

[別紙 1]

## 論文内容の要旨

申請者氏名 安 島 潤

申請者が所属する研究室では、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が開発され、ゲノムを維持する機構の解析が行われてきた。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になっている。本研究では、ゲノムの安定な維持に関わる因子の一つとして RecQ helicase family に着目し、そのゲノム維持における役割を遺伝学的な解析から明らかにすることを目的としている。

RecQ helicase family とは大腸菌 recQ 遺伝子と相同な DNA helicase motif を持つ遺伝子群の総称であり、ヒトにおいては、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知られている。これらの患者の細胞が染色体不安定性や S 期の遅延を示すことや、出芽酵母で唯一の RecQ helicase family の遺伝子である SGS1 遺伝子が 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。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、まず最初に二倍体出芽酵母での染色体異常の解析系を用いて SGS1 の欠損により誘発されるゲノムの変化を解析している。その結果、sgs1 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 倍程度に上昇していることが分かった。さらに、それらの中でも、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察された。SGS1 の欠損により相同組換えの頻度が上昇したことは、SGS1 が相同組換えを抑制する様に機能していることが示唆された。しかし、異所性の相同組換えが特に誘発されていたことから、SGS1 は組換えの反応自体にも何らかの関与を持つことも示唆された。

次に、申請者はゲノム維持における SGS1 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、SGS1 と組換え修復に関与する RAD50、RAD51、RAD52 との多重欠損で誘発されるゲノムの変化を解析している。また、SGS1 と複製後修復関連遺伝子 RAD18 との関係についても解析を行っている。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これまで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。本論文では、このモデルを考慮した上で、今回の解析から判明した SGS1 とその他の修復機構の関係についての考察を行っている。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図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。申請者は、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察している。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察している。申請者はこれらを総合して、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推測している。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 が作用しないことも予測している。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 安 島 潤

染色体 DNA の安定で正確な伝達・維持は細胞増殖において最も重要な要件である。そのために、生物は DNA 複製や分配を正確に行う機構や細胞周期制御の機構を発達させている。これらに加えて、DNA 複製を阻害する染色体 DNA 上に生じた損傷を修復する機構や DNA 損傷応答の働きがほとんどの生物に備わっており、細胞内外の要因により恒常的に発生する DNA 損傷の脅威に有効な防御となっている。これらの染色体維持機構が破綻した場合には、細胞増殖の異常や細胞死、さらには突然変異や染色体異常の発生頻度が上昇する。これまでの研究から、このような遺伝的不安定性は発がんや老化の主たる原因となっていることが示されている。しかしながら、染色体維持の分子機構は様々な経路や段階から構成され、きわめて複雑であるために、不明な点が多い。本研究は出芽酵母二倍体細胞を材料として、DNA 複製の最中に生じる DNA 傷害を回避する主要な二つの経路、組換え修復と複製後修復の染色体維持における役割の解明と、両者の経路に密接に作用している RecQ 型 DNA ヘリカーゼの役割これらの経路の中で論じたものであり、以下の成果をあげている。

- 1) 出芽酵母の唯一の RecQ 型 DNA ヘリカーゼをコードする *SGS1* 遺伝子の欠失株では染色体喪失および様々な種類の染色体再編が生じていることを見だし、真核生物において RecQ 型ヘリカーゼは広範な種類の染色体異常の発生を抑制していることを明らかにした。
- 2) 各種の組換え修復経路および複製後修復に関与する遺伝子との二重変異株を利用して、*SGS1* 遺伝子の染色体維持の役割を遺伝学的に解析し、*Sgs1* ヘリカーゼは組換え修復の主要な経路であると考えられる複製フォーク退行に関与することを支持する証拠を得た。複製後修復とは独立に働いていることも明らかにした。
- 3) 上記の二重変異株で生じる染色体異常の詳細な解析から、DNA 複製傷害には組換え修復経路および複製後修復のどちらかでしか回避できないものが存在することを示した。

以上のように、本論文は出芽酵母 *Sgs1* ヘリカーゼの染色体維持の役割に関して、組換え修復と複製後修復の経路との関係を詳細に明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。