

出芽酵母における染色体の複製開始制御異常に対する  
脆弱部位～rRNA 遺伝子のクラスター領域（rDNA 領域）～の解析

井手 聖

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18年11月1日提出

# 目次

第1章	序論	
1節	DNA複製とバックアップシステム	3
2節	複製開始制御の仕組みと役割	5
3節	複製開始制御の破綻とそのバックアップとしてのチェックポイント機構	7
4節	極度の不安定性を示す一本の染色体	14
5節	高温耐性を獲得した生残菌の出現	17
第2章	材料と方法	19-31
1節	菌株	
2節	プラスミドDNA	
3節	試薬と培地	
4節	DNAの調製	
5節	アガロースゲル電気泳動	
6節	形質転換法	
7節	PCR	
8節	DNA塩基配列の決定	
9節	菌株の取り扱い	
10節	酵母細胞への <i>orc2-1</i> 変異の導入	
11節	FACS解析	
12節	Rad53pのリン酸化の検出	
13節	Rad53pの自己リン酸化活性の測定	
14節	パルスフィールドゲル電気泳動	
15節	サザンハイブリダイゼーション	
16節	スポット試験	
17節	高温生残菌の採取方法	
18節	rDNA領域を短縮する方法	
19節	rDNA領域のコピー数の決定	
20節	Orc2pの量の測定	
21節	プラスミド喪失頻度の測定	
22節	$\alpha$ -ファクターを用いた細胞周期の同調法	
23節	二次元ゲル電気泳動法	
24節	染色体上のrRNA遺伝子の転写を抑制する方法	

第3章	結果 (第一部)	
1節	<i>orc2-1</i> 変異株における高温耐性を獲得した生残菌の出現	32
2節	rDNA 領域のコピー数が減少すると <i>orc</i> 変異株の温度感受性が抑制される	34
3節	rDNA 領域のコピー数が減少すると、 <i>orc</i> 変異株では、チェックポイントが活性化されにくくなる	39
4節	rDNA 領域の短縮によって <i>ORC2</i> の機能欠損が相補された可能性の検証	42
5節	<i>orc2-1</i> 変異株では rDNA 領域で特異的に複製遅延が起きており、 rDNA 領域が短縮すると、その遅延が緩和される	44
6節	<i>orc2-1</i> 変異が rDNA 領域上の複製起点の活性に与える影響	46
第4章	考察 (第一部)	
1節	rDNA 領域で DNA 損傷が高頻度に発生する	51
2節	rDNA 領域で生じる DNA 損傷の実態	51
3節	rDNA 領域内での複製開始制御	54
4節	rDNA 領域の脆弱性と DNA 損傷チェックポイントの関係	55
5節	今後の展望と課題	56
第5章	結果 (第二部)	
1節	rDNA 領域が短縮すると、 一般的に DNA 損傷チェックポイントの感度が低下するのか？	58
2節	種々の変異原に対する rDNA 短縮株の感受性の検討	61
3節	DNA 傷害による rRNA 転写の阻害	62
第6章	考察 (第二部)	
1節	rDNA 短縮株のアルキル化剤に対する感受性	66
2節	変異原が転写に与える影響	66
3節	rRNA の転写密度とアルキル化剤に対する細胞の感受性	67
4節	rDNA 領域が 100 コピー以上に増幅された起源	67
第7章	謝辞	70
第8章	参考文献	71-76

## 序論

### 1. DNA 複製とバックアップシステム

細胞の遺伝情報は安定に維持され、次世代に伝えられる。娘細胞への遺伝情報の伝達は、①複製、②分配、③細胞分裂の3つのステップに分けられ、それぞれの事象は非常にダイナミックな作業である。とりわけ、遺伝情報を担う DNA の複製は、古くから精力的に研究が行われ、その複製システムに関わる様々な因子が同定されてきた。遺伝情報を複製する酵素 (DNA ポリメラーゼ)、複製反応が開始される部位 (複製起点)、複製起点に呼び込まれ、複製開始反応を誘因する因子、複製開始後、両方向に進む Y 字型の DNA 構造 (複製フォーク) が形成されること、二本鎖は異なる様式によって複製されること (リーディング鎖、ラギング鎖)、などが挙げられる (Bell and Dutta 2002)。

しかし、上記に列挙した複製システムの基本構成因子だけでは、DNA 複製を遂行するのに十分ではない。なぜなら、DNA 複製過程は、常に妨害される危機に直面しているからである。細胞内の DNA は、内的、または、外的な要因により、絶えず塩基に化学的な修飾を受けたり、リン酸骨格が切断されるなど、傷つけられている。そうした損傷は、さまざまな修復機構によって、絶えず直されているが、傷つき、直され、傷つき、直されることの繰り返しによって、保たれている安定性では、当然、損傷が直されないまま残ることもあり、それによって、複製プロセスが妨げられる。また、DNA 損傷だけが複製の妨害因子ではない。反復配列により構成されるパルンドローム構造、二本鎖を解くことによって生じるトポロジカルなストレス、さらに、ゲノム上に存在する転写装置などの他のタンパク質やヘテロクロマチン構造などに代表される硬い特殊な高次構造などが実際に複製プロセスを妨げることが示されている (Rothstein et al., 2002, Fig.1)。

複製が妨害された時に備えて、細胞は、いくつもの複製をバックアップする機構をカスタマイズしている (Fig.1)。そのバックアップ機構の主要なものとして、チェックポイント応答、組み換え反応が挙げられる。これら2つのバックアップ機構がトリガーする契機は、高速で (約 100bp/s) 進む複製装置の進行が妨げられた時、言い換えると、複製フォークの進行が不自然に阻害された時である。そういった状況に陥った時に、チェックポイント応答は、細胞周期の停止のみならず、阻害された複製フォークを安定化させたり、修復機構を活性化したりする (Elledge et al., 1996, Melo et al., 2002, Nyberg et al., 2002)。一方、組み換え反応は、姉妹染色体分体上の相同配列を用いて、止まった複製フォークの進行を再スタートさせたり、崩壊してしまったフォークを再構成する役割を果たす (Asai et al., 1994)。この2つの機構が共役してはじめて、複製フォークは、その前に立ちほだかる困難を乗り越えることができるのである。こうしたバックアップ機構の機能が低下すると、娘細胞に遺伝情報が安定に伝えられなくなり、突然変異が生じる (Kolodner et al., 2002)。ガン患者の 50%以上に、

# 複製フォークの進行を阻害する因子

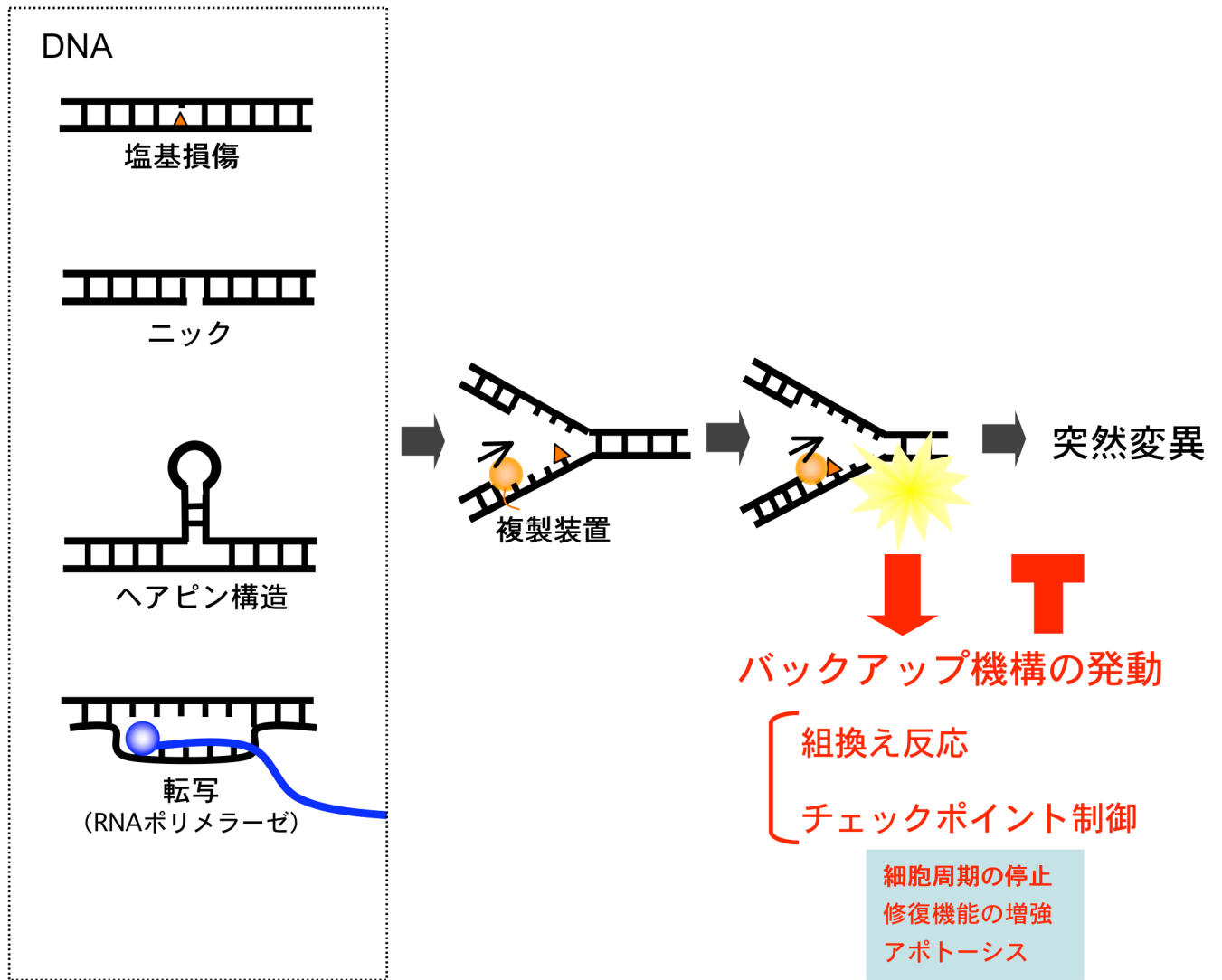


Fig.1. 複製フォークの進行阻害とそのバックアップ機構

点線内に、複製フォークの進行を阻害する代表的なものを列挙した。

これらの阻害因子によって、複製フォークの進行が阻害された時、異常を解消したり、複製フォークを再スタートするのに、組換え反応やチェックポイント制御によるバックアップが必要である。これらのバックアップ機構によって、突然変異の発生頻度は極めて低く抑制されている。

