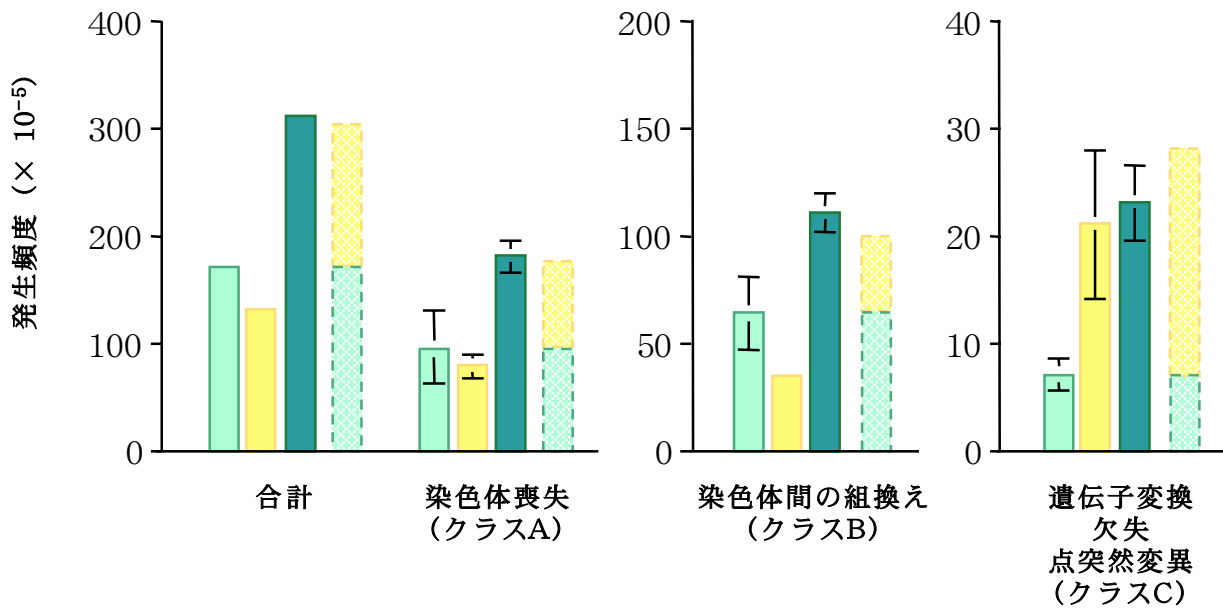
3) *rad50* (RD306) のデータはYoshida et al. (2003) によるものである。

4) 各株の頻度に関しては、表III-11に示した*ADE2* 遺伝子マーカーのホモ化を考慮して補正を行った。

III-5 SGS1 と複製後修復の二重欠損株は各単独欠損株の LOH 発生頻度に対して相加的な上昇を示す

複製後修復は組換え修復と並び、ゲノムの維持に関わる重要な機構の一つであり、互いに補完し合いながら機能していることが示されている（吉田純平 博士論文 2003）。III 章 3 項の結果より、SGS1 が組換え修復機構の元で機能していることが判明したことから、SGS1 と複製後修復との間にも何らかの機能的な関係がある可能性が浮かび上がってきた。そこで、自然 DNA 傷害の修復プロセスにおけるこれら 2 つの遺伝子間の相互作用について明らかにするために、SGS1 と複製後修復を最上位で制御している遺伝子 RAD18 との二重欠損株を作製し(表 II-1)、二倍体ホモ欠損株での LOH 解析を行った。

sgs1 rad18 二重欠損株で生じる LOH について、表現型によるクラス分類を行った結果を表 III-13 にまとめ、図 III-8 にはクラス毎の LOH 発生頻度をグラフで示した。表 III-13 と図 III-8 には、*sgs1* 単独欠損株と *rad18* 単独欠損株で見られるそれぞれのクラスの発生頻度と共に、これらを加算した値を対照として示している。*rad18* 欠損株では、本来 RAD18 が担っていた DNA 傷害の一部が代わりに組換え修復によって修復されることを反映して、各種の染色体異常・再編の発生頻度が上昇するが、中でも特に遺伝子変換は発生頻度が野生株の約 300 倍と顕著な上昇することが分かっている（吉田純平 博士論文 2003）。このことを反映し、クラス B の染色体間の組換えは 34×10^{-5} と野生株の 5.7 倍の上昇、遺伝子変換を含むクラス C の発生頻度は、 21×10^{-5} で野生株の 64 倍という大きな上昇を示すことになる。クラス A の染色体喪失に関しては、 78×10^{-5} と野生株の 14 倍以上の上昇が観られるが、これは複製後修復でしか修復できない DNA 傷害の存在を示唆し、そのような修復できない傷害が結果的に染色体喪失を引き起こしたものと考えられる。このように、*rad18* 欠損株ではいずれのクラスの LOH 発生頻度も上昇するが、特にクラス C の上昇の程度が大きいことが特徴的である。この点を踏まえて *sgs1 rad18* 二重欠損の影響を見てみると、*sgs1 rad18* 二重欠損株では A、B、C いずれのクラスの LOH 発生頻度も上昇しており、その値は全てのクラスについて *rad18* 単独欠損株と *sgs1* 単独欠損株の頻度を加算したものとはほぼ等しいことが示された。すなわち、LOH の発生に関して、*sgs1 rad18* 二重欠損の影響はそれぞれの単独欠損の効果に対して相加的であることが分かった。以上の結果は、ゲノムの維持に関わるプロセスにおいて、SGS1 と RAD18 が互いに影響を及ぼさずに独立に機能していることを示している。つまり、複製後修復が損なわれた際に、それを補完する形で働く際の相同組換え反応には、SGS1 は機能してないことが明らかとなった。複製後修復と相同組換えが互いに補い合う場合について、自然 DNA 傷害の視点から考えると（I 章 4-5 項、図 I-7 参照）、娘鎖ギャップ (DSG) 型の DNA 傷害に対する修復プロセスでの相互作用と考えることができる。この考え方に基づけば、SGS1 が関わる組換え修復は DSG 型ではない DNA 傷害を対象とする相同組換え



図III-8 *sgsl1 rad18* 二重欠損がLOHイベントに及ぼす影響

■は*sgsl1*単独欠損株、■は*rad18*単独欠損株、■は*sgsl1 rad18*二重欠損株を示す。また、二重欠損株の各LOHイベントの右隣には*sgsl1*単独欠損株と*rad18*単独欠損株の頻度の和を積み上げて薄い破線で示した。

表III-13 *sgsl1 rad18* 二重欠損株における表現型に基づいたLOH発生頻度

頻度±標準偏差×10 ⁻⁵ (fold ×) ³⁾ [%] ⁴⁾					
クラス ²⁾	表現型	A ; <i>sgsl1</i>	B ; <i>rad18</i> ¹⁾	C ; <i>sgsl1 rad18</i>	AとBを加算したもの
A	5-FOA耐性 Leu ⁻	94 ± 34 (17) [57]	78 ± 11 (14) [59]	180 ± 15 (33) [58]	170 (0.31) [58]
B	5-FOA耐性 Leu ⁺ Ade ⁻	64 ± 17 (11) [39]	34 ± 2.9 (5.7) [26]	110 ± 8.8 (18) [35]	100 (170) [33]
C	5-FOA耐性 Leu ⁺ Ade ⁺	6.9 ± 1.5 (21) [4.2]	21 ± 6.9 (64) [16]	23 ± 3.5 (70) [7.4]	28 (18) [9.4]
	合計	170 (14) [100]	130 (11) [100]	310 (26) [100]	300 (27) [100]

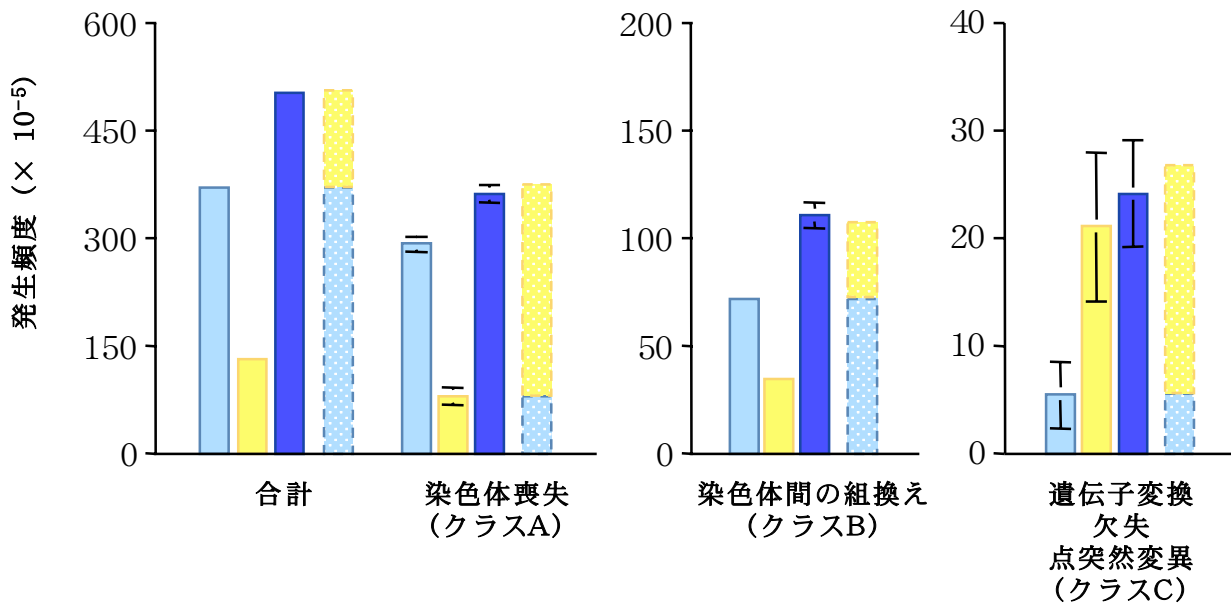
- 1) *rad18* (RD311) のデータは吉田博士論文 (2003) によるものである。
- 2) 5-FOA耐性クローンの表現型によるクラス分類は図III-1に示している。
- 3) ()内の数値は、野生株に対する頻度の比を示している。
- 4) []内の数値は、各株毎のLOH頻度の総計における割合を示している。

反応であることが示唆される。SGS1 の作用する DNA 傷害については、本研究で調べた他の遺伝学的な関係とも併せて、IV 章の考察で詳しく検討する。

III-6 RAD50 と複製後修復の二重欠損株の LOH 頻度は各単独欠損株に対して相加的な上昇を示す

III 章-項 5 で示した結果から、SGS1 が関わる相同組換え反応は、組換え修復の中でも複製後修復とは互換性が無い部分であることが示された。この組換え修復の区別は対象とする自然 DNA 傷害の形と修復に関わる因子の違いを反映している可能性がある。この点について明らかにするために、二本鎖断端 (DSE) の組換え修復に関与するとされている RAD50 について、複製後修復との関係を調べることにした。そこで、*rad18 rad50* 二重欠損株を作製し(表 II-1)、二倍体ホモ欠損株での LOH 解析を行った。

rad18 rad50 二重欠損株で生じる LOH について、表現型によるクラス分類を行った結果を表 III-14 にまとめ、図 III-9 にはクラス毎の LOH 発生頻度をグラフで示した。表 III-14 と図 III-9 には、*sgs1* 単独欠損株と *rad18* 単独欠損株で見られるそれぞれのクラスの発生頻度と共に、これらを加算した値を対照として示している。*rad18 rad50* 欠損株は A、B、C いずれのクラスの LOH 発生頻度も上昇しており、その値は全てのクラスについて *rad18* 単独欠損株と *rad50* 単独欠損株の頻度を加算したものとほぼ等しいことが示された。すなわち、LOH の発生に関して、*rad18 rad50* 二重欠損の影響はそれぞれの単独欠損の効果に対して相加的であることが分かった。この *rad50* 欠損の効果は *sgs1* 欠損で見られた効果(表 III-13、図 III-8) と良く似ており、どちらの場合でも *rad18* 欠損に対して相加的にしか影響を及ぼさないことを明確に示す結果となった。これらのことから、RAD50 は SGS1 と同様に、ゲノムの維持に関わるプロセスにおいて、RAD18 とは影響を及ぼさずに独立に機能していることが明らかとなった。つまり、RAD50 や SGS1 が関わる相同組換え反応は DSG 型ではないかたちの DNA 傷害を対象とする点で一致し、一方、複製後修復は DSG 型の DNA 傷害を対象としているとすると、これらの遺伝学的な関係は説明できる。これらの点については V 章の考察でさらに検討する。