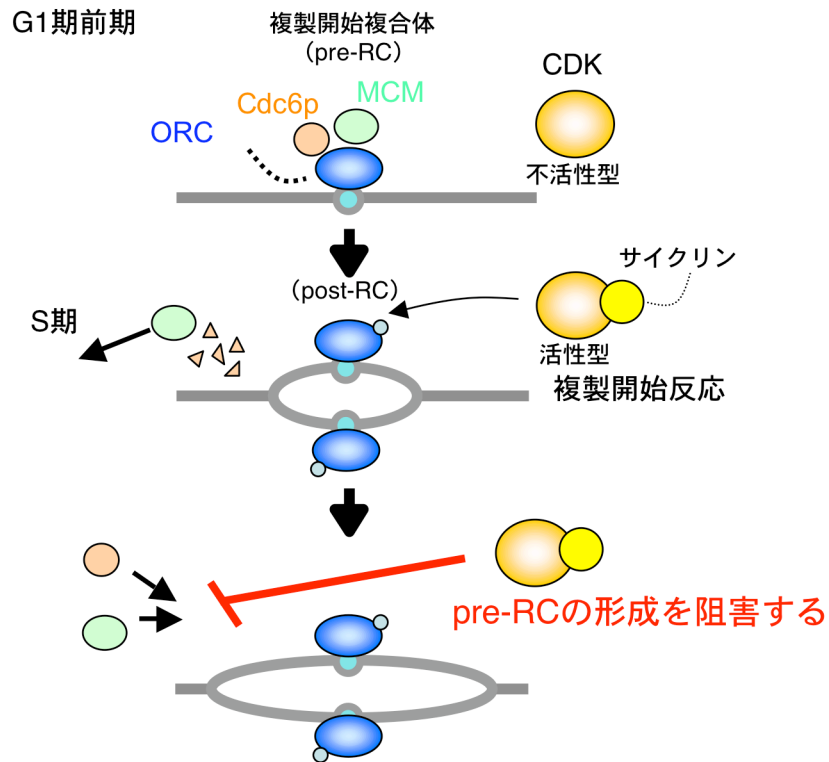
チェックポイント関連タンパクである p53 遺伝子に変異が導入されていることから、バックアップ機構の機能不全は、ヒトのガン化の一因と考えられており、注目を浴びている (Culotta 1993, Harris 1993)。複製システムの基本構成因子とそのバックアップ機構の相互関係を明らかにすることこそが、ここ十年の DNA 複製の分野の一つの重要な課題なのである。

## 2. 複製開始制御の仕組みと役割

DNA 複製はゲノム上に散在する複製起点から始まる。出芽酵母での複製起点は、ARS (Autonomous Replication Sequence) として同定されており、そのコンセンサス配列も正確に決められている (Yamashita et al., 1997, Raghuraman et al., 2002)。それに対して、分裂酵母、ヒトでは、複製起点は、およそ 1 kb 以上の広範囲に及んでおり、AT リッチであるという特徴はあるものの、コンセンサス配列は不明である (Bell 2002)。このように、複製開始のためのシス因子である複製起点は、生物種によって異なるのだが、不思議なことに、複製起点に結合するトランス因子、ORC (OriRecognition Complex) は全ての生物種間において共通である。ORC は複製開始のための足場となるための複合体で、Orc1-6p の六量体から構成される (Bell 2002, Dutta et al., 2002)。出芽酵母を例にとり、ORC を中心とした複製開始の仕組みを説明すると、G1 期では、ORC を土台として、Cdc6p、Mcm2-7p、Cdt1 が複製起点上にリクルートされ、pre-RC (pre-replication complex) が形成される。続いて、S 期に進行すると、S 期サイクリン依存性キナーゼ (CDK) や Cdc7p/dbf4 キナーゼなどによって、pre-RC の構成因子が修飾を受ける (Bell 2002, Dutta et al., 2002)。その結果、様々な因子が呼び込まれ、二本鎖の DNA が解離し、続いて、DNA ポリメラーゼの loading が起こる。

複製開始は、細胞周期の中で S 期に 1 回だけ起きるように制御されている。複製開始反応の際に、CDK の直接、または間接的な働きによって、ORC のリン酸化、Mcm2-7p の核外への排出、Cdc6p の分解の 3 つのイベントが起こることで、ORC 以外の pre-RC の構成員が複製起点から離れ、それ以降、複製起点に ORC だけが結合している状態 (post-RC) になる (Nguyen et al., 2001, Fig.2. 上図)。これにより、S 期で一度、複製開始反応が起こった複製起点では、CDK の活性が低下する次の G1 期初期 (サイクリンが減少する時) になるまで、pre-RC は再度、形成されない。細胞は、このようにして、S 期において、一つの複製起点から複製開始反応が 2 回起こることを予防している。実際に、ORC、Cdc6p、Mcm2-7p、それぞれのアミノ酸の中で、pre-RC の再形成防止に関わる修飾部位に変異を導入すると、一つの複製起点が何度も活性化し、ゲノムの部分的な倍数化や全体の倍数化などの異常が起こることが酵母とヒトの培養細胞の実験で観察されている (Nguyen et al., 2001, Vaziri et al., 2003)。

## 1. 再複製予防機構



## 2. 複製開始のタイミング

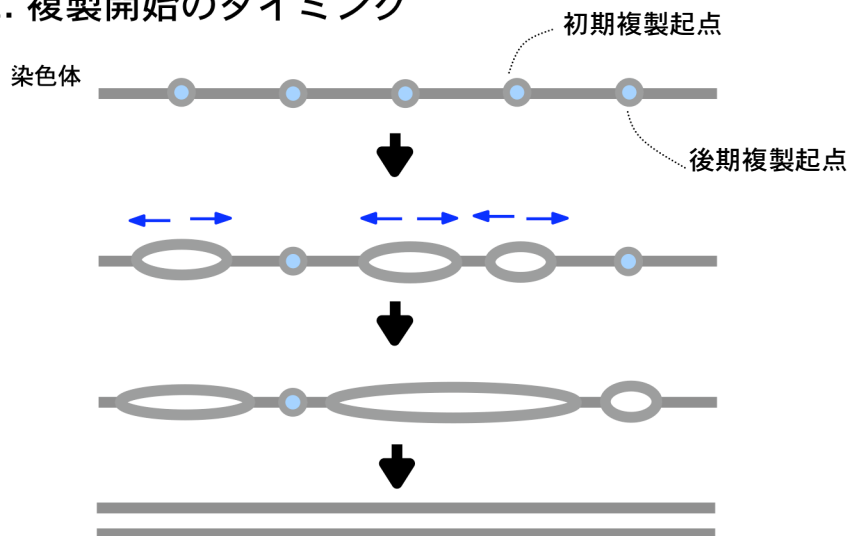


Fig.2. 複製開始制御機構

2つの代表的な複製反応開始の制御機構を記した。一つ目は、S期において、一度活性化した複製起点から、連続して複製開始反応が起きることを防ぐ再複製予防機構である。活性型サイクリン依存性のキナーゼ (CDK) は、ORCのリン酸化、Cdc6pの分解、MCMの核外への移行の3つの分子メカニズムを介して、複製起点上での複製開始複合体 (pre-RC) の形成を阻害する役割を果たす。その働きにより、S期において一度活性化した複製起点に、再度pre-RCが形成されないようになっている。複製起点にpre-RCが形成されるのは、CDKが活性を失っている期間、M期後期～G1前期の一度だけである。二つ目は、S期において、各複製起点が活性化する時期や順序を決める制御である。この制御には、少なからず複製起点付近のクロマチンレベルが関係しており、一般的に、ヘテロクロマチン構造をとっている領域は、活性化されにくく、S期の後期に活性化されたり、活性化されないままである。

もう一つの染色体の複製開始の制御として、S期で活性化される複製起点の順序や頻度の制御が挙げられる (Fig.2 下図)。ゲノム上に多数ある複製起点は、S期における複製開始の時期に応じて、初期複製起点 (early origin)、後期複製起点 (late origin)、また使用頻度が極端に低いものを潜在的複製起点 (dormant origin) と分類することができる (Raghuraman et al., 2002)。この性質は、複製起点周辺のクロマチンレベルの状態によって決まる。early origin は、付近のヒストンがアセチル化修飾を受けることで、オープンな状態になっており、逆に late origin では、付近のヒストンが脱アセチル化されて、閉ざされている状態に保たれている (Vogelauer et al., 2002)。使用頻度の低い dormant origin は、硬いヘテロクロマチン構造を取った染色体末端 (テロメア) などに多数存在している (Raghuraman et al., 2002)。最近では、複製起点に直接結合する ORC も複製起点付近のヒストンの並び方を調節し、複製開始順序の決定に関わっていることもわかってきている (Lipford et al., 2001)。また、こうした複製開始のパターンは、細胞を取り巻く環境の変化に応じて、時として、変わることが知られている。例えば、人為的に、DNA に傷害を与えると、細胞の積極的な作用によって、late origin の活性化が抑制される (Shirahige et al., 1998)。これらのことから、ゲノム全体の複製起点の複製開始制御は、厳格に行われるものではなく、非常に柔軟性に富んだものであり、それによって、染色体の複製過程で起こる不具合に対処していることが想像される。しかし、こうしたゲノム上に多数ある複製起点の使用時期と使用頻度の違いが、実際にどういう意味があり、どのような役割を果たしているのかについては、ほとんどわかっていない。