図III-9 *rad50 rad18* 二重欠損がLOHイベントに及ぼす影響

■は*rad50*単独欠損株、■は*rad18*単独欠損株、■は*rad50 rad18*二重欠損株を示す。また、二重欠損の各LOHイベントの右隣には*rad50*単独欠損株と*rad18*単独欠損株の頻度の和を積み上げて薄い破線で示した。

表III-14 *rad50 rad18* 二重欠損株における表現型に基づくLOH発生頻度

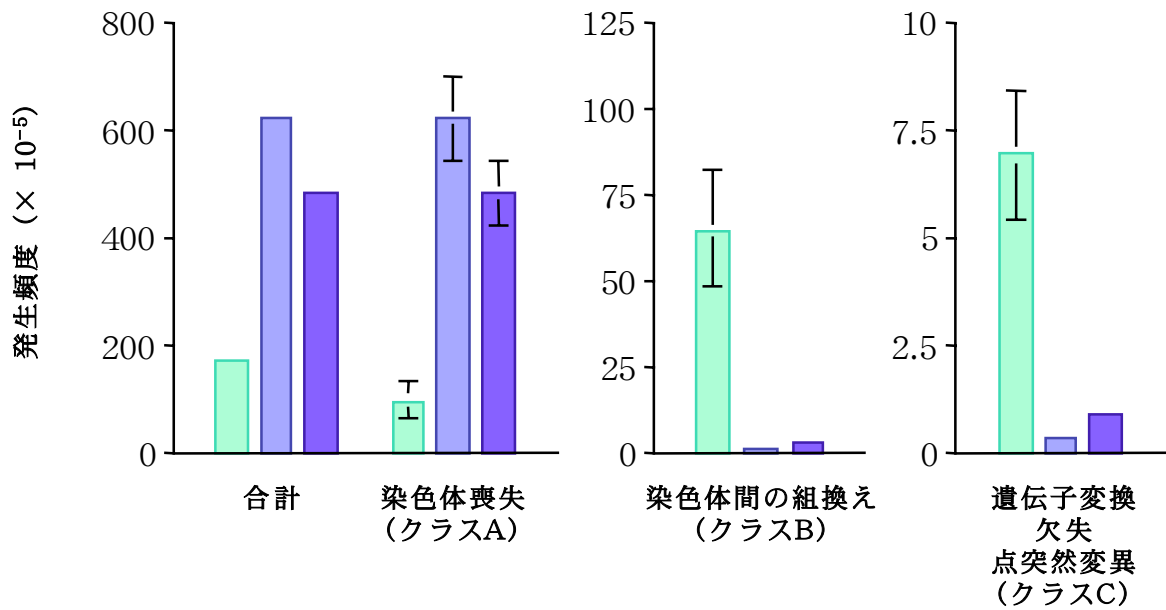
クラス ³⁾	表現型	頻度±標準偏差×10 ⁻⁵ (fold ×) ⁴⁾ [%] ⁵⁾			
		A ; <i>rad50</i> ¹⁾	B ; <i>rad18</i> ²⁾	C ; <i>rad50 rad18</i>	AとBを加算したもの
A	5-FOA耐性 Leu ⁻	290 ± 10 (24) [79]	78 ± 11 (14) [59]	360 ± 11 (65) [73]	370 (67) [73]
B	5-FOA耐性 Leu ⁺ Ade ⁻	71 ± 1.6 (12) [19]	34 ± 2.9 (5.7) [26]	110 ± 6 (18) [22]	110 (18) [22]
C	5-FOA耐性 Leu ⁺ Ade ⁺	5.4 ± 3.1 (16) [1.5]	21 ± 6.9 (64) [16]	24 ± 5.0 (73) [4.9]	26 (79) [5.1]
	合計	370 (31) [100]	130 (11) [100]	500 (42) [100]	510 (43) [100]

- 1) *rad50* (RD306) のデータはYoshida et al. (2003) によるものである。
- 2) *rad18* (RD311) のデータは吉田博士論文 (2003) によるものである。
- 3) 5-FOA耐性クローンの表現型によるクラス分類は図III-1に示している。
- 4) () 内の数値は、野生株に対する頻度の比を示している。
- 5) [] 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。

III-7 SGS1 と組換え修復および複製後修復の三重欠損株は組換え修復と複製後修復との二重欠損株と同様の LOH 発生パターンを示す

序論でも述べたように、RecQ 型ヘリカーゼがゲノムを安定に維持するプロセスで重要な役割を果たしていることは明らかにされていたが、その作用点については明確ではなく、組換え修復や複製後修復とは独立に働く機構として機能しているのかについては定かではなかった。RecQ ヘリカーゼファミリーの一員である SGS1 について以上解析してきた結果から、SGS1 は LOH の発生に関して、RAD51 や RAD52 による組換え修復の下位で機能するが、複製後修復とは独立に働いており、よって複製後修復が損なわれた場合にその欠損を補完している組換え修復にも関与してないことが示された。この関係について確認するために、*sgs1 rad18 rad52* 三重欠損株を作製し(表 II-1)、二倍体ホモ欠損株での LOH 解析を行った。

sgs1 rad18 rad52 三重欠損株で生じる LOH について、表現型によるクラス分類を行った結果を表 III-15 にまとめ、図 III-10 にはクラス毎の LOH 発生頻度をグラフで示した。表 III-15 と図 III-10 には、*rad18 rad52* 二重欠損株で見られるそれぞれのクラスの発生頻度を対照として示している。組換え修復と複製後修復の両方が損なわれた *rad18 rad52* 二重欠損株では、主要なゲノム維持機構のどちらも行えないために、LOH 全体の発生頻度が 6.2×10^{-3} と非常に高い頻度を示し、そのほぼ全てが染色体喪失によるものとなる。この LOH 発生頻度は、それぞれの単独欠損株における LOH 頻度 (*rad52* 欠損株 : 3.6×10^{-3} 、*rad18* 欠損株 : 1.3×10^{-3}) に対して相乗的に増加しており、これら 2 つの修復経路が相互に補完し合うことを示している (吉田純平 博士論文 2003)。もし SGS1 がこれらの修復機構とは独立に機能しているのであれば、この二重欠損株に *sgs1* 欠損を導入すると、LOH イベントの発生頻度がさらに大きく上昇することが予想される。実際には、表 III-15 と図 III-10 に示す様に、*sgs1 rad18 rad52* 三重欠損株では想定した様な劇的な LOH 頻度の上昇は見られず、*rad18 rad52* 二重欠損株と比べて染色体喪失の発生頻度がやや低下するものの、A、B、C いずれのクラスの発生頻度もおおむね *rad18 rad52* 二重欠損株と同程度であった。以上のことから、SGS1 はゲノムの維持において、独自の機構として機能するわけではなく、III-3 の結果から示される通り、組換え修復経路の下位で機能することが示された。



図III-10 *sgs1 rad18 rad52* 三重欠損がLOHイベントに及ぼす影響

■は*sgs1* 単独欠損株、■は*rad18 rad52* 二重欠損株、■は*sgs1 rad18 rad52* 三重欠損株を示す。

表III-15 *sgs1 rad18 rad52* 三重欠損株欠損株における表現型に基づくLOH発生頻度

クラス ²⁾	表現型	頻度±標準偏差 × 10 ⁻⁵ (fold ×) ³⁾ [%] ⁴⁾		
		<i>sgs1</i>	<i>rad18 rad52</i> ¹⁾	<i>sgs1 rad18 rad52</i>
A	5-FOA耐性 Leu ⁻	94 ± 34 (17) [57]	620 ± 78 (110) [99.8]	480 ± 60 (87) [99.2]
B	5-FOA耐性 Leu ⁺ Ade ⁻	64 ± 17 (11) [39]	0.67 ± 0.24 (0.11) [0.11]	2.8 ± 0.32 (0.47) [0.58]
C	5-FOA耐性 Leu ⁺ Ade ⁺	6.9 ± 1.5 (21) [4.2]	0.28 ± 0.11 (0.85) [0.045]	0.86 ± 0.086 (2.6) [0.18]
	合計	170 (14) [100]	620 (52) [100]	480 (40) [100]

- 1) *rad18 rad* (RD311) のデータはYoshida et al. (2003) によるものである。
- 2) 5-FOA耐性クローンの表現型によるクラス分類はに示している。
- 3) () 内の数値は、野生株に対する頻度比を示している。
- 4) [] 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。

IV 考察

本研究は、染色体を安定に維持する機構における RecQ 型ヘリカーゼの役割を明らかにすることを目的に、出芽酵母の持つ唯一の RecQ 型ヘリカーゼをコードする遺伝子、*SGS1* についての解析を行った。*SGS1* の役割を検討する上で、本研究では特に *sgs1* 欠損がゲノムの変化に及ぼす影響を包括的に捉えることに主眼を置き、二倍体細胞をモデルとした LOH 解析系を用いた。この解析系では、*sgs1* 単独欠損によって、どのような修復プロセスが損なわれ、また、それが別の修復機構でどのように補われているのかを、その結果として生じる LOH に及ぼす変化として捉えることができる。同様に、*SGS1* とその他の修復機構との関係についても、相互作用等の細胞内でのプロセスが LOH の発生パターンに反映されると考えられる。本研究では、*sgs1* 単独欠損株、および、*SGS1* が機能的に関係している可能性が考えられた組換え修復および複製後修復との多重欠損株について LOH 解析を行った。以下、今回得られた結果に基づいて、*SGS1* の作用点や機能、および、他の修復因子との関係について考察した。

IV-1 *sgs1* 欠損株より得られた知見

sgs1 欠損株では、LOH 全体の発生頻度が野生株の 14 倍に上昇し、LOH 全体の発生頻度に占める各々の染色体異常・再編の割合は野生株とおおむね同様のパターンを示した。この結果から、*sgs1* 欠損によって相同組換えの機会を上昇させる何らかの原因が増大したことが考えられる。I 章 5 項 (図 I-6) で述べた「フォークの退行モデル」も同様の考え方をしており、このモデルでは RecQ 型ヘリカーゼが欠損した場合にはチキンフットが組換え修復を必要とする様な DSE にプロセスされると想定している。これらの考え方では、*sgs1* 欠損により見られた染色体異常・再編の上昇は、*SGS1* の遺伝子機能が欠損することにより組換え修復の機会が増大し、その結果組換え修復に伴うエラーも増大したためと説明される。この場合、*sgs1* 欠損株では LOH として検出されない様なエラーフリーな組換え修復、つまり姉妹染色分体間の組換えの発生頻度も上昇していると想定されるが、姉妹染色分体間の組換えは遺伝学的な変化を生じないため、現在の所、確実に同定することは困難である。また、*sgs1* 欠損株の LOH では、野生株と比較して交叉等のアリル間の組換えの発生頻度よりも、染色体喪失を伴う組換えや転座・不等交叉等の異常染色体を引き起こす組換えの発生頻度が総じて高い傾向が見られたことから、*SGS1* が相同組換えの反応プロセス自体にも機能して、異所性の配列間で生じる様なあまり正確ではない組換え反応を抑制することにも寄与していることが考えられ

た (Ajima et al. 2002)。

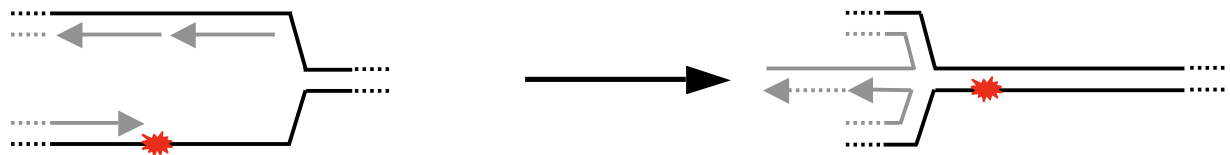
なお、「フォークの退行モデル」が成立するためには以下の様な条件が存在する (図 IV-1)。第1には、リーディング鎖合成において鋳型上の DNA 損傷により複製の進行が阻害された場合、その下流から複製が開始されることがないことである。もし、下流から複製が再開されるのであれば、DSG を残すことで複製は進行する (図 IV-1A-b)。第2の条件は、リーディング鎖側の複製が阻害された際、ラギング鎖側の複製が、リーディング鎖鋳型上の複製阻害部位に対応する位置を超えて先行していることである (図 IV-1A-c)。もし、ラギング鎖合成がリーディング鎖側よりも先行していなければ、チキンフット構造を取っても損傷に対応する部位はラギング鎖を鋳型として鎖伸長することができないからである。大腸菌の OriC プラスミド *in vitro* DNA 複製系の場合には、この2つの前提条件が成立しうることが示されている (Higuchi et al. 2003)。大腸菌の場合、精製された18のDNA複製因子を試験管内で再構成し、細胞内と同様の様式でDNA合成を行うことが可能となっている。Higuchiらは、この系を用いて鋳型の特定の位置に1ヶ所の脱塩基損傷を導入した鋳型プラスミドを構築し、その損傷がDNA合成にどのような影響を及ぼすのかを詳細に解析した。その結果、ラギング鎖側の鋳型に脱塩基損傷が存在した場合、損傷部位におけるラギング鎖合成は阻害されるが、複製フォーク自体は進行し、DSGが形成されていた (図 IV-1B)。一方、リーディング鎖側の鋳型に脱塩基損傷が存在する場合には、リーディング鎖の複製が妨げられるが、この場合、下流から複製が再開されることは観察されず、複製フォークの進行が阻害されていた。この際、ラギング鎖側では約60%の場合において、損傷に対応する部位より1 kb程度先までDNA合成が行われていることが確認された (図 IV-1A-a)。DNAの複製や修復さらに組換えなどの根元的な細胞機能に関しては、原核生物、真核生物を問わず本質的には共通の様式を持つ例が多く知られており、大腸菌の *in vitro* の解析で観られた現象は、出芽酵母、ひいては高等真核生物でも生じ得ると考えられる。これらのことは、「フォークの退行モデル」が成立するための前提条件が真核生物でも満たされている可能性が高いことを示している。

IV-2 SGS1 と組換え修復の二重欠損株より得られた知見

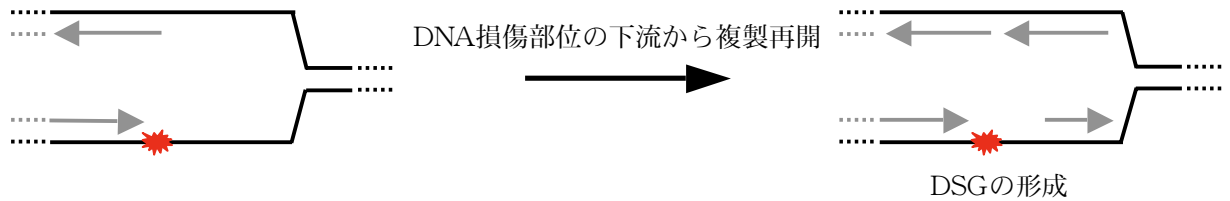
上述したように、*sgs1* 欠損株の LOH 解析により得られた知見は、「フォークの退行モデル」における RecQ 型ヘリカーゼの作用機作と矛盾しないものであった。しかしながら、I章-5項でも述べたように、相同組換え関連遺伝子 *RAD51* や *RAD52* と *SGS1* との関係について、「フォークの退行モデル」とは一見一致しないと考えられる結果が報告された (Gangloff et al. 2000 ; Onoda et al. 2001)。そこで、本研究においても組換え修復と *SGS1* の二重欠損株についての解析を行い、ゲノムの変化に及ぼす影響から組換え修復と *SGS1* との関係を検討した。LOH

A. リーディング鎖での複製進行阻害

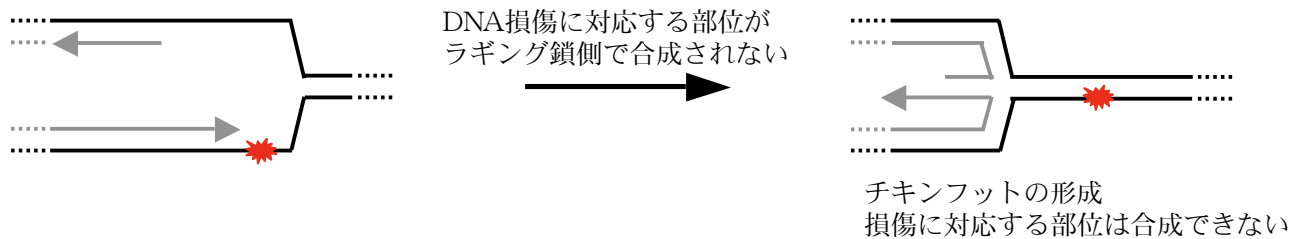
a



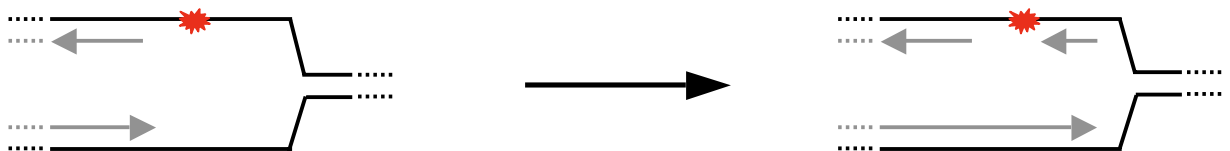
b



c



B. ラギング鎖での複製進行阻害



図IV-1 複製フォークの退行モデルの成立要因

DNA損傷を★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。リーディング鎖側の鋳型上に存在するDNA損傷によりDNA複製の進行が阻害され、ラギング鎖側のDNA合成が損傷に対応する部位よりも先行して行われることがフォークの退行モデルの前提条件となる (A-a)。ラギング鎖側の鋳型DNA上に存在するDNA損傷によりDNA合成が阻害された際には、DSGが形成されることになる (B)。

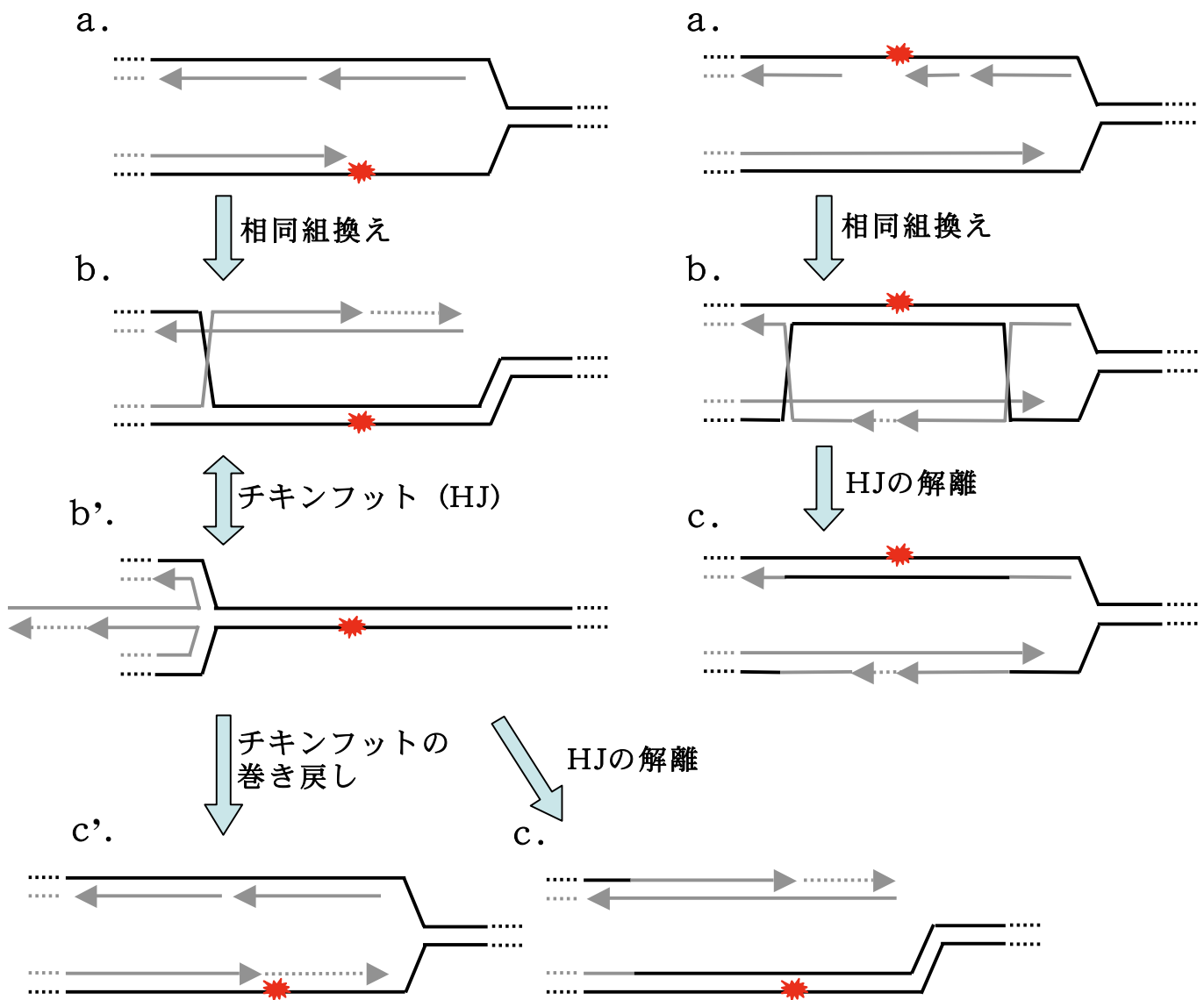
解析の結果は、各種の染色体異常・再編の頻度や発生のパターンが、*sgs1 rad52*、*sgs1 rad51* いずれの二重欠損株の場合も、それぞれ *rad52*、*rad51* 単独欠損株の場合と変わらないことを示していた。「フォークの退行モデル」に従えば、これらの二重欠損株では LOH 発生頻度が相乗的に上昇し、その大半が染色体喪失となるのではないかと当初予想していたが、実際には、LOH 解析の結果は、Onoda らや Gangloff らが薬剤感受性や細胞増殖について報告していた、*SGS1* が組換え修復の下位にあるとの結果と一致するものであった。そこで、本研究の結果と「フォークの退行モデル」双方を矛盾無く説明する分子機序として、フォークの退行プロセスは相同組換えにより生じていることが考えられた (図 IV-2)。つまり、ラギング鎖側の DSG 型 DNA 傷害を、組換え修復が図 IV-2B の様な形でプロセスする様に、リーディング鎖側での複製の進行阻害の場合にも、同様の形で組換え修復が作用すると考えると、結果としてチキンフットと同じ構造を生じることになる (図 IV-2A)。これまでフォークの退行に関わるプロセス、つまりチキンフットがどのように生じているのかについては明確にされていなかったが、組換え修復によって生じているとすれば上手く説明できる。DSG の場合には (図 IV-2B)、相同組換えの鎖交換反応により生じるホリディ中間体 (HJ) が解離されることで複製フォーク様の DNA 構造に戻ることが出来る。しかしながら、リーディング鎖側で生じた HJ (図 IV-2A-b)、つまり、チキンフットは、解離されると DSE を生じてしまうことになる (図 IV-2A-c)。生じた DSE の修復には、再度相同組換えを行う必要があり、ひいては染色体異常・再編の発生のリスクが増すことになる。このような相同組換えによるリスクを低下させるために、*SGS1* がチキンフットの巻き戻しに機能していると考えられることができる (図 IV-3A-c')。RAD51 や RAD52 が欠損している場合には、チキンフットを形成する鎖交換反応のプロセスが損なわれるため、*SGS1* の存在/非存在はもはや意味をなさないことになる。*Sgs1p* は *Rad51p* と *in vitro* で相互作用することが報告されており (Wu et al. 2001)、*SGS1* は *RAD51* を介してチキンフットに呼び込まれていることも考えられる。このことは、LOH 解析において、*RAD51* が存在しなければ、*RAD52* が存在していても *SGS1* の機能が損なわれた様に見えることとも一致する。以上をまとめると、チキンフット構造は組換え修復に依存して発生し、それを *SGS1* が巻き戻していることが考えられた。