この節において、2つの複製開始制御について記したが、これ以降、ゲノム全体に散在する複製起点の活性化の順序や頻度を統括的にコントロールする仕組みのことを指して、複製開始制御という用語を使用していく。

### 3. 複製開始制御の破綻とそのバックアップとしてのチェックポイント機構

複製起点全体の統括的な複製開始制御のメカニズムやその役割について不明な点が多いが、この制御が破綻すると、当然、娘細胞に遺伝情報が正確に伝わらなくなる。例えば、活性化する複製起点の数が正常に比べて低下した場合、細胞集団中に染色体喪失や染色体再編などの染色体異常 (突然変異) が生じた細胞が高頻度に出現することが、本研究室も含め、多数の研究室から報告されている (Elbe et al., 1992, Bruschi et al., 1995, Jacobson et al., 2001, Watanabe et al., 2002, Tanaka et al., 2002, Lengronne et al., 2002, Huang et al., 2003)。複製開始制御を破綻させる手段として、pre-RC を構成するタンパク質の温度感受性変異株 (Orc1-6p, Cdc6p, Mcm, Cdt1) を用いたり、サイクリンを過剰発現させることで、CDK を G1 期においても活性化させて、pre-RC の形成を阻害したりする (メカニズムの詳細については、考察の章4節を参照)。また、このような複製開始制御の破綻は、ヒトの腫瘍細胞やガン細胞に



においても、観察されている (Spruck et al., 1999, Ekholm-Reed., 2004, Bartkova et al., 2005)。

本研究室では、pre-RC の構成因子である ORC の 2 つの温度感受性変異株、Orc1p の N 末端付近に 401T→C となる点突然変異を一つ導入した *orc1-4* 変異株、Orc2p の C 末端付近に 1808C→T となる点突然変異を一つ導入した *orc2-1* 変異株を用いた。*orc1-4* 変異株は、奈良先端大の白髭克彦先生 (現、東京工業大学)、*orc2-1* 変異株は、Jasper Rine、Bruce Stillman によって、それぞれ採取されたものである (Bell et al., 1993, Foss et al., 1993, Hori et al., 1996)。高温にシフトすると、ORC の機能が低下し、その結果、複製開始頻度が減少したり、late origin が S 期初期に活性化されたりする。第 3 染色体に組み込まれた *URA3* 遺伝子マーカーの喪失を指標とした染色体異常を検出する系 (Loss Of Heterozygosity) を利用して、この各変異株において、染色体喪失や染色体再編などの染色体異常が高頻度に生じることを示している (Watanabe et al., 2002, Fig.3)。

また、興味深いこととして、複製開始頻度が低下すると、バックアップ機構であるチェックポイント応答、特に DNA 損傷チェックポイントが発動し、修復機能を促進させたり、細胞周期が停止することで、染色体異常の発生を低頻度に抑制していた (Watanabe et al., 2002, Fig.3)。二倍体 *orc1-4* 変異株、一倍体 *orc2-1* 変異株を許容温度で培養した後、温度シフトアップすると (*orc1-4* 変異株の場合 37°C/*orc2-1* 変異株の場合 26°C)、G1 期での停止は起こらず、細胞はゆっくりと S 期に進行し、通常より長い時間をかけて染色体を複製しながら、分裂し続ける。その過程で、細胞集団中には徐々にダンベル形態様の細胞の割合が増加し、細胞周期が G2/M 期で停止する (Fig.4-1.A.B)。出芽酵母の細胞周期チェックポイント機構は、DNA 損傷チェックポイントと DNA 複製停止チェックポイントの 2 つに区分けされており、各経路に専科して働く因子と両方の経路に必要な因子が存在する (Fig4-2)。観察された G2/M 期での停止は、少なからず、DNA 損傷チェックポイント因子の一つ *RAD9* 遺伝子を欠損すると、細胞周期の停止が解除されことから、*RAD9* 遺伝子の働きに依存していた。さらに、非許容温度にシフトした後、*orc1-4* 変異株、*orc2-1* 変異株では、ともに、チェックポイントエフェクターキナーゼである Rad53p のリン酸化が検出され、細胞内でチェックポイントシグナルが伝達されていること確認できた (Fig.4-1.A.B)。このことから、2 つの *orc* 変異株では、ゲノムのどこかで、DNA 損傷が発生していることが示唆される。また、*orc2-1* 変異株では、更に高い温度 (37°C) にシフトすると、複製開始が強く阻害されるため、細胞集団が一度 G1 期に同調した後、一斉に S 期に進行するのだが、その S 期進行と同時に、Rad53p はリン酸化され始める (Fig.4-1.C)。これは、DNA 損傷が、染色体複製の過程において発生していることを強く示唆しており、複製開始制御の乱れが DNA 損傷発生の原因となっていることが推察される。

### 出芽酵母 *orc* 温度感受性変異株 (*orc1-4*, *orc2-1*変異株)

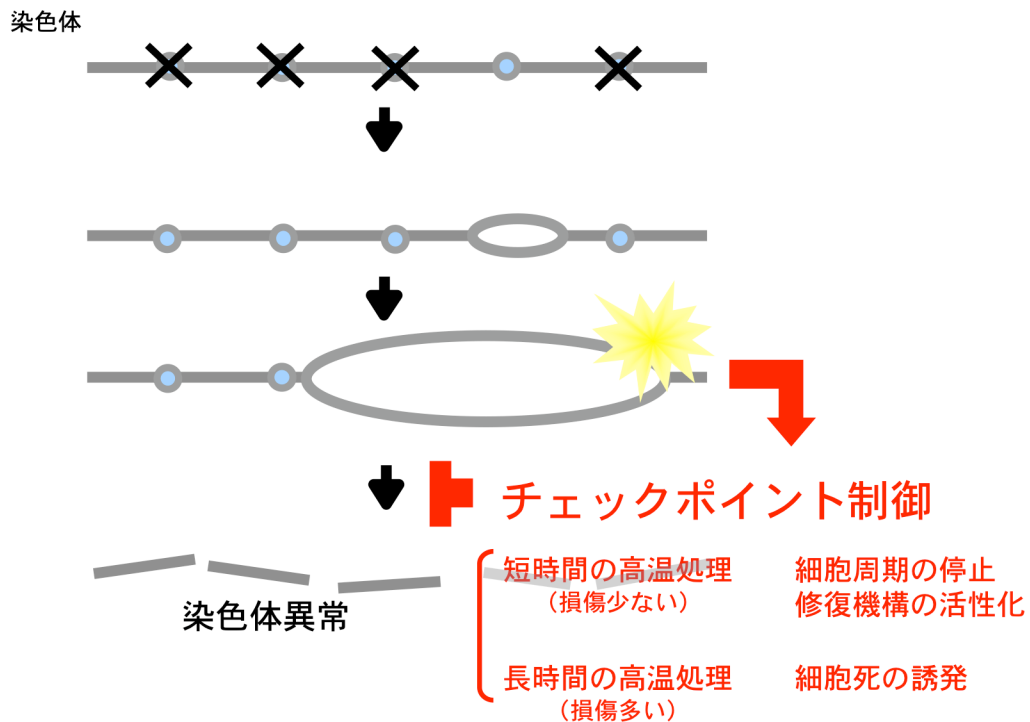


Fig.3. 複製開始制御が乱れた時に誘発するチェックポイント制御の機能

出芽酵母 *orc* 変異株を温度シフトした後に誘発するチェックポイント制御機構は、損傷の量に応じて、異なる2つの仕組みを利用することで、染色体異常の発生を防いでいる。温度シフト後10時間くらいまでは、チェックポイントの働きによって細胞周期が停止し、修復機能が活性化される。一方で、温度シフト10時間以上培養し続けると、細胞周期の停止の解除とともに、チェックポイント依存的な細胞死プログラムが誘発され、異常な細胞が排除される。

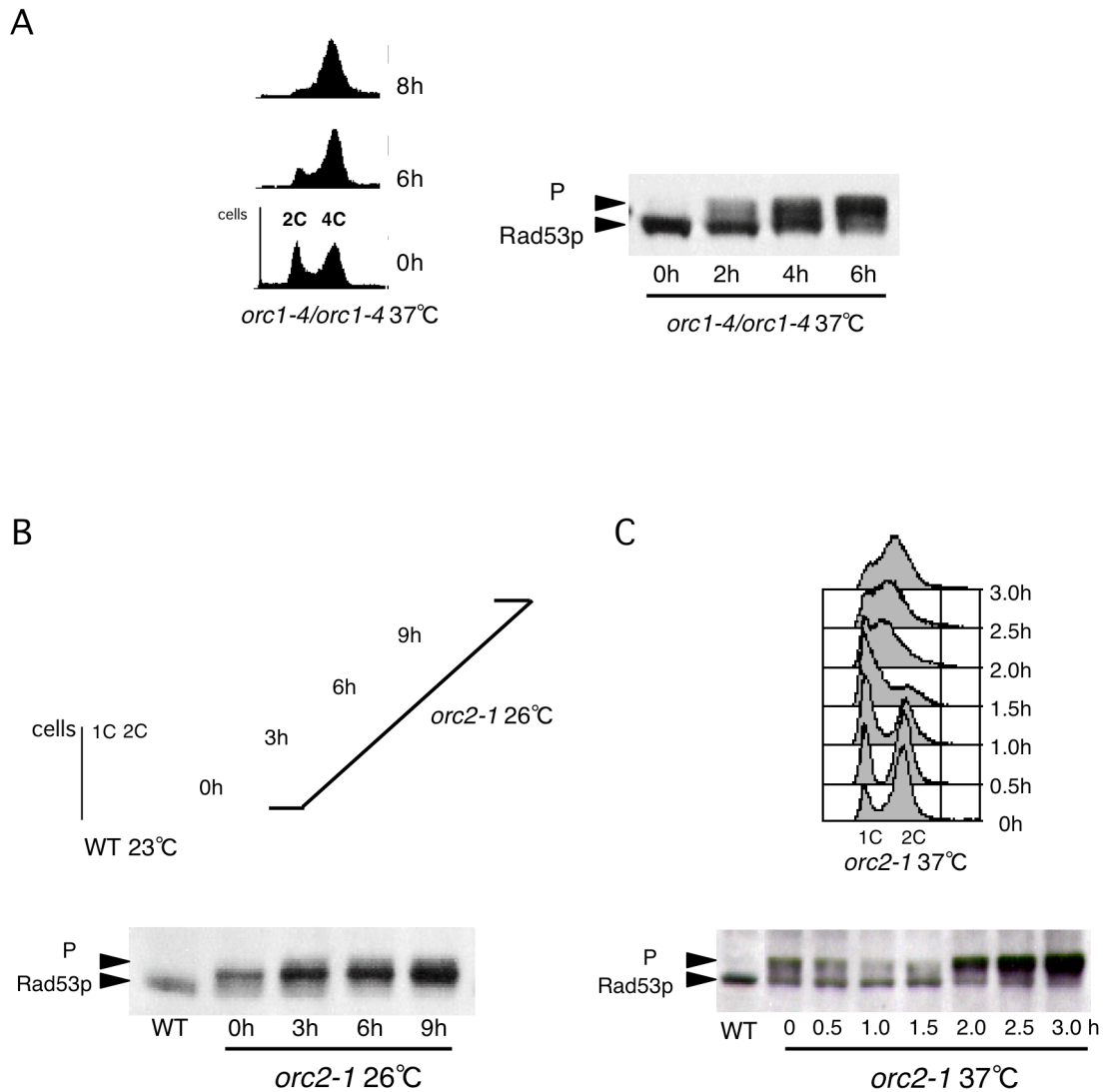
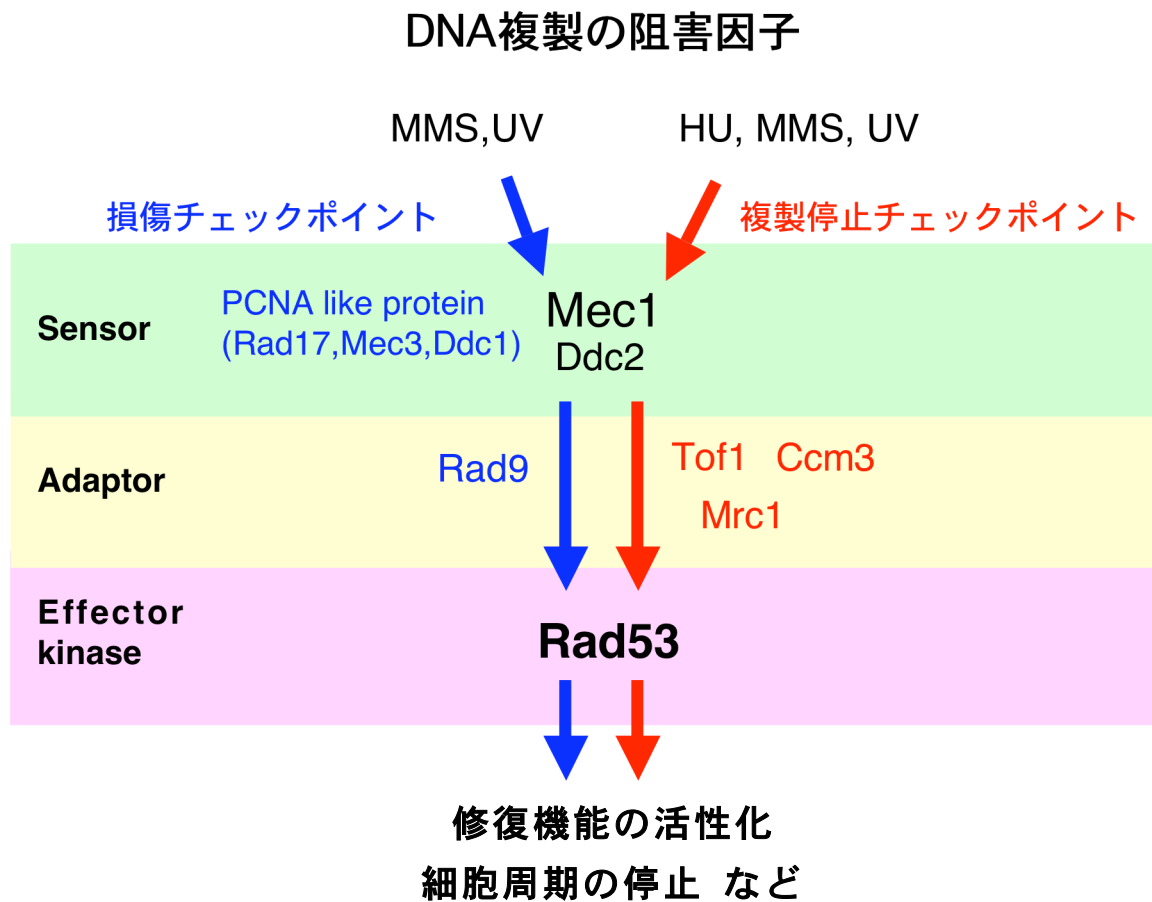


Fig.4-1. *orc*変異株で誘発されるチェックポイント応答

(A) (B) 対数増殖している二倍体 *orc1-4* 変異株(A)と一倍体 *orc2-1* 変異株(B)を非許容温度にシフトした後 (*orc1-4* 変異株の場合 37°C、*orc2-1* 変異株の場合 26°C)、細胞周期の分布の変化と Rad53p のリン酸化のパターンを調べた。ヒストグラムは、FACS 解析による細胞集団全体の細胞周期の分布を表している。縦軸は、細胞数で、横軸は細胞内の DNA 含量であり、一倍体の場合、1C のピークが G1 期の細胞、2C のピークが G2 期の細胞、2 つのピークの間は、S 期の細胞を示す (二倍体 *orc1-4* 変異株の場合、2C のピークが G1 期の細胞、4C のピークが G2 期の細胞を表す)。 *orc1-4* 変異株、*orc2-1* 変異株ともに、温度シフト後、徐々に G2 期の細胞が蓄積していることから、G2/M 期で細胞周期が停止していることがわかる。Rad53p へのリン酸化シグナル伝達は、Rad53p のウェスタンブロットティングを行い、リン酸化修飾による Rad53p のバンドシフトによって、判定できる。Rad53p の C 末端に HA-tag を結合させ、抗 HA 抗体によって Rad53p を検出した。 *orc1-4* 変異株は、温度シフト後すぐに、リン酸化によるバンドシフトが観察された。一方、*orc2-1* 変異株では、許容温度である 23°C でさえも、Rad53p の一部はリン酸化を受けていた。温度シフト後、更なるバンドシフトとタンパク量の上昇が観察された。

(C) *orc2-1* 変異株を 37°C にシフトアップした時の細胞周期の分布と Rad53p のリン酸化のパターン。26°C にシフトした時と異なり、37°C では、複製開始頻度が急激に低下するため、一度、細胞集団全体が G1 期にたまり、その後、徐々に S 期に進行する。S 期に進行し始める温度シフト後 2 時間の時点で、Rad53p がリン酸化され始める。



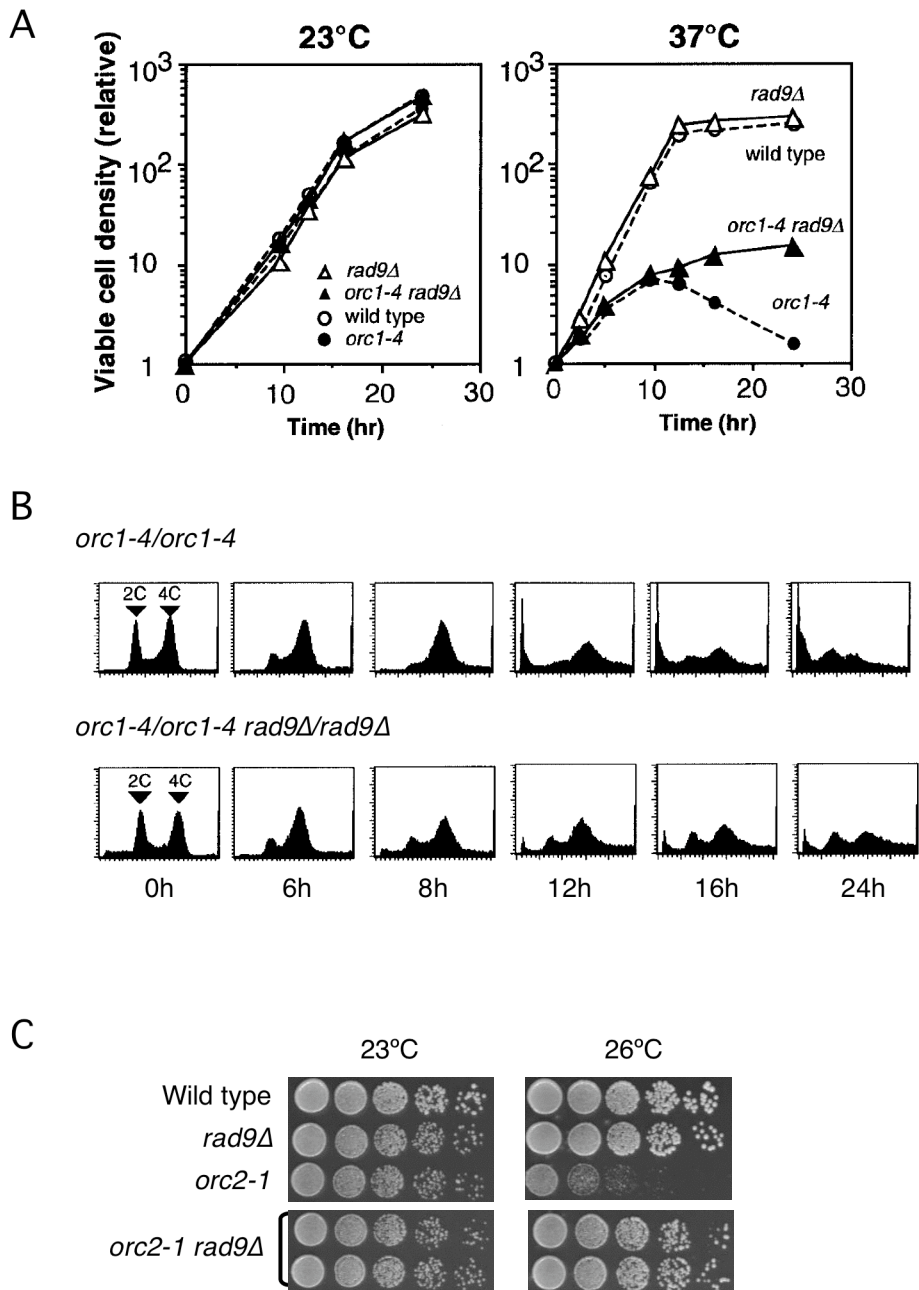
**Fig.4-2. 出芽酵母の細胞周期チェックポイントの経路についての概略図**