IV-3 *SGS1* と DSE の組換え修復遺伝子 *RAD50* の二重欠損株より得られた知見

以上述べてきた様に、*SGS1* は相同組換え機構により形成されたチキンフットを DNA ヘリカーゼ活性により巻き戻していること、また、その結果として相同組換えが発生する機会を抑制し、相同組換えに伴うエラーのリスクを回避していること

A. リーディング鎖の場合

B. ラギング鎖の場合



図IV-2 リーディング鎖合成の進行阻害とラギング鎖合成の進行阻害
それぞれのDNA傷害に対する組換え修復

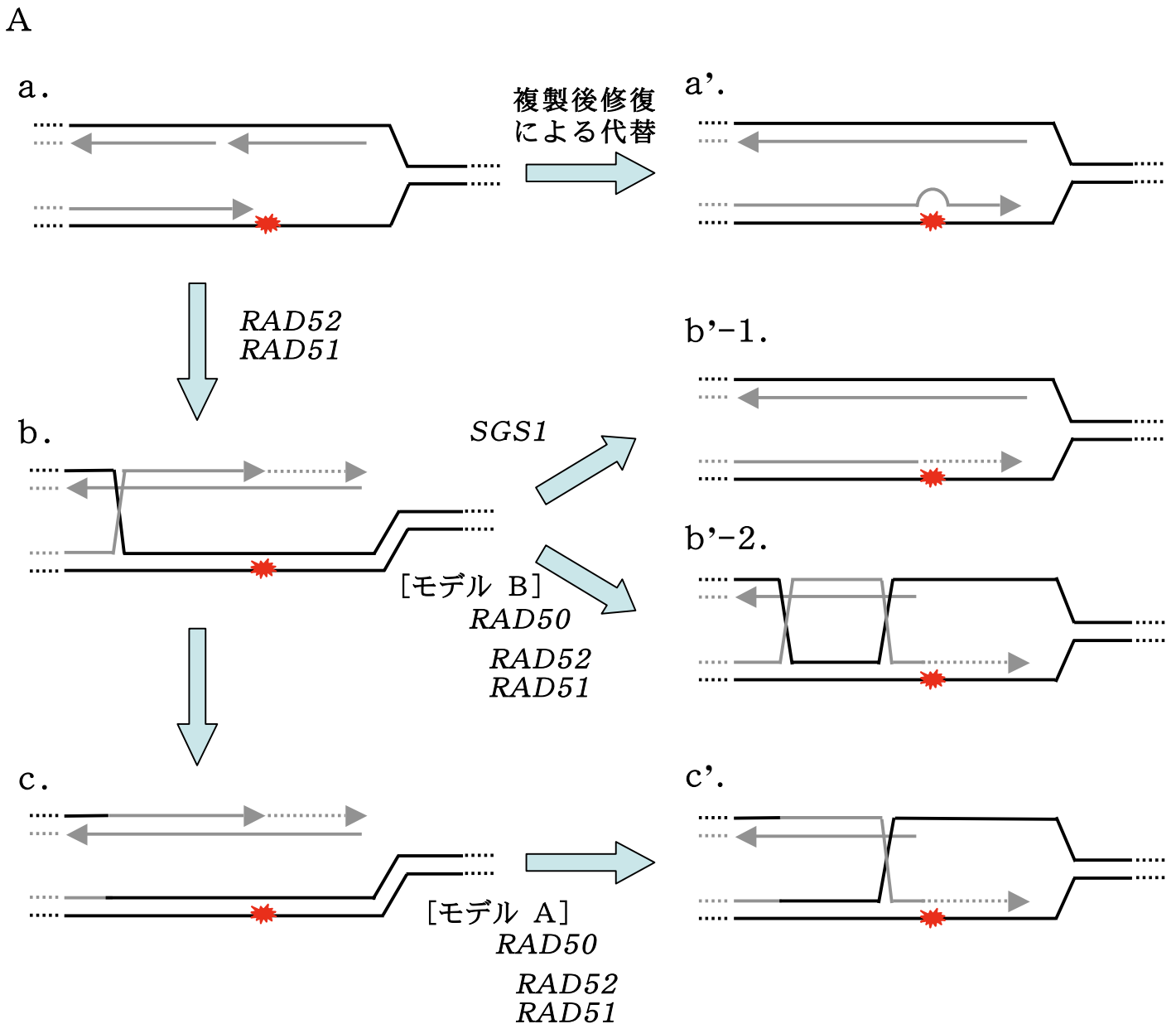
DNA損傷を★で、二本鎖DNAを二本の実線で示した。また、新生鎖を灰色の矢印で示した。リーディング鎖側における複製阻害の場合、相同組換えにより生じる構造はチキンフットと同じ構造と見なせる。この中間体が解離されるとDSEが生じることになる (A)。ラギング鎖側における複製阻害の場合にはDSGが生じ、チキンフットは形成されない。また、組換え中間体が解離されてもDSEは発生せず、複製フォークの構造に戻ることになる (B)。

が考えられた。言い換えれば、*sgs1* 欠損下ではチキンフットの解離による DSE が大量に生じ、DSE が相同組換えによって修復される代償として、各種染色体異常や再編が発生する機会も上昇していると考えられる。この DSE の組換え修復には *RAD50* が重要な機能を担っているとされている。序論でも述べたように、*RAD50* は MRX 複合体として、DNA 末端をプロセシングして *RAD51* が結合するための単鎖 DNA 領域を露出させたり、コヒーシンの構造で姉妹染色分体間の保持を行っていると考えられている。そのため、*RAD50* が欠損すると、特に姉妹染色分体間の組換えが損なわれ、結果としてそれ以外の配列間での組換えが発生しやすくなっていると考えられる。

SGS1 と *RAD50* との二重欠損株における LOH では、点突然変異を除く全ての種類の染色体異常・再編の発生頻度が、それぞれの単独欠損に比べ相乗的に上昇していた。この際、特定の染色体異常・再編のみが際だって誘発、あるいは抑制されている訳ではなく、各種染色体異常の LOH 発生のパターンは *rad50* 単独欠損株の場合と同様であった。このことは *sgs1* 欠損により細胞内で *RAD50* が機能するはずの DNA 傷害、つまり DSE が増加したことを示している。この *RAD50* と *SGS1* との関係は、当初、*SGS1* の機能について「フォークの退行モデル」に基づいて考えた場合に想定していた、「組換え修復と *SGS1* の二重欠損による相乗的な LOH 発生頻度の上昇」を、多少、想定とは別の形で見たと捉えることができる。当初の考えでは、組換え修復と *SGS1* の二重欠損株では LOH 発生頻度が相乗的に上昇し、その大半が染色体喪失となるのではないかと予想していたが、IV 章-2 項で述べたように、*RAD51* や *RAD52* はおそらくはチキンフットの形成に関わることで (図 IV-3A a-b)、*sgs1* 欠損下で生じる DSE の形成自体に必要なため、当初の予想と一致する結果は得られなかった。しかし、*RAD50* が欠損した場合には、相同組換えの鎖交換反応そのものは損なわれず、チキンフットの形成にも影響しないため、*sgs1* 欠損下における組換え修復の働きに対する影響のみを見ることができた訳である。

sgs1 欠損と *rad50* 欠損との相乗的な関係について、*RAD50* と *SGS1* との作用点から考えると、① *RAD50* と *SGS1* とが互いに連続したステップで作用しており、上流側の機能の欠損を下流側の機能によって補っている場合 [モデル A] と ② 同じ作用点で互いにオーバーラップした機能を持っており、相互に欠損を補い合っている場合 [モデル B] との 2 通りが考えられる (図 IV-3A)。これ迄述べてきた *SGS1* の作用機序モデル (V 章-2 項参照) は ① の考え方 [モデル A] と一致する。つまり、*sgs1* 欠損により DSE が発生し、この DSE が *RAD50* に依存して組換え修復されているとすれば (図 IV-3A c-c'), *sgs1* 欠損と *rad50* 欠損との相乗的な関係が説明される。

次に、*sgs1* 欠損と *rad50* 欠損との相乗的な関係に関して、上記 ②-同じ作用点で互いにオーバーラップした機能を持っている可能性 [モデル B] について検討した。*SGS1* の作用点として想定しているチキンフット構造には、DSE に相当す



図IV-3 *sgs1 rad50*二重欠損株におけるLOH発生頻度の相乗的上昇と
*SGS1*と*RAD50*の作用点

DNA損傷を★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他の染色体を緑の実線で示した。組換え修復により形成されたチキンフット (A-b) が*sgs1*欠損により巻き戻されない場合、代わりに*RAD50*によるDSEの組換え修復により修復される。この代替プロセスは2つの状況が想定される。1つは、*sgs1*欠損下ではチキンフットが切断されてDSEを生じ (A-c)、代わりにそのDSEを*RAD50*が修復する状況である (A-c') [モデル A]。もう1つは、組換え修復により生じたチキンフットに存在するDSEに (A-b) *RAD50*が直接作用する状況が考えられる (A-b'-2)。この場合は、チキンフットを介して*SGS1*と*RAD50*が相互に機能し合えることが想定される[モデル B]。*SGS1*が欠損した際には、いずれのモデルの場合も染色体異常・再編に繋がる相同組換えの機会が増大することになる (B)。

る部分が存在する (IV-3A b)。つまり、*RAD50* はチキンフットが解離した後の DSE のみならず、解離前のチキンフット構造に作用している可能性がある。この後者の DSE に *RAD50* が作用して、再度、相同組換え反応が引き起こされるとすると (IV-3A b'-2)、チキンフット構造により形成されていた新生鎖同士と鋳型鎖同士の対合が、元の新生鎖と鋳型鎖の対合に戻される。形成された 2 つの HJ を解消すれば、複製フォーク様の構造に戻ることにになり、*RAD50* 依存性の相同組換え反応によっても *SGS1* によるチキンフットの巻き戻し (IV-3A b'-1) と同等の機能が説明できることが分かる。ただし、*sgs1* 欠損と *rad50* 欠損との相乗的な関係は、*RAD50* と *SGS1* とが互換性を示さない場合もあることを示しており、*RAD50* と *SGS1* とは同一の基質に対して全く同じ様に作用している訳ではないことを意味する。*RAD50* と *SGS1* の作用の差違は、それぞれが優先的に機能するチキンフット構造が存在することによるのかもしれない。例えば、チキンフットを形成する要因となった DNA 損傷の種類によって *RAD50* と *SGS1* を使い分けている可能性などが想像されるが、現段階では明確なことは言えない。いずれにしても、どちらかの遺伝子機能が損なわれた場合には、代わりにもう一方の遺伝子機能によって、一部の DNA 傷害はエラーフリーに、一部のものは染色体異常・再編を伴う形で回避され、また、場合によっては上手く代替機能が働かずに、染色体が失われてしまうと考えられる。*SGS1* の欠損は、*RAD50*、*RAD51*、*RAD52* による DSE の組換え修復により代替されるが (図 IV-3A b'-2)、*RAD50* が機能しにくい場合にはエラーフリーな姉妹染色分体間の組換えが特に損なわれ、アリル間や異所性の相同組換え反応により、LOH として検出される様な各種の染色体異常・再編が誘発される (図 IV-3B)。他方、*RAD50* が欠損した場合には、代わりに *SGS1* がチキンフットを巻き戻してエラーフリーなプロセスが進行する (図 IV-3A b'-1)。*SGS1* が上手く巻き戻せないものに関しては、*RAD50* が存在しない状態で相同組換え反応が進行するため、先程の *sgs1* 欠損の場合と同様、姉妹染色分体間の組換えが損なわれ、LOH として検出される様な各種の染色体異常・再編が誘発される (図 IV-3B)。*SGS1* と *RAD50* が両方とも欠損すると、チキンフット (図 IV-3A b) の状態から b'-1 あるいは b'-2 どちらのエラーフリーなプロセスも阻害されてしまい、*RAD51* や *RAD52* に依存した形で、アリル間や異所性の相同組換え反応により、各種の染色体異常・再編の発生頻度が相乗的に上昇することになる (図 IV-3B)。

以上述べてきた 2 つのモデルでは、*sgs1* あるいは *rad50* 単独欠損株、さらには *sgs1 rad50* 二重欠損株において点突然変異が検出できなかったことも説明できる。リーディング鎖側の鋳型上に生じた DNA 損傷により複製の進行が阻害された場合の DNA 構造に対しては (図 IV-3A a)、*RAD51* や *RAD52* の欠損下では、代わりに複製後修復が作用できるが (図 IV-3A a')、一度、*RAD51* や *RAD52* によってチキンフットが形成されると (図 IV-3 A b)、複製後修復は作用出来ない構造となる。このため、*SGS1* と *RAD50* の機能欠損は複製後修復によっては代替されず、よって点突然変異を誘発することもないと考えられる。

上記で *SGS1* と *RAD50* が同じ作用点で機能していることを考える際に、図 IV-3A c の過程、つまり、*SGS1* が DSE の組換え修復のみに作用している可能性については考慮しなかった。この考えは、以下の様な点で矛盾が生じるからである。*SGS1* と *RAD50* が DSE の組換え修復において、重複して機能しているとすると、*sgs1 rad50* 二重欠損株で生じている LOH は DSE に起因して生じていることになる。出芽酵母では、DSE の組換え修復を始めとして、ほぼ全ての組換え修復には *RAD52* の遺伝子機能が必須であるため、*rad52* 単独欠損株での LOH 発生頻度は、少なくとも *sgs1 rad50* 二重欠損株の場合より高くなるはずである。しかしながら、*rad52* 単独欠損株の LOH 発生頻度は 3.6×10^{-3} と *sgs1 rad50* 二重欠損株の LOH 発生頻度 9.2×10^{-3} よりもかなり低いことから、*SGS1* が DSE の組換え修復に機能することは想定しにくいと考えた。一方、上に示した 2 つのモデルでは、*RAD52* が欠損した場合には、代わりに複製後修復が作用すると考えられるため (図 IV-3A a'), *rad52* 欠損株の LOH 発生頻度が *sgs1 rad50* 二重欠損株よりも低いことは矛盾しない。

以上まとめると、*sgs1* 欠損下では DSE が生じ (図 IV-3A c)、この DSE が *RAD50* に依存した組換え修復で修復される (図 IV-3A c') [モデル A]、あるいは、*SGS1* と *RAD50* がチキンフット構造において (図 IV-3A b)、互いを代替できるような形で機能している (図 IV-3b'-1, -2) [モデル B] との 2 つのモデルが考えられた。

IV-4 *SGS1* と複製後修復の二重欠損株より得られた知見

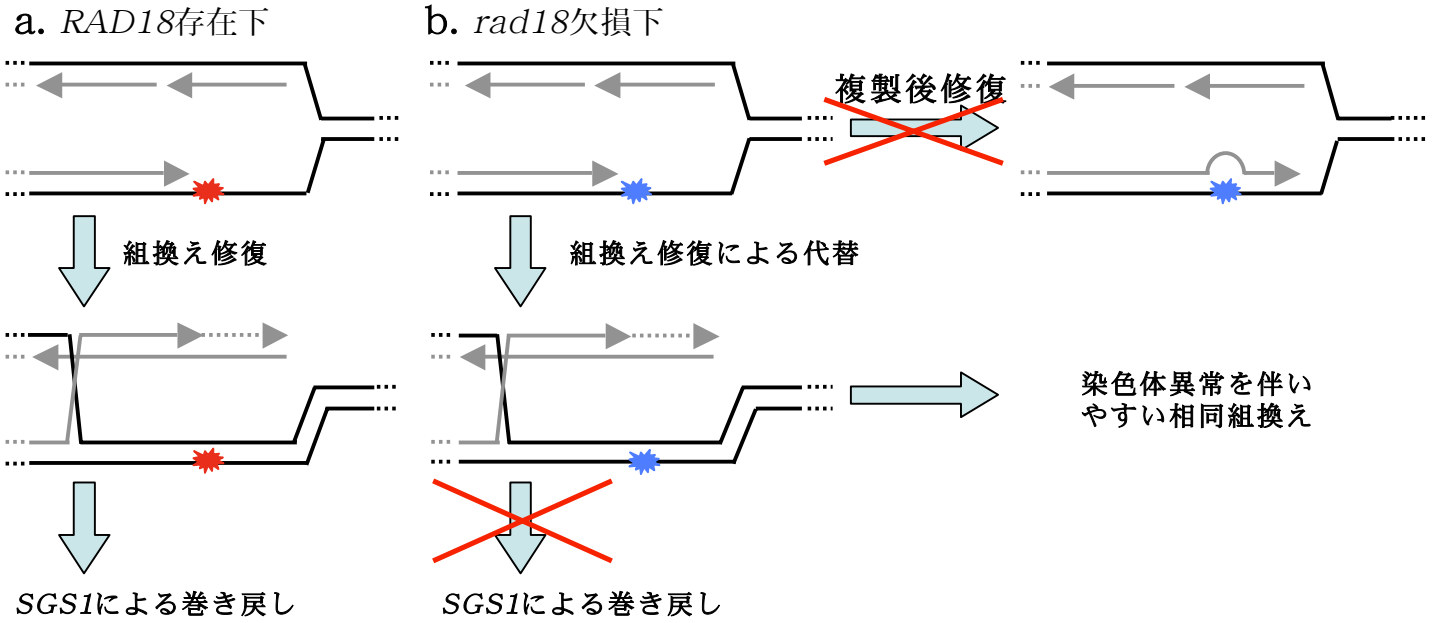
組換え修復は複製後修復とも密接に関わり合って機能していることは I 章 4-3 項 (図 I-5) で述べた通りである。これらのことから、*SGS1* と複製後修復との間にも何らかの機能的な関係がある可能性が考えられたため、複製後修復と *SGS1* の二重欠損株について LOH 解析を行った。*sgs1 rad18* 二重欠損株では、いずれのクラスの LOH の発生頻度も、それぞれの単独欠損株の LOH 発生頻度を加算したものと同程度となり、相加的な上昇を示していた。このことは、複製後修復が損なわれた際に、それを補完する形で働く際の相同組換え反応には、*SGS1* は機能してないことを示している。しかしながら、この点については以下の様な疑問点が生じる。自然 DNA 損傷はどちらの DNA 鎖にも発生するはずであり、DNA 複製の際にリーディング鎖側・ラギング鎖側のどちらにも DNA 傷害を引き起こすと考えられる。序論でも述べた様に、組換え修復と複製後修復は自然 DNA 傷害の解消に際して、不完全ながら補完し合えることが示されていることから、どちらの鎖の DNA 傷害にも互いに補い合って機能していると想定される。そのため、複製後修復が欠損した場合、リーディング鎖側の DNA 傷害は代わりに組換え修復によってプロセスされてチキンフットが形成されるであろうことが想像される (図 IV-4)。つまり、*SGS1* が複製後修復の欠損に由来して生じるチキンフットに対しても機能

している様に思われるが、実際には、SGS1 と複製後修復との間には機能的な相互作用が見られなかった。以上の点を考慮すると、SGS1 が機能する状況について 2 つのケースを考えることが出来る (図 IV-4)。いずれの場合も、組換え修復と複製後修復がどちらも働き得る様な DNA 傷害に対しては、SGS1 は機能しないという考えに立脚したものである。1 つ目のモデルでは (図 IV-4A)、元々複製後修復が修復を担っていた DNA 傷害に対して、代わりに組換え修復が働くことで生じたチキンフットには SGS1 が機能し難いと考え (図 IV-4A-b)。これに対し、SGS1 は組換え修復が優先して機能する様な DNA 傷害から生じるチキンフットには問題なく機能する (図 IV-4A-a) [モデル 1]。2 つ目のモデルでは (図 IV-4B)、複製後修復が修復を担うべき DNA 傷害が、複製後修復が欠損しているために修復されない状況が続くと、リーディング鎖側でも DSG としてプロセスされると考える (図 IV-4B-b)。この DSG に対して組換え修復が働く場合には、SGS1 が機能する状況は発生しない。モデル 1 の場合と同様、組換え修復が優先して機能する様な DNA 傷害から生じるチキンフットには SGS1 が巻き戻しに機能する (図 IV-4B-a) と考える [モデル 2]。一般に、DNA 複製の様式は、リーディング鎖側では連続的に、ラギング鎖側では不連続的に行われていると考えられている。よって、ラギング鎖側の鋳型に DNA 損傷が存在する場合には、複製の様式が変わることなく DSG が形成されると考えられている (図 IV-2B-a)。一方、複製装置がリーディング鎖側の鋳型上の DNA 損傷に差しかかった場合に、細胞内でどのような挙動を示すのかについては余り明らかになっていない。リーディング鎖側での DNA 複製が不連続的に行い得るのか、また、行い得るとしても、ラギング鎖の場合とは異なりどのようなメカニズムで DSG を生じるのかについては、明確には結論されていない。実際、先にも述べた大腸菌の複製因子を用いた *in vitro* における研究 (Higuchi et al. 2003) では、リーディング鎖合成の鋳型に DNA 損傷が存在する場合、複製フォークの進行が妨げられ、損傷部位より下流から DNA 複製が再開されると言ったことは観察されなかった。しかし一方で、大腸菌での *in vivo* の解析において、リーディング鎖側でも不連続な DNA 合成を行っている可能性が示唆されている (Kuzminov 1999)。以上のことより、リーディング鎖側で DNA 損傷が生じた際、少なくとも複製後修復が欠損している場合に、チキンフットが形成されることも (モデル 1)、あるいは、DSG が形成されることも (モデル 2)、現段階ではどちらのモデルも明確に否定はできないと考えた。

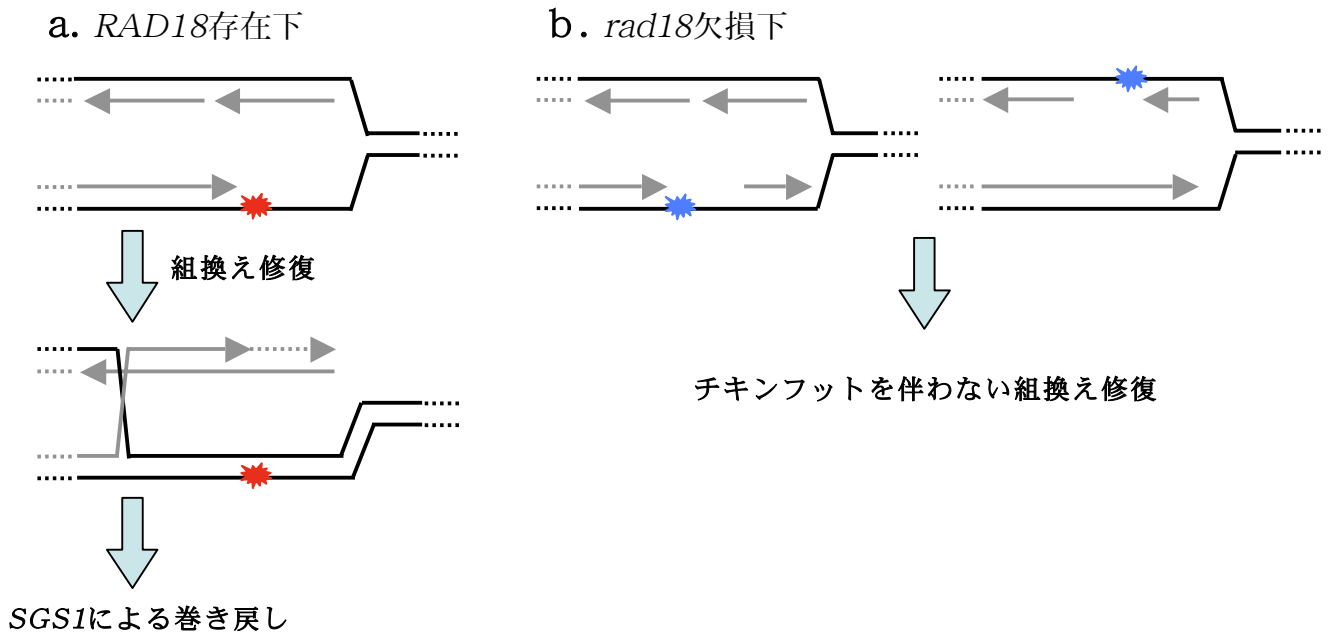
IV-5 RAD50 と複製後修復の二重欠損株より得られた知見

IV 章 3 項で示した SGS1 と RAD50 の関係についての 2 つのモデルと、IV 章 4 項で示した SGS1 と RAD18 の関係から考えた 2 つのモデルとを考え合わせると、RAD50 と RAD18 の関係について、以下の様な可能性が浮かび上がってくる。も