DNA複製時における異常を感知し誘発されるチェックポイントの経路。一つは、DNA損傷チェックポイントで、その経路と関わる因子を青字で記した。もう一つは、複製フォークが停止した時に誘発される複製停止チェックポイントで、その経路関わる因子を赤字で記した。また、両方の経路に共通に必要な因子を黒字で記した。アルキル化剤であるメチルメタンスルホン酸(MMS)を処理した時や紫外線(UV)で照射した時は、DNAの二本鎖切断などの損傷が生じる同時に、損傷が複製フォークを阻害するため、複製停止チェックポイントも誘発される。一方、dNTPsを枯渇させるヒドロキソ尿素(HU)を処理した時は、複製フォークの進行は阻害されるが、DNA損傷は発生しないので、損傷チェックポイントは誘発されない。

しかし、チェックポイント応答による細胞周期の停止のシステムは、染色体異常の発生を抑制することができるが、決して万能ではない。チェックポイント応答が活性化し続ける時間は、温度シフト後、10時間くらいまでで、それ以上高温に晒されると、細胞周期の停止が解除され、それと同じタイミングで、細胞集団中に染色体異常が生じた細胞、つまり *URA3* 遺伝子マーカーを失った細胞が高頻度に出現してくる。*RAD9* 遺伝子を欠損させた場合、これと同様な現象が、温度シフトした直後、すぐに観察される。このように、複製開始制御が乱れた時、チェックポイントの機能の一つ、細胞周期の停止の機能がバックアップしている期間だけ、ゲノムの安定性は維持されるのである。

複製開始が乱れた時、発動するチェックポイント応答は、もう一つの特徴的な機能を発揮する。それは、細胞死プログラムの発動である。*orc* 変異株を温度シフトした後、しばらく間は、チェックポイントによって、修復機能が活性化され、ダメージを解消することが試みられるが、更に高温下に培養し、直されないほどのダメージが生産され続けると、細胞周期の停止が解除されると同時に、チェックポイント因子に依存的な細胞死が誘導される (Fig.5.A.B)。そのため、*orc* 変異株の温度感受性は、一部チェックポイントの働きに依存しており、チェックポイントが欠損すると、その温度感受性は部分的に抑制される。こうした細胞死の誘導は、UV やアルキル剤などを処理した時には観察されないが、出芽酵母の *orc* 変異株では、チェックポイント依存的にカスパーゼのホモログ Yca1p の活性化、活性酸素の蓄積、アポトーシス様な細胞死が起きていることが他の研究グループによっても報告されており、我々の研究グループが観察した細胞死の誘発もこのことと関係しているかもしれない (Weignberger et al., 2005, Burhans et al., 2003)。チェックポイント機構は、そのダメージの量に応じて、①修復機能を活性化することで損傷を直す、②細胞死を発動し、異常な細胞を集団から排除する、という2つの機能を使い分けながら、複製開始の制御が乱れ時に、ゲノムの安定維持をバックアップしていると思われる (Fig.3)。

また、複製開始制御が破綻した腫瘍細胞においても、チェックポイント機構が誘導されている。このことから、出芽酵母の *orc* 変異株を腫瘍細胞のモデルと見立て、*orc* 変異株における複製開始制御の乱れに応じたチェックポイントの誘発機構の詳細について研究を進めていくことは、細胞が保有するガン抑制機構の理解に繋がると思われる。



**Fig.5. DNA損傷チェックポイントによる細胞周期の停止と細胞死プログラムの発動**

(A) (B) 二倍体 *orc1-4* 変異株、*orc1-4 rad9Δ* 株を 37°C に温度シフト後、細胞の生存率と細胞周期の分布を調べた。*orc1-4* 変異株では、温度シフト後 10 時間してから、G2/M 期での停止が解除されると同時に、細胞の生存率が低下していく。その後、更に培養続けると、1C 以下の DNA を持った細胞のピーク (DNA が分解された?) が現れてくる。それに対して、*orc1-4 rad9Δ* 株では、細胞周期の停止、細胞生存率の低下、DNA の分解の 3 つ全ての現象が観察されない。

(C) *orc2-1* 変異株と *orc2-1 rad9Δ* 株の SPOT 試験による温度感受性の検討。*orc2-1* 変異株でも、*RAD9* 遺伝子欠損させると、26°C での温度感受性が部分的に抑制される。上記の実験 (A)(B) は、本研究室の渡辺圭一氏が行ったものである。実験 (C) に関しては、株の作製からやり直し、渡辺氏が行った実験の再現性を確認したものである。

#### 4. 極度の不安定性を示す一本の染色体

*orc1-4* 変異株を 37°C にシフトし、24 時間培養した後、3 番染色体上の *URA3* 遺伝子マーカーを喪失した細胞は 1,000 細胞の内、4.5 細胞の頻度で出現した（染色体異常の発生頻度 =  $4.5 \times 10^{-3}$ , Fig.6-1.C）。温度シフト前の約 20 倍に上昇していたことになる。この染色体異常発生頻度の測定実験において、24 時間後生き残っていたほとんどの細胞で、12 番染色体が不安定化を起し、そのサイズが変動していることに気づいた（Fig.6-1.A）。このようなサイズ変動は、温度シフト前の *orc1-4* 変異株では観察されない。いくつかの細胞では、2 本ある 12 番染色体がそれぞれ異なるサイズになっていた。12 番染色体のサイズ変動は、ほとんど全ての細胞に起こることから、おおよそ染色体異常頻度を 0.1~1 とした場合、12 番染色体は、他の染色体と比べて、複製開始制御の乱れに対して感受性であり、極度の不安定性を示していると思われる（Fig.6-1.C）。同様の 12 番染色体の不安定性は、他の *orc* 変異株、*orc2-1* 変異株でも観察された（Fig.7.B）。

また、*orc1-4* 変異株の 12 番染色体の極度の不安定性は、温度シフト後の経時的な観察によっても認められた。*orc1-4* 変異株を温度シフトした後、2.5 時間の時点では、サイズは均一であったが、5 時間後に回収した細胞の 12 番染色体のサイズは、変動していた（Fig.6-1.B）。他の染色体は、チェックポイントによる抑制が解除された後、ちょうど温度シフトした後 10 時間以上経ってから、不安定化を起し始めることから、12 番染色体は、非常に早い時間に不安定化を起し始めていたと考えられる（Fig.6-1.C）。しかも、この温度シフト後の 12 番染色体の不安定化は、チェックポイントの *RAD9* 遺伝子を欠損させると、さらに早まり、温度シフト 2.5 時間後にサイズ変動を起していることがわかった（Fig.6-1.B）。このことから、12 番染色体は、DNA 損傷チェックポイントの働きによって、少しの間は安定に維持されるが、何らかの理由で、チェックポイントによるゲノムを安定に維持する働きを無視して、不安定になってしまったと考えられる。

12 番染色体において、500kb 以上もの大きなサイズ変化しているにも関わらず、細胞が生育してくることを考えると、このサイズ変化は、12 番染色体上に存在する rDNA 領域のコピー数の変化に起因していると推察される。rDNA 領域とは、rRNA 遺伝子を含む 9.1kb の配列（rDNA ユニット）が 150 コピー以上タンデムに並んでいる領域である。（Fig.6-2）この領域ならば、例え、100 コピー以上が抜け落ちて、細胞は、残ったユニットから rRNA を供給することができるので、生存や増殖速度に何の影響も受けない。逆に 500kb 以上ものサイズ変化が 12 番染色体上の他の部分で起こると、必須遺伝子の欠損を伴い、細胞は死んでしまうので、rDNA 領域のコピー数が変化することで、12 番染色体のサイズ変化が起こっていると考えられる。