A. 複製後修復欠損下で生じるチキンフットにはSGS1が機能しない [モデル 1]



B. 複製後修復欠損を代替する組換え修復ではチキンフットが形成されない [モデル 2]



図IV-4 複製後修復欠損より想定されるSGS1の作用モデル

組換え修復が優先的に作用するDSGのDNA損傷を★で、複製後修復が優先的に作用するDSGのDNA損傷を★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。

SGS1は複製後修復欠損下で生じる相同組換えには機能しないことから、SGS1は複製後修復の欠損下で生じるチキンフットの巻き戻しが出来ない (A-b)、あるいは、複製後修復欠損下ではチキンフットが形成されない (B-b) ことが想定される。

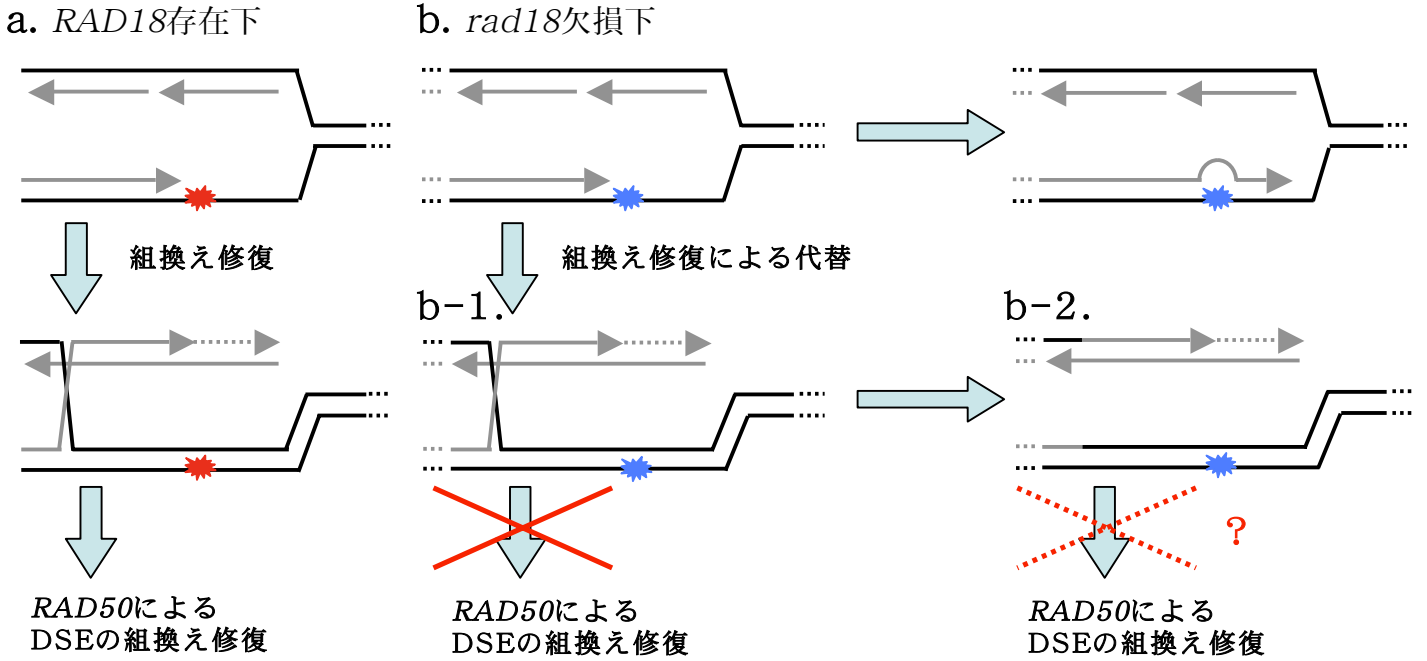
し複製後修復欠損によって形成されるタイプのチキンフットには *SGS1* が作用しないと考えるのであれば (モデル 1、図 IV-4A-b)、この場合、*RAD50* による DSE の組換え修復が代わりに働くのではないかと想像される。一方、複製後修復欠損下ではリーディング鎖でも DSG が形成されるとすれば (モデル 2、図 IV-4B-b)、この組換え修復には *RAD50* は関与しないと考えられる。*RAD18* と *RAD50* の二重欠損の LOH に対する影響を見てみると、*rad18 rad50* 二重欠損株では、*rad18 sgs1* 二重欠損株の場合と同様、いずれのクラスの LOH の発生頻度も、それぞれの単独欠損株の LOH 発生頻度を加算したものと同程度となり、相加的な上昇を示していた。この結果は、*SGS1* の場合と同様、複製後修復が損なわれた際に、それを補完する形で働く際の相同組換え反応には *RAD50* は機能してないことを意味する。この結果を合わせて先のモデルを考え直してみると、モデル 1 (図 IV-4A-b) の場合、複製後修復欠損下で形成されるタイプのチキンフット (図 IV-5A-b-1)、あるいは、その HJ が解離されて生じる DSE (図 IV-5A-b-2) には、*RAD50* が作用しないことになる。しかしながら、これらの DSE 構造は複製後修復存在下で生じる同様の構造とは何ら違いがなく、複製後修復が欠損した場合にのみ *RAD50* が作用しないことは説明し難い。ただし、IV 章-3 項で検討した様に、*SGS1* と *RAD50* がチキンフット構造において、互いを代替できるような形で機能している (図 IV-3A モデル B) とすれば、*RAD50* が *SGS1* の場合と同様、*rad18* 欠損下で生じるチキンフットには機能できない状況も考えられる (図 IV-5A-b-1)。複製後修復欠損下で形成される型のチキンフットには、本来ならば複製後修復によって優先的に処理される DNA 傷害の原因となる損傷が存在している。例えば、DNA 損傷が何らかの形でチキンフット構造に影響を与えており、このタイプのチキンフットには *RAD50* や *SGS1* が機能できないのかもしれない。一方、モデル 2 (図 IV-4B-b、図 IV-5B-b) では、*RAD50* と *RAD18* の関係を無理なく説明できる。

以上まとめると、複製後修復欠損下での組換え修復では (図 IV-5)、①チキンフットが形成されるが、これには *RAD50* も *SGS1* も機能し難く、結果としてアレル間や異所性の相同組換えで修復される (図 IV-5A-b-1)、あるいは、②リーディング鎖側でも DSG が形成され、*RAD50* や *SGS1* の関与なしに組換え修復が行われる (図 IV-5B-b)、との 2 つの可能性が考えられる。①において、チキンフットが解離されるにも関わらず *RAD50* が作用しない場合 (図 IV-5A-b-2) は考えにくい。

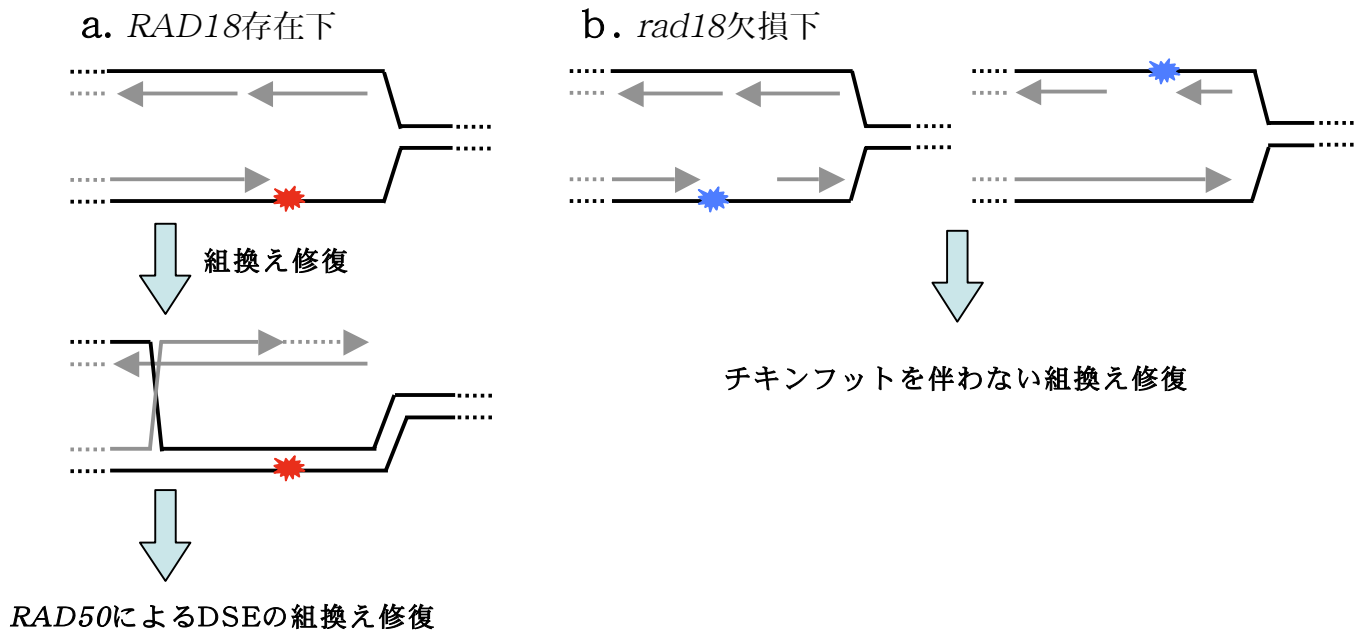
IV-6 *SGS1* と組換え修復、複製後修復の三重欠損株より得られた知見

以上述べてきた様に、*SGS1* は組換え修復の元で機能するが、複製後修復欠損下で誘発される相同組換えには関与していないことが示された。しかしながら、これ

A. 複製後修復欠損下で生じるチキンフットにはSGS1が機能しない [モデル 1]



B. 複製後修復欠損を代替する組換え修復ではチキンフットが形成されない [モデル 2]



図IV-5 複製後修復欠損より想定される*RAD50*の作用モデル

組換え修復が優先的に作用するDSGのDNA損傷を★で、複製後修復が優先的に作用するDSGのDNA損傷を★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。

*SGS1*が複製後修復欠損下で生じるチキンフットを巻き戻せない場合、チキンフットに存在するDSE (A-b-1) の組換え修復に*RAD50*も機能できない可能性が考えられる。しかし、チキンフットが解離されて生じるDSE (A-b-2) の組換え修復に*RAD50*が機能できないことは考えにくい。複製後修復欠損下ではチキンフットが形成されない場合、*RAD50*は複製後修復とは機能的に相互作用を持たないことが考えられる (B)。

迄、RecQ 型ヘリカーゼは組換え修復機構とは異なる独自の経路で機能するものと考えられていた経緯をふまえ、この三者の関係について確認した。ゲノムを維持するプロセスにおいて、SGS1 が組換え修復や複製後修復とは異なる経路で機能するのであれば、組換え修復と複製後修復の二重欠損株が相乗的な LOH の上昇を示したように、組換え修復と複製後修復の二重欠損株に *sgs1* 欠損を導入することで、LOH の発生に大きな影響を与えるであろうことが想定される。しかしながら、組換え修復と複製後修復の二重欠損株に *sgs1* 欠損を導入した三重欠損株では、そのような劇的な変化は見受けられず、おおむね *rad18 rad52* 二重欠損株と同等の LOH 発生パターンを示した。つまり、SGS1 はゲノムを維持するプロセスにおいて、組換え修復や複製後修復とは独立に機能している訳ではないことが明らかとなった。

IV-7 本研究のまとめと今後の展望

本研究においては、LOH 解析系を用いて、ゲノムの安定な維持における SGS1 と修復経路との遺伝学的な関係を解析し、以下の知見を得た。

(1) SGS1 は組換え修復が発生する機会を抑制し、その結果として組換え修復に伴うエラー (LOH として検出される各種の染色体異常) の発生を抑えている。

(2) SGS1 はゲノムを維持するプロセスにおいて組換え修復経路の下位で機能している。

(3) SGS1 は DSE の組換え修復に機能する RAD50 と代替可能な形で作用している。

(4) SGS1 は組換え修復の下位で機能するものの、複製後修復の欠損を代替する形で働く組換え修復には機能しない。

(5) RAD50 は組換え修復の下位で機能するものの、複製後修復の欠損を代替する形で働く組換え修復には機能しない。

(6) SGS1 はゲノムの維持において独自の経路で機能しているわけではない

これらの結果を踏まえて SGS1 の機能について考察してきたが、これをまとめると以下の様になる (図 IV-6)。

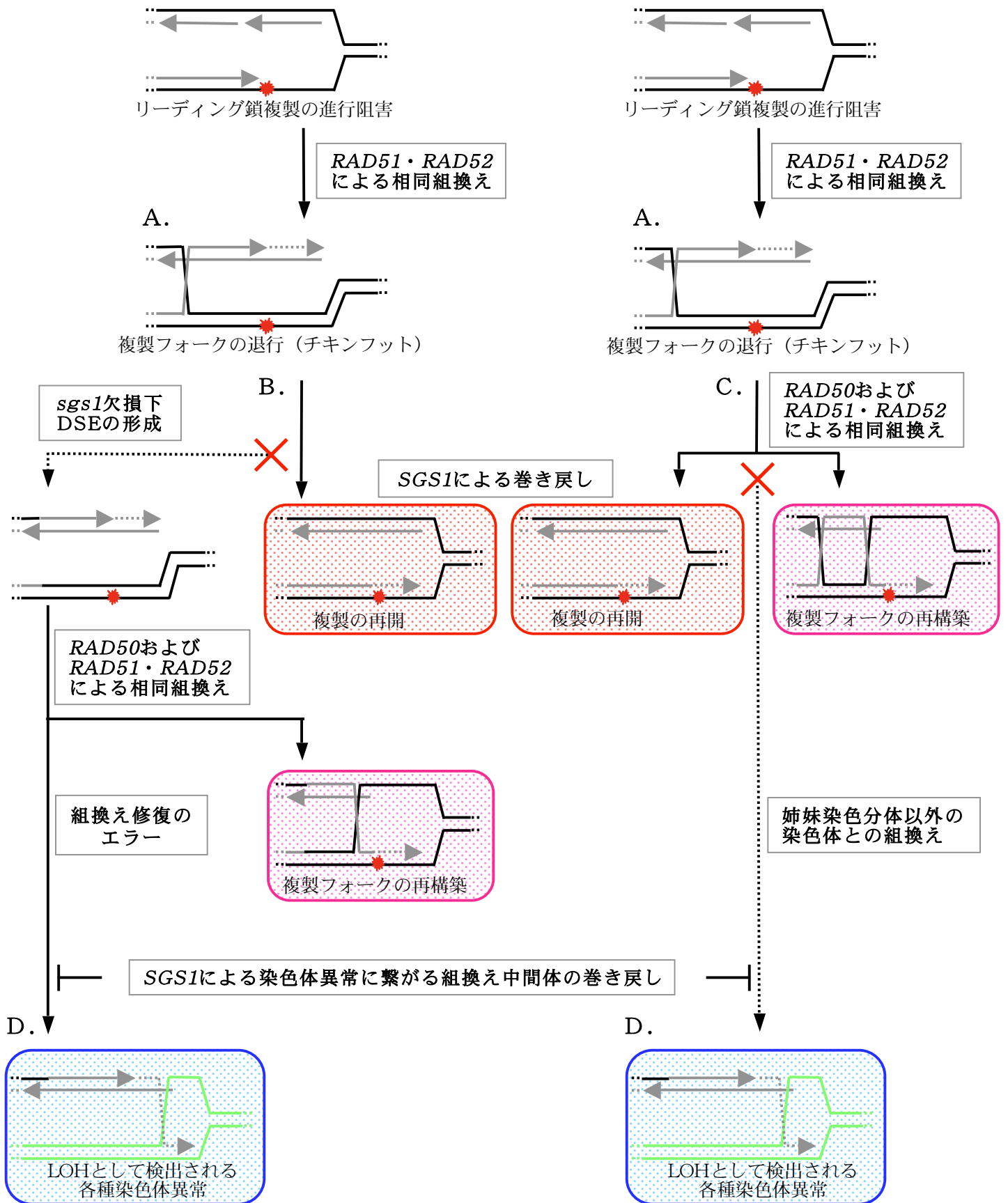
[1] 本研究における *sgs1* 欠損株の解析結果は、チキンフットの巻き戻しに RecQ 型ヘリカーゼが機能するとしたモデルと一致するものであった。しかしながら、

SGS1 は組換え修復の下位で機能することから、「フォークの退行」は独自に働くゲノム維持機構と言うよりは、リーディング鎖側の DNA 傷害に際して組換え修復が始まることにより生じた構造（チキンフット）であり（図 IV-6A）、このチキンフットの巻き戻しに SGS1 が機能していることが考えられた。

[2] SGS1 と RAD50 との間には代替関係が見られることより、①SGS1 が欠損した際にはチキンフットから DSE が生じて RAD50 に依存する組換え修復が働く（図 IV-6B）、あるいは、②チキンフット内の DSE から RAD50 依存性の組換え修復が働くことで、SGS1 と RAD50 が互いに代替し合える（図 IV-6C）との2つの場合が考えられた。sgs1 欠損によって LOH として検出される様な染色体異常・再編が誘発されることに関して、2つのモデルではそれぞれ若干その発生のメカニズムが異なる。染色体異常・再編は、①（図 IV-6B）の場合、チキンフットの巻き戻しが出来ないことにより HJ の解離による DSE が増大し、結果として DSE の組換え修復に伴うエラーが生じる機会が増加したものである。②（図 IV-6C）の場合は、RAD50 が完全には sgs1 欠損を代替できないため、一部の姉妹染色分体間の組換えが損なわれることになり、RAD52・RAD51 依存的にそれ以外のアリル間や異所性の相同組換え反応によって DSE の修復が行われた結果によるものである。rad50 欠損が SGS1 で代替される場合も同様に説明できる。この2つのモデルは必ずしも相互に排他的と考える必要はなく、sgs1 欠損下で RAD50 は図 IV-6B もしくは C のどちらにも機能しているかもしれない。いずれのモデルにおいても、SGS1 はチキンフットの巻き戻しをすることで、また、RAD50 は DSE（それが HJ の解離によるものであれ、チキンフット内のものであれ）を姉妹染色体間の組換えで修復することで、ゲノムの安定性に寄与しているのだと考えられる。

[3] また、SGS1・RAD50 共に、複製後修復の欠損を代替する形で働く組換え修復には機能しないことについては、次の2つの可能性が考えられた。①複製後修復が欠損した場合にはリーディング鎖側においても DSG が形成されると考える場合と②複製後修復が欠損した場合に生じるチキンフットには、構造的に SGS1 や RAD50 が機能し難いとの場合である。この2つの可能性は [2] と関連して考えなければならない。①は [2] のいずれの場合でも無理なく説明できるが、②は [2] -②の場合のみを想定している。これは、[2] -①の場合、複製後修復欠損下で生じるフリーの DSE に対して RAD50 が作用できないことは想定しにくいいためである。

[4] SGS1 の欠損によって、LOH として検出される染色体再編の中でも、特に、転座や不等交叉、あるいは染色体喪失を伴う様なアリル間の組換えを誘発する傾向が見られる点に関して、SGS1 がこれらを引き起こす様な組換え反応を抑制している可能性も考えられる（図 IV-6D）。転座や不等交叉を生じる異所性組換えは、殆どがゲノム上に散在する Ty 等の繰り返し配列で生じている。これらの相同配列は完全には同一でないため、鎖交換によって形成されるヘテロ二重鎖には対合していない部分がある様な、言わば「不安定な組換え中間体」を生じる。SGS1 はこの「不



図IV-6 SGS1および組換え修復によるゲノムの維持

DNA損傷を❄で、二本鎖DNAを黒の実線で示した。また、新生鎖を灰色の矢印で、他の染色体の二本鎖DNAを緑の実線で示した。

安定な組換え中間体」を巻き戻して解消することにも関与しているかもしれない。染色体喪失を伴う様なアレル間の組換えに関しても、その発生メカニズムは定かではないものの、染色体喪失を引き起こすタイプの組換え反応の中間体を *SGS1* が巻き戻すことで解消しているのかもしれない。

以上が本研究で得られた知見のまとめである。本研究の解析結果をもとに *SGS1* の作用点や *RAD50* との相互作用、組換え修復や複製後修復と言ったゲノムの維持に関わる機構との関係について考察してきた。*RecQ* 型ヘリカーゼである *SGS1* が、停止した複製フォークの退行により形成されたチキンフットの巻き戻しに機能するとのモデルに立脚することで、上記の様に *SGS1* とゲノム維持に関わる複数の因子との関係について、分子機序の点から理解を深めることができた。

しかし、*SGS1* の機能について、今回述べてきた考察の限りにおいても、全てが明らかとなった訳ではなく、今後検討すべき余地が残されていることも事実である。例えば、今回 *SGS1* と *RAD50* との関係から、2つのモデルを提示した（上記 [2] -①と②）。これらのモデルの違いは、①では *SGS1* の欠損が *RAD50* によって一方的に代替されるのに対して、②では *SGS1* と *RAD50* が相互に代替可能であることである。この点に関しては、例えば *sgs1* 欠損株において *RAD50* を、反対に *rad50* 欠損株において *SGS1* を過剰発現させることで、LOH の発生が部分的にでも抑制できるのかを見るアプローチで明らかに出来るかもしれない。ただし、Rad50p は単独で機能する訳ではなく、Mre11p、Xrs2p と複合体を形成して機能するため、これらを同時に過剰発現させることに関して、技術的な検討の余地があると考えられる。また、複製後修復と *SGS1* や *RAD50* の関係についても、2つの状況が考えられた（上記 [3] -①と②）。複製後修復が欠損した場合、②では *SGS1* では巻き戻せないチキンフットが形成されると考え、①ではチキンフットは形成されず、DSG が形成されるとするものである。この点に関しては、細胞内で生じる DNA 損傷や、DNA 複製機構の様式、さらには複製装置と複製後修復との機能的な関係等も観点に入れたアプローチが必要であると考えられる。これらの点については、様々なグループにより精力的に解析が進められている段階であり、その概要が明らかとなるには、さらなる研究の進展が必要であると考えられる。

また、ゲノムの維持に関わる様々な機構のネットワークにおいて、*SGS1* がどのような役割を果たしているのかについても、今後さらに解析を進める予定である。最近、*SGS1* との二重欠損により合成致死を示す遺伝子について、大規模なスクリーニングが行われ、複数の遺伝子が同定された (Ooi et al. 2003; Tong et al. 2001)。このことは、*SGS1* と関連しながらゲノムの維持に働いている因子が、これまで述べてきたもの以外にも多数存在することを意味している。これらの遺伝子は既知のものや機能が未同定のもの等、様々であるが、既知のものに関しては、その多くが DNA の複製や修復、組換え等、染色体の複製や維持に何らかの形で関わっていると考えられるものであった。これらの遺伝子は、*SGS1* の欠損時に何らかの形で *SGS1* の機能を代替していると考えられるが、その機能や活性が明らかとなってい

ないものも多い。このことは、これまでに未だ知られていないゲノムの維持機構が存在することを示唆しているのかもしれない。そこで、これらの遺伝子がゲノムの維持にどのように関わっているのかを LOH 解析により明らかにすることで、SGS1 の機能や SGS1 が関与する DNA 傷害の実態について、より詳細に解明する手がかりが得られることが期待される。さらには、これらの研究を通じて、ゲノムを維持する機構の全体像や、ゲノムの不安定化要因である DNA 傷害の実態についての詳細が明らかになることが期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり、原核生物分子遺伝学講座 真木寿治教授には懇切丁寧な御指導と非常に有意義な討論を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

また、同講座の秋山昌広助教授、真木智子助手、中嶋淑美秘書並びに諸先輩方には、本研究に関する有意義な論議に加え、研究環境の整備等への御尽力に対し、御礼申し上げます。

本研究の指導のみならず、日夜叱咤激励し忍耐強く見守って下さった梅津桂子助手に、深く感謝するとともに心から謝意を捧げます。

また、御助言のみならず、温かい励ましの言葉を頂いた平岡美奈先輩、渡辺圭一先輩、吉田純平先輩、中磯和敏氏、ならびに原核生物分子遺伝学講座の学生の皆様に、深く感謝致します。

プラスミド YCp1305 を分与して下さった東北大学大学院薬学研究科遺伝子薬学分野の榎本武美教授に、この場を借りて御礼申し上げます。

また、プラスミド pU6H2MYC、pSH62、pSH63、および *saccharomyces genome deletion project* で作製された *sgs1Δ::kanMX* 株を分与して下さった東京工業大学の白髭克彦助教授に、この場を借りて御礼申し上げます。

最後に、今日に至るまで精神的かつ物理的に支えてきてくれた私の家族に深く感謝します。

参考文献

Ajima, J., Umezu, K. and Maki, H. (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 of both events during mitotic growth. *Mutat Res*, 504, 157-172.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1994) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons., New York, NY.