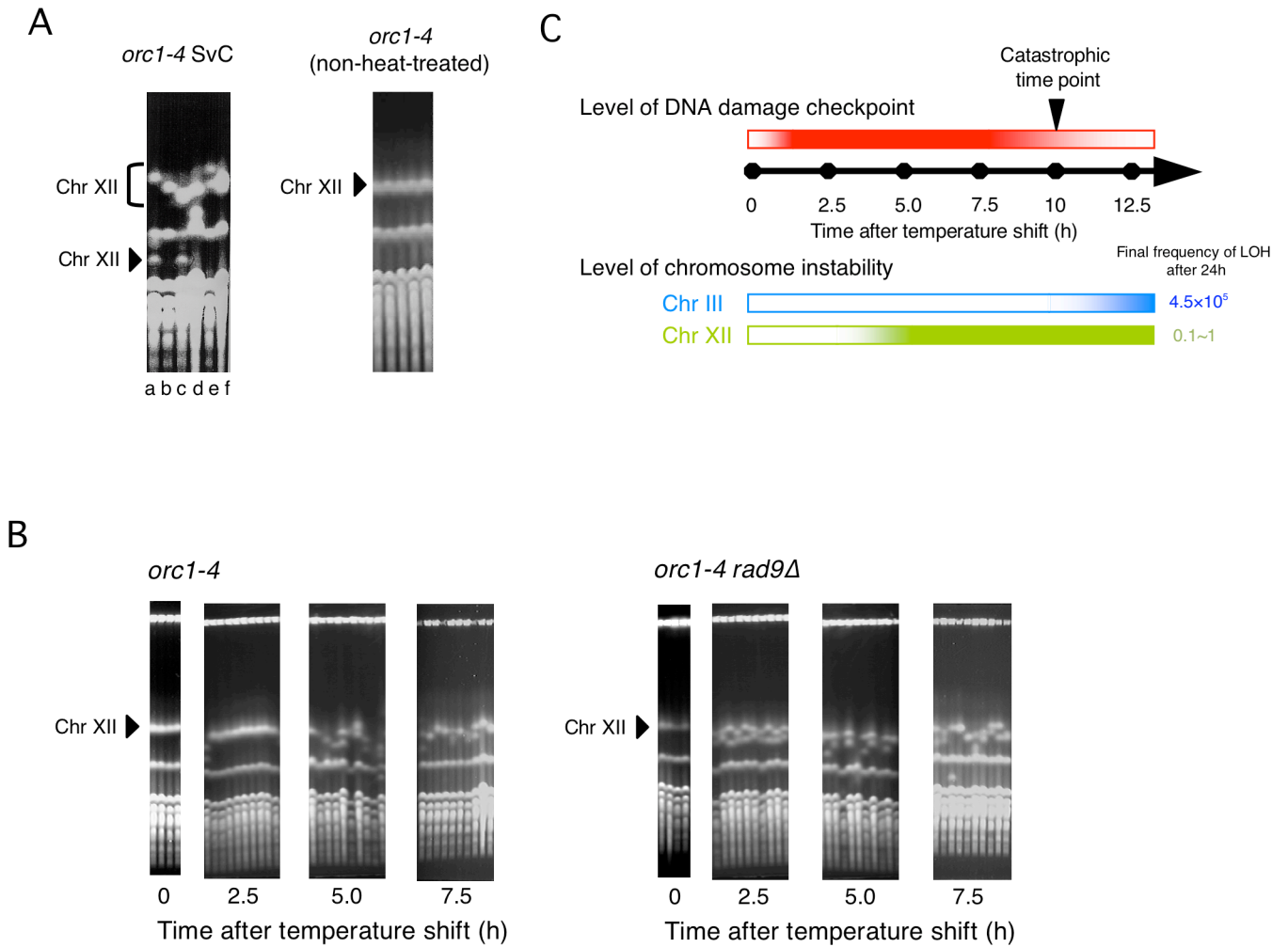


Fig.6-1. *orc1-4*変異株で極度の不安定性を示す第12番染色体

*orc1-4*変異株を37°Cに温度シフトした後、他の染色体に比べて、12番染色体が極度の不安定化を起こす。(A) *orc1-4*変異株を高温処理した後の12番染色体のサイズ変動。*orc1-4*変異株を37°Cにシフトし、24時間培養した後、生き残っていた細胞を採取し、パルスフィールドゲル電気泳動によって、各染色体を分離した。(B) *orc1-4*変異株を温度シフトした後の12番染色体の経時的な解析(左)。*orc1-4 rad9Δ*株の12番染色体の経時的な解析(右)。(C) *orc1-4*変異株を温度シフトした後のチェックポイントの活性化と各染色体の安定性の関係。温度シフトした後のDNA損傷チェックポイントの活性化(赤)、3番染色体の不安定性(青)、12番染色体の不安定性(緑)について、色の濃さによって表した。3番染色体、12番染色体の24時間後のLOHの頻度について、各バーの横に記載した。上記の実験は全て、本研究室の渡辺圭一氏が行ったものである。



第12番染色体 ~2Mb

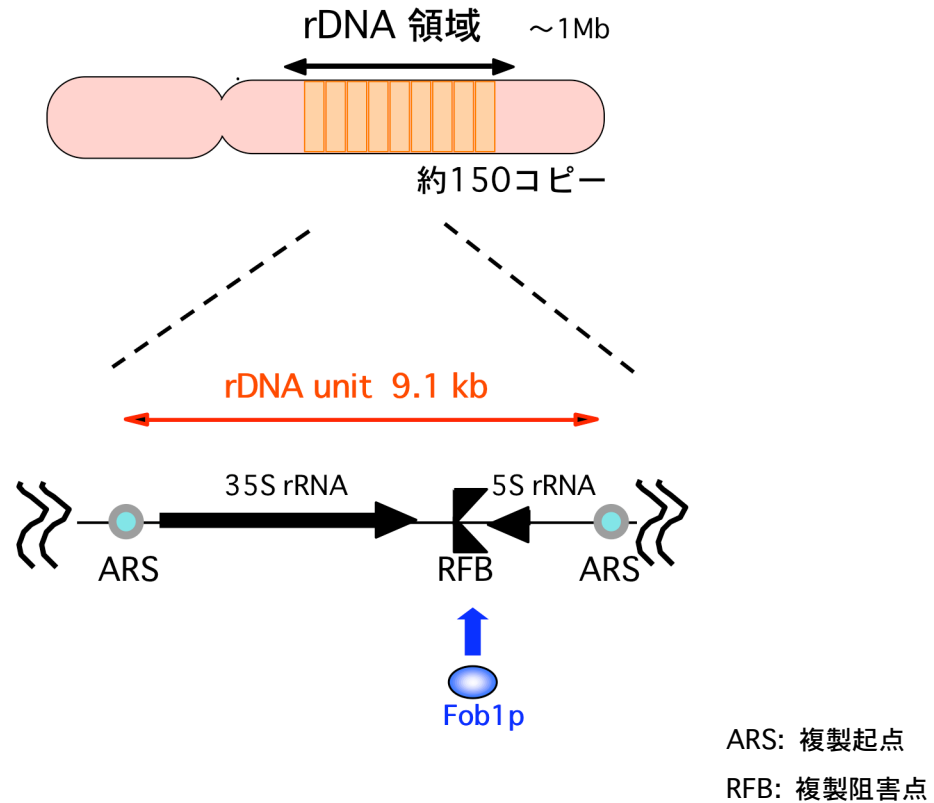


Fig.6-2. 出芽酵母のrDNA領域の構造

出芽酵母のrDNA領域は、12番染色体上に存在し、9.1kbのrDNAユニットが約150コピー並列に連続して並んでいる。このコピー数は固定されているのではなく、絶えず変動しながら一定に維持されている。rDNAユニットの配列レベルでの特徴としては、35S rRNA遺伝子、5S rRNA遺伝子に加えて、複製起点(ARS)、複製阻害点(RFB)がコードされている。複製阻害点には、Fob1pが結合し、このタンパクの働きにより、35S rRNA遺伝子の転写と反対方向に進む複製フォークの進行が阻害される。また、Fob1pは、組み換え反応を誘導し、この領域のコピー数の変動に関わっている(rDNAコピー数の増幅機構)。本文では引用されることはないが、rDNA領域は、核内では核小体という構造体内に組み込まれている。

## 5. 高温耐性を獲得した生残菌の出現

我々は、rDNA 領域の不安定性の発見時に、もう一つ奇妙な現象を偶然見つけていた。orc1-4 変異株を 37°C で、24 時間培養した後、生き残っていた細胞 (Surviving Cells : SvC) を 6 つ (SvCa-f)、クローンとして回収したところ、その中の 4 つ (SvCa,b,c,f) は、再度温度シフトアップしても、温度感受性を示さなくなっていたのである (Fig.6-3)。そして、温度感受性を喪失したクローンの内、3 つ (SvCa,c,f) は、共通して、取り分け大きな rDNA 領域の欠落を起こしていた。(以上の Data、Fig.6-1~3 は、当研究室の渡辺圭一によるものである)

そこで、本研究は、複製開始制御が乱れた時に、極度の不安定性を示す rDNA 領域に焦点を当て、生き残っていた細胞で観察された rDNA 領域の短縮と温度感受性の抑制の関係について、詳細に調べることを目的として、始動した。

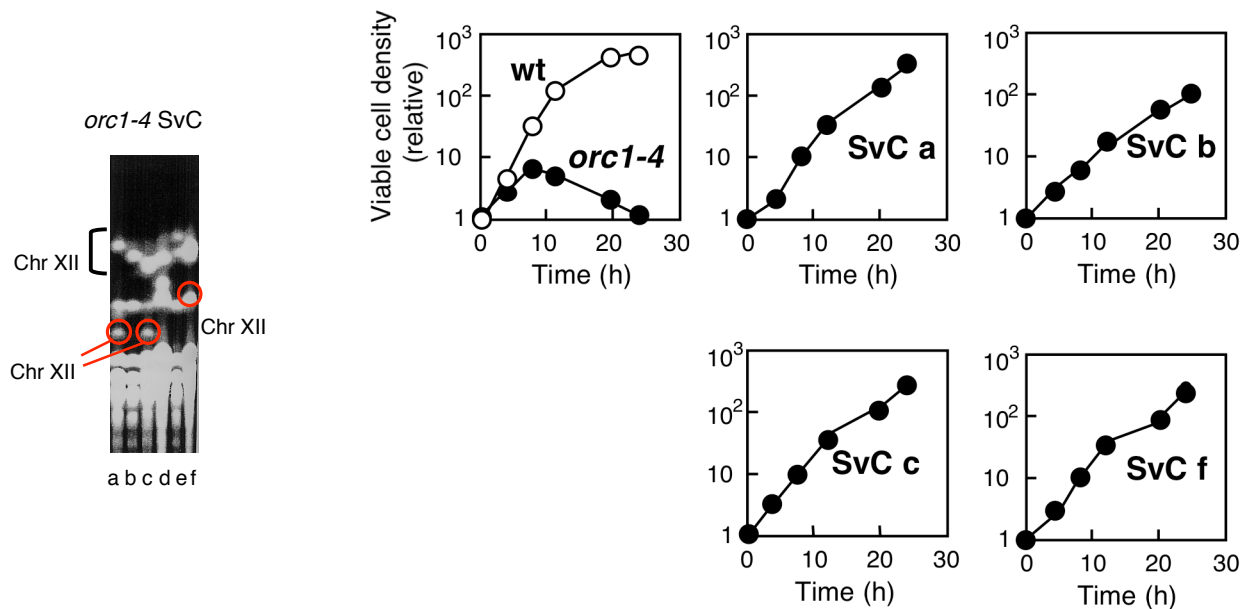


Fig.6-3. *orc1-4*変異株における温度耐性を獲得した生残菌の出現

*orc1-4*変異株の高温生残菌のいくつかは、温度耐性を獲得している。37°Cで24時間培養した後、生き残っていた細胞(Surviving Cells:SvC)を採取し、許容温度23°Cで回収した。その細胞を再度、37°Cにシフトし、時間ごとに細胞をプレートにまいて、コロニーの数をカウントすることで、細胞の生存率を算出した。上記の実験は、本研究室の渡辺圭一氏が行ったものである。

## 材料と方法

### 1. 菌株

本研究に用いた出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は、ゲノムプロジェクトに利用された S288c 株由来と DNA 複製の分野でよく用いられる W303 株由来を使用した。大腸菌 (*Escherichia coli*) は全てパリの下水から発見された K-12 株由来の DH5  $\alpha$  である。使用した菌株の遺伝子型等については表 1 に記載する。染色体上の位置に関してはゲノムプロジェクトで示されている情報に従った。なお、大腸菌の培養はすべて 37°C の条件で行った。

### 2. プラスミド DNA

本研究で使用したプラスミド DNA について表記する。

#### 1) YIp211-*orc2-1*

本研究で *orc2-1* 変異導入の際に使用したプラスミド DNA で、当研究室渡辺より分与を受けた。出芽酵母の遺伝子導入用のベクター YIp-211 (Gietz et al., 1988) を基本構造とし、*ORC2* 遺伝子 (1863 bp) の 1808 番目の C が T に置き換わった *orc2-1* 遺伝子の C 末端付近の断片 (1056 bp ; *Hind*III-*Xba*I 断片) を挿入したものである

#### 2) pU6H3HA

pU6H3HA (Antoni et al., 2000) は HA 抗原認識配列を目的の遺伝子の C 末端に付けるためのクローニングベクターである。pUG6 とアダプターである 6His3HA の断片から成り、大腸のレプリコン、アンピシリン耐性遺伝子、薬剤 G418 に耐性を示す *Kan<sup>r</sup>* 遺伝子をコードしている。今回は PCR によって *RAD53* 遺伝子の C 末端に HA 配列を挿入するための鋳型として用いた。

#### 3) pRDN-hyg1

pRDN-hyg1 (Chernoff et al. 1994) は、rDNA ユニットを一つ含んだプラスミドで、35S rRNA 遺伝子にハイグロマイシンに耐性を付与する劣性変異が導入されている。ハイグロマイシンと併用することで、出芽酵母の rDNA 領域のコピー数を減少させることができる。また、*URA3* 遺伝子マーカーをコードしているため、任意にプラスミドを落とすことが可能である。

#### 4) pNOY102

pNOY102 (Nogi et al., 1991) は、35S rRNA 遺伝子をコードしており、そのプロ

モーターとして、*GAL7*プロモーターが組み込まれているので、培地中に含む糖源によって、発現を調節することができる。糖源が、グルコースだと発現 OFF、ガラクトースだと発現 ON になる。

### 3. 試薬と培地

各種溶液は MiliQ 水に、各種培地は脱イオン交換水に溶解して調製した。

一般的な試薬に関して、特に記載がない限り NaCl、MgCl<sub>2</sub> 等の塩類及びグルコース、等の糖類については和光純薬の製品を、エタノール、グリセロール等の液体試薬はナカライテスク社製のものを使用した。Agar、peptone、yeast extract 等の培地成分については Difco 社の製品を使用した。その他の試薬に関しては順次記載する。%で表した濃度については特に記載がない限り w/v とする。

酵素類に関しては、特に記載がない限り TAKARA 社製のものを使用した。

大腸菌培養の基本操作は Molecular Cloning (Sambrook et al.,2001)に記載されている方法に従った。大腸菌の培養には LB 培地 (1%Bacto-trypton, 0.5%Bacto-yeast extract,0.5%NaCl) を用い、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。培地に加える試薬の最終濃度に関してはアンピシリンを 100  $\mu$ g/ml とした。

出芽酵母の培養については、*Methods in Yeast Genetics* (Burke et al.,2000)に記載されている方法に従った。出芽酵母培養には YPD 培地 (1%Bacto-yeast extract, 2%Bacto-peptone, 2%Glucose) を用い、必要に応じて完全合成培地 (以下 SC 培地と略す ; 0.67%Bacto-yeast nitrogen base without amino acids, 0.2%complete mix,2%Glucose; pH7.0) あるいは SC drop-out 培地 (特定のアミノ酸や核酸などを加えない drop out mix を用い作製した合成培地) を使用した。寒天培地として使用する場合には Bacto-agar を 2.0%の濃度で加えた。GENETICIN(以下 G418)を加える場合は一度滅菌水に溶かしてからラベルに記載されている有効濃度をもとに 500  $\mu$ g/ml となるように培地に加えた。

### 4. DNA の調製

プラスミド保有している大腸菌からプラスミド DNA を調製するために Quantum Prep Plasmid Mini prep または Midi prep (BIO-RAD 社)を用い、製造元の指示に従って精製した。出芽酵母からのゲノム DNA の調製は Gen とる君 (酵母・グラム陽性菌用、TAKARA 社) を用い、製造元の指示に従って使用した。PCR に用いたオリゴヌクレオチドはジーンデザイン社に委託して合成したものである。またオリゴヌクレオチド DNA は 1×TE (10mMTris·HCl pH8.0, 1mMEDTA) に、それ以外の DNA は 1/10×TE に溶解するものとする。

## 5. アガロースゲル電気泳動

基本操作は Molecular Cloning (Sambrook et al.,2001)に記載されている方法に従った。Agarose LO3(TAKARA 社)を用い、DNA の分子量に応じて 0.7%~2.0%の濃度でゲルを調製した。緩衝液は TAE 溶液 (40mM Tris-acetate, 2mMEDTA;pH8.5)を使用した。泳動にはミューピッド泳動槽 (コスモ・バイオ社)を用い、電圧 50V もしくは 100V で 30 分~60 分間通電した。泳動後、0.5  $\mu$ g/ml のエチジウムプロマイド水溶液に 20 分程度浸漬して DNA を染色し、UV トランスイルミネーター (アトー社)を用いてゲルに紫外線を照射することにより DNA を観察した。

## 6. 形質転換法

プラスミド DNA を大腸菌に導入する際には塩化カルシウム法を用いた。その基本操作に関して Molecular Cloning (Sambrook et al.,2001)に記載されている方法に従った。また出芽酵母へのプラスミド DNA 及び遺伝子マーカーの導入に関しては酢酸リチウム法 (Burke et al., 2000)を用いた。形質転換させる出芽酵母はすべて一倍体細胞を用い、遺伝子マーカーを染色体上に組み込む場合には直鎖状の DNA を用いた。

## 7. PCR

特に記載がない限り、PCR は鋳型として細胞から調製したゲノム DNA を用いた。95°C3 分で DNA 変性後、95°C30 秒、55°C30 秒、72°Cで増幅産物 1kb につき 1 分の三段階を 30 サイクルの反応条件で行った。反応系は 50  $\mu$ l とし、反応液の調製には TAKARA EX Taq polymerase、及び添付の 10 $\times$  EX Taq Buffer、dNTP を用いた。反応には PERKIN ELMER 社 Model 9600 サーマルサイクラーを使用した。反応条件は、1 $\times$  EX Taq Buffer、200  $\mu$  M dNTP、0.5  $\mu$  M primer、0.05unit/ $\mu$  l EX Taq DNA polymerase とした。また、鋳型 DNA は反応液に 40ng~140ng の量を使用した。コロニーPCR を行う際、アルカリ法を用いて鋳型を作製した。

## 8. DNA 塩基配列の決定

PCR で増幅された DNA 断片やプラスミドの塩基配列決定は、ABI PRIZM™ Dye Primer Cycle sequencing Kit(PERKIN ELMER 社)を用いてその方法に従った。電気泳動と蛍光ラベルの検出、解析は Applied Biosystems 社の DNA シーケンサーを用いた。

## 9. 菌株の取り扱い

生育曲線や FACS 解析による細胞周期の分布の変化について調べる際、対数増殖の終夜培養液を YPD 液体培地の本培養に植え継いだ。O.D.=0.1 の時点を 0 時間とし経時的に培養液を採取した。O.D.は BECKMAN 社製 DU640 を用いて波長 600nm で測定した。細胞数は垣医理科工業社製改良ノバウエル血球計算版を用いて光顕計測し

た。生育曲線は採取した培養液を適当に希釈して YPD プレートに 100~200 個程度の細胞を塗布した。2~4 日間 23°C で培養後、生育したコロニー数を計測して cfu (colony forming unit : 生菌数) 算出して作製した。終夜培養液は全て 23°C で行い対数増殖期である O.D.=1~3 のものを本培養に植え継ぐように心がけた。但し *orc* 変異株は温度感受性であるので 23°C を許容温度とし、26°C、30°C、37°C を非許容温度とする。

## 10. 酵母細胞への *orc2-1* 変異の導入

### 1) 形質転換

YIp211-*orc2-1* プラスミド DNA を *SaII* 処理により直鎖状 DNA 断片にし、*Methods in Yeast Genetics* (Burke et al., 2000) のプロトコールを参考に、酢酸リチウム法を用いて各株に形質転換し、*URA3* 遺伝子マーカーを利用した Two-step Gene Replacement 法により選択した。一次選択後、染色体へのプラスミド DNA の挿入の確認をコロニー PCR (鋳型 ; *URA3* 遺伝子内外向きプライマーセット、*ORC2* 遺伝子外内向きプライマーセット) により行い、また、*KpnI* 処理によって PCR 産物が切断されないことを確認した。さらに、選択されたコロニーを YPD プレート上に画線培養により 30°C 培養下で温度感受性を示すことを確認した。二次選択 (Pop-out) 後も同様の確認を行い、最終的に 30°C 培養で温度感受性を示した細胞のみを選択した。

### 2) シーケンスによる *orc2-1* 変異部位の確認

選択された株に *orc2-1* 変異が導入されていることを確認するために *orc2-1* 変異部位周辺の DNA 塩基配列を決定した。プライマー DNA は表 2 を参照。

## 11. FACS 解析法

FACS による細胞周期進行の解析は Longhese らによる方法 (Paciotti et al., 1995) に従った。

## 12. Rad53p のリン酸化の検出

Rad53p のリン酸化修飾は、ウェスタンブロッティングにより、Rad53p を検出し、そのバンドがシフトすることで判定できる。Rad53p の C 末端に HA -tag を付加して、その抗 HA 抗体によって、Rad53p を検出した (詳細については、井手修士論文を参照)。

### 1) *RAD53* 遺伝子の C 末端への HA-tag の導入

#### a) 導入用の PCR 断片の作製

ゲノム上の *RAD53* 遺伝子の C 末端に HA-tag を導入する方法は、pU6H3HA を鋳型として用いた PCR による方法で行った。PCR による *Kan<sup>r</sup>* 遺伝子をマーカーとし

て含んだ HA-tag 挿入断片を作製するために用いたプライマー dRAD53-6H3HAf と dRAD53-6H3HAr の配列を表 2 に示す。この PCR で用いたプライマーセットの 5' 側には、それぞれ *RAD53* 遺伝子の C 末端の領域（終止コドンは除く）、もしくは、ORF の下流領域を相同な配列 75nt が付加されている。プライマーの 3' 側は、鋳型として用いた pU6H3HA の *Kan<sup>r</sup>* 遺伝子を挟んだ部位のそれぞれ上流と下流に相補的な配列になっている。このプライマーを用いて PCR を行うことで、*RAD53* 遺伝子の HA-tag 導入断片を得た。鋳型の量を 10ng としたこと以外、先に述べた PCR の方法に準ずる。この断片をエタノール沈殿で簡易に精製してから、形質転換に使用した。

### **b) *RAD53* 遺伝子の C 末端への HA-tag 導入**

上記の方法で作製した DNA 断片を、Saccharomyces Genome Deletion Project のプロトコルを参考に、酢酸リチウム法を用いて、目的の株に導入した。DNA 断片が導入された細胞は、YPD/G418 プレートにて選択し、生育したコロニーを新しい YPD/G418 プレートに一度レプリカして、偽陽性のコロニーを排除した。最後に、再度、YPD/G418 プレートに画線培養して単離した。

### **c) HA-tag 導入の確認**

*RAD53* 遺伝子 C 末端への HA-tag 導入の確認は、第一に PCR によって行った。目的断片が挿入される領域の外側に、プライマーを作成し、PCR によって増幅した断片の大きさによって判断する。*Kan<sup>r</sup>* マーカーを持った HA-tag 導入断片を形質転換した場合は、dRAD53-4、dRAD53-7 を使用した。第二に、シーケンスによって、HA-tag 導入を確認した。HA-tag 配列は、dRAD53-4 と dRAD53-7 を用いて PCR で増幅した後、dRAD53-4 を使用して Cycle sequence を行い、塩基配列を決定した。

## **2) タンパク質の調製法**

Rad53p-HA に限らず、出芽酵母からタンパク質を抽出する際、TCA 法 (Paciotti et al.,1998) を採用した。CS-6 centrifuge (Beckman 社) を使用して室温で行った。10.D.600 分の細胞を分取して遠心後 (3,000rpm 5 分)、上清を捨て 1ml 滅菌水を加え洗浄した。再び遠心して (3,000rpm 5 分) 上清を捨てた後に、20%TCA(トリクロロ酢酸)を 1 ml 加え、細胞を固定した。ここでの TCA 処理はプロテアーゼを破壊しタンパク分解を防ぐ意味がある。十分に懸濁した後、遠心して (3,000rpm 5 分) 上清を捨てて 5%TCA を 100 $\mu$ l 加える。2ml 1 ポリプロピレン遠心管に移しガラスビーズ (直径 0.5mm) を 150mg~200mg 加えた後、マルチビーズショッカー (安井器機製) にセットして 2,000rpm [破碎時間 30S インターバル 60S] を 4 サイクル行った。菌体を破碎した後に遠心管を取り出し、底に 26G の大きさの注射針で穴を開けて、15ml ファルコンチューブに遠心管ごと入れた。遠心管の入ったファルコンを遠心した後



(3,000rpm 1分)、5%TCA を遠心管に 50  $\mu$ l 入れてビーズについているタンパクを洗い流し再度遠心した。この操作 (5%TCA で洗浄→遠心) を 2 回した後に、3,000rpm 10 分遠心して遠心管と上清を捨て、得られた TCA の沈殿物に 2×SDS-buffer (100mM Tris HCl, 4%SDS, 0.2%BPB,20%Glycerol, 200mM DTT) を 15  $\mu$ l 加え、よくピペットマンで懸濁しエッペンに移す。この時、沈殿物に TCA が残留しているので酸性で SDS-buffer は赤くなる。0.5M Tris HCl (pH8.0)を 15  $\mu$ l 加え、SDS-buffer の色 (赤→青) を目安にアルカリ性にする。ここで、完全にアルカリ性にしないと、その後煮沸した時、酸分解が起こってタンパク質が消失する。溶媒の SDS-buffer が青くなったことを確認して、95°C 5分煮沸した。遠心した後 (3,000g 10分 室温)、上清を取り新しいエッペンに移し、短期間であるなら 4°Cで保存してもよいが、長時間保存するならば-80°Cで保存した (著者が長期間 4°Cに保存した時、リン酸化した Rad53p が特異的に分解されていたことがあった)。

タンパク質定量はスタンダードとして bovine serum albumin (BSA)を使用し、Bio-Rad 社の Bradford Protein Assay System によって測定した。その結果、この方法によって、10.D.<sub>600</sub>分の細胞から、およそトータル 150~250 $\mu$ g のタンパク質が抽出できる。

### 3). 検出法

#### a) SDS-PAGE 法

標準的な SDS-PAGE は、泳動装置として Mini-PROTEIN III 電気泳動槽 (Bio-Rad 社) を用いて行った。泳動装置の操作は説明書に従った。ゲルや試薬の調製は Molecular Cloning (Sambrook et al., 2001) に従った。Rad53p を検出する際、Resolving gel : 8% Stacking gel : 5%の条件で行った。タンパク質抽出液 (SDS-buffer 含む) をゲルにロードし、1×SDS-PAGE 泳動バッファーを用いて 200V で 40 分間泳動を行った。Rad53p を検出する時、各々のタンパク質抽出液を 10  $\mu$ g ロードした。

#### b) 抗 HA 抗体を用いたウェスタンブロットティング

Rad53p-HA を検出するためにウェスタンブロットティングを行った。HA-tag を認識する抗 HA 抗体は、ウェスタンブロットティング分子量マーカーセット (Roche 社) のペルオキシタ-ゼ標識付き抗 HA モノクローナル抗体を使用した。この抗体は標識が付いているので、一次抗体のみで検出が可能であるが、ペルオキシタ-ゼ標識付いているため、保存の時に微生物の繁殖を防ぐアジ化ナトリウムを入れてはいけない。また、このセットに付属している抗 HA 抗体用の分子量マーカーも検出されたバンドが Rad53p と同じ大きさかどうかを確認するために使用した。

電気泳動後、SDS-PAGE から PVDF メンブレン (Millipore 社) へタンパク質を転写した。転写中は氷水を用いてトランスファー装置を冷却した。転写装置としてウェット型ミニトランスブロット (Bio-Rad 社)、そして転写バッファーとして 1×SDS-PAGE トランスファーバッファー (1×SDS-PAGE 泳動バッファー、20%メタ

ノール) を用いた。Model200/2.0 Power Supply (Bio-Rad 社)を用いて 100V で通電し、タンパク質を膜上に転写した。

転写後の PVDF メンブレンを室温において 5%スキムミルクを含む TBS 溶液中で振とうして、1 時間ブロッキングを行った (4°C o/n でも代替え可能)。抗 HA モノクローナル抗体を 1%スキムミルクが含まれる TBST 溶液を用いて希釈して室温で 1 時間 PVDF メンブレンと反応させた。抗体は 1/1,000 に希釈して使用した。一次反応させた後、メンブレンを洗浄して、その後 ECL キット (Amersham-Pharmacia 社) を用いた化学発光により、抗原のシグナルを ECL フィルム (Amersham-Pharmacia 社) 上に検出した。ECL キットについては添付の説明書を参考に反応を行った。

### 13. Rad53p の自己リン酸化活性の測定

Rad53p のリン酸化によるバンドシフトとは別に、Rad53p の自己リン酸化活性を測定することにより、チェックポイントの活性化を判別することができる (Neecke et al., 1999)。この方法の利点としては、第一に HA-tag を導入する必要がなく