Boeke, J.D., Eichinger, D.J. and Natsoulis, G. (1991) Doubling Ty1 element copy number in *Saccharomyces cerevisiae*: host genome stability and phenotypic effects. *Genetics*, 129, 1043-1052.

Brabant, A.J.v., Stan, R. and Ellis, N.A. (2000) DNA Helicases, Genomic Instability, and Human Genetic Disease. *Annu Rev. Genomics Hum. Genet.*, 1, 409-459.

Bressan, D.A., Baxter, B.K. and Petrini, J.H. (1999) The Mre11-Rad50-Xrs2 protein complex facilitates homologous recombination-based double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 19, 7681-7687.

Bressan, D.A., Olivares, H.A., Nelms, B.E. and Petrini, J.H. (1998) Alteration of N-terminal phosphoesterase signature motifs inactivates *Saccharomyces cerevisiae* Mre11. *Genetics*, 150, 591-600.

Broomfield, S., Hryciw, T. and Xiao, W. (2001) DNA postreplication repair and mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res*, 486, 167-184.

Cromie, G.A., Connelly, J.C. and Leach, D.R. (2001) Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans. *Mol Cell*, 8, 1163-1174.

D'Amours, D. and Jackson, S.P. (2002) The Mre11 complex: at the crossroads of DNA repair and checkpoint signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 317-327.

Davey, S., Han, C.S., Ramer, S.A., Klassen, J.C., Jacobson, A., Eisenberger, A., Hopkins, K.M., Lieberman, H.B. and Freyer, G.A. (1998) Fission yeast *rad12⁺* regulates cell cycle checkpoint

control and is homologous to the Bloom's syndrome disease gene. *Mol Cell Biol*, 18, 2721-2728.

De Antoni, A. and Gallwitz, D. (2000) A novel multi-purpose cassette for repeated integrative epitope tagging of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 246, 179-185.

Doe, C.L., Dixon, J., Osman, F. and Whitby, M.C. (2000) Partial suppression of the fission yeast *rqh1* phenotype by expression of a bacterial Holliday junction resolvase. *Embo J*, 19, 2751-2762.

Franchitto, A. and Pichierri, P. (2002) Protecting genomic integrity during DNA replication: correlation between Werner's and Bloom's syndrome gene products and the MRE11 complex. *Hum Mol Genet*, 11, 2447-2453.

Frei, C. and Gasser, S.M. (2000) The yeast Sgs1p helicase acts upstream of Rad53p in the DNA replication checkpoint and colocalizes with Rad53p in S-phase-specific foci. *Genes Dev*, 14, 81-96.

Game, J.C. and Mortimer, R.K. (1974) A genetic study of x-ray sensitive mutants in yeast. *Mutat Res*, 24, 281-292.

Gangloff, S., McDonald, J.P., Bendixen, C., Arthur, L. and Rothstein, R. (1994) The yeast type I topoisomerase Top3 interacts with Sgs1, a DNA helicase homolog: a potential eukaryotic reverse gyrase. *Mol Cell Biol*, 14, 8391-8398.

Gangloff, S., Soustelle, C. and Fabre, F. (2000) Homologous recombination is responsible for cell death in the absence of the Sgs1 and Srs2 helicases. *Nat Genet*, 25, 192-194.

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. and Oliver, S.G. (1996) Life with 6000 genes. *Science*, 274, 546, 563-547.

Gueldener, U., Heinisch, J., Koehler, G.J., Voss, D. and Hegemann, J.H. (2002) A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res*, 30, e23.

Higgins, N.P., Kato, K. and Strauss, B. (1976) A model for replication repair in mammalian cells. *J Mol Biol*, 101, 417-425.

Higuchi, K., Katayama, T., Iwai, S., Hidaka, M., Horiuchi, T. and Maki, H. (2003) Fate of DNA

replication fork encountering a single DNA lesion during oriC plasmid DNA replication in vitro. *Genes Cells*, 8, 437-449.

Hiraoka, M., Watanabe, K., Umezu, K. and Maki, H. (2000) Spontaneous loss of heterozygosity in diploid *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Genetics*, 156, 1531-1548.

Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G. and Jentsch, S. (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature*, 419, 135-141.

Hopfner, K.P., Craig, L., Moncalian, G., Zinkel, R.A., Usui, T., Owen, B.A., Karcher, A., Henderson, B., Bodmer, J.L., McMurray, C.T., Carney, J.P., Petrini, J.H. and Tainer, J.A. (2002) The Rad50 zinc-hook is a structure joining Mre11 complexes in DNA recombination and repair. *Nature*, 418, 562-566.

Ivanov, E.L., Korolev, V.G. and Fabre, F. (1992) XRS2, a DNA repair gene of *Saccharomyces cerevisiae*, is needed for meiotic recombination. *Genetics*, 132, 651-664.

Johnson, R.E., Prakash, S. and Prakash, L. (1999) Efficient bypass of a thymine-thymine dimer by yeast DNA polymerase, Poleta. *Science*, 283, 1001-1004.

Johnson, R.E., Prakash, S. and Prakash, L. (1999) Requirement of DNA polymerase activity of yeast Rad30 protein for its biological function. *J Biol Chem*, 274, 15975-15977.

Kagawa, W., Kurumizaka, H., Ikawa, S., Yokoyama, S. and Shibata, T. (2001) Homologous pairing promoted by the human Rad52 protein. *J Biol Chem*, 276, 35201-35208.

Kannouche, P.L., Wing, J. and Lehmann, A.R. (2004) Interaction of human DNA polymerase eta with monoubiquitinated PCNA: a possible mechanism for the polymerase switch in response to DNA damage. *Mol Cell*, 14, 491-500.

Karow, J.K., Constantinou, A., Li, J.L., West, S.C. and Hickson, I.D. (2000) The Bloom's syndrome gene product promotes branch migration of Holliday junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 6504-6508.

Kitao, S., Shimamoto, A. and Furuichi, Y. (2003) Molecular Biology of Rothmund-Tomson Syndrome. In *Chromosomal Instability and Aging*, Hisama, M.F., Weissman, M.S. and Martin, M.G., eds. (New York: Marcel Dekker, Press), pp. 223-244.

Kusano, K., Berres, M.E. and Engels, W.R. (1999) Evolution of the RECQ family of helicases: A drosophila homolog, Dmblm, is similar to the human bloom syndrome gene. *Genetics*, 151, 1027-1039.

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

Le, S., Moore, J.K., Haber, J.E. and Greider, C.W. (1999) *RAD50* and *RAD51* define two pathways that collaborate to maintain telomeres in the absence of telomerase. *Genetics*, 152, 143-152.

Malkova, A., Ivanov, E.L. and Haber, J.E. (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.

Morrison, A., Christensen, R.B., Alley, J., Beck, A.K., Bernstine, E.G., Lemontt, J.F. and Lawrence, C.W. (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.

Murray, J.M., Lindsay, H.D., Munday, C.A. and Carr, A.M. (1997) Role of *Schizosaccharomyces pombe* RecQ homolog, recombination, and checkpoint genes in UV damage tolerance. *Mol Cell Biol*, 17, 6868-6875.

Nelson, J.R., Lawrence, C.W. and Hinkle, D.C. (1996) Thymine-thymine dimer bypass by yeast DNA polymerase zeta. *Science*, 272, 1646-1649.

Newlon, C.S., Lipchitz, L.R., Collins, I., Deshpande, A., Devenish, R.J., Green, R.P., Klein, H.L., Palzkill, T.G., Ren, R.B., Synn, S. and et al. (1991) Analysis of a circular derivative of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome III: a physical map and identification and location of ARS elements. *Genetics*, 129, 343-357.

Oliver, S.G., van der Aart, Q.J., Agostoni-Carbone, M.L., Aigle, M., Alberghina, L., Alexandraki, D., Antoine, G., Anwar, R., Ballesta, J.P., Benit, P. and et al. (1992) The complete DNA sequence of yeast chromosome III. *Nature*, 357, 38-46.

Onoda, F., Seki, M., Miyajima, A. and Enomoto, T. (2000) Elevation of sister chromatid exchange in *Saccharomyces cerevisiae* *sgs1* disruptants and the relevance of the disruptants as a

system to evaluate mutations in Bloom's syndrome gene. *Mutat Res*, 459, 203-209.

Onoda, F., Seki, M., Miyajima, A. and Enomoto, T. (2001) Involvement of *SGS1* in DNA damage-induced heteroallelic recombination that requires *RAD52* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, 264, 702-708.

Ooi, S.L., Shoemaker, D.D. and Boeke, J.D. (2003) DNA helicase gene interaction network defined using synthetic lethality analyzed by microarray. *Nat Genet*, 35, 277-286.

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

Peng, H. and Nazthan, A.E. (2003) Bloom Syndrome: Genetic, Cellular, and Molecular Features as Compared to Werner Syndrome. In *Chromosomal Instability and Aging*, Hisama, M.F., Weissman, M.S. and Martin, M.G., eds. (New York: Marcel Dekker, Press), pp. 187-222.

Rose, M.D., Winston, F. and Hieter, P. (1990) *Methods in Yeast Genetics: A Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2nd Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Seigneur, M., Bidnenko, V., Ehrlich, S.D. and Michel, B. (1998) RuvAB acts at arrested replication forks. *Cell*, 95, 419-430.

Signon, L., Malkova, A., Naylor, M.L., Klein, H. and Haber, J.E. (2001) Genetic requirements for *RAD51*- and *RAD54*-independent break-induced replication repair of a chromosomal double-strand break. *Mol Cell Biol*, 21, 2048-2056.

Sikorski, R.S. and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 122, 19-27.

Stewart, E., Chapman, C.R., Al-Khodairy, F., Carr, A.M. and Enoch, T. (1997) *rqh1*⁺, a fission yeast gene related to the Bloom's and Werner's syndrome genes, is required for reversible S phase arrest. *Embo J*, 16, 2682-2692.

Sung, P., Trujillo, K.M. and Van Komen, S. (2000) Recombination factors of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutat Res*, 451, 257-275.

Surralles, J., Jackson, S.P., Jasin, M., Kastan, M.B., West, S.C. and Joenje, H. (2004) Molecular cross-talk among chromosome fragility syndromes. *Genes Dev*, 18, 1359-1370.

Tong, A.H., Evangelista, M., Parsons, A.B., Xu, H., Bader, G.D., Page, N., Robinson, M., Raghibizadeh, S., Hogue, C.W., Bussey, H., Andrews, B., Tyers, M. and Boone, C. (2001) Systematic genetic analysis with ordered arrays of yeast deletion mutants. *Science*, 294, 2364-2368.

Ulrich, H.D. and Jentsch, S. (2000) Two RING finger proteins mediate cooperation between ubiquitin-conjugating enzymes in DNA repair. *Embo J*, 19, 3388-3397.

Umezu, K., Hiraoka, M., Mori, M. and Maki, H. (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.

Umezu, K., Nakayama, K. and Nakayama, H. (1990) *Escherichia coli* RecQ protein is a DNA helicase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 5363-5367.

Waters, R., Regan, J.D. and German, J. (1978) Increased amounts of hybrid (heavy/heavy) DNA in Bloom's syndrome fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*, 83, 536-541.

Watt, P.M., Hickson, I.D., Borts, R.H. and Louis, E.J. (1996) *SGS1*, a homologue of the Bloom's and Werner's syndrome genes, is required for maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 144, 935-945.

Wu, L., Davies, S.L., Levitt, N.C. and Hickson, I.D. (2001) Potential role for the BLM helicase in recombinational repair via a conserved interaction with *RAD51*. *J Biol Chem*, 276, 19375-19381.

Yoshida, J., Umezu, K. and Maki, H. (2003) Positive and negative roles of homologous recombination in the maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 164, 31-46.

吉田純平, 2003 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.
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

Zenvirth, D., Arbel, T., Sherman, A., Goldway, M., Klein, S. and Simchen, G. (1992) Multiple sites for double-strand breaks in whole meiotic chromosomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, 11, 3441-3447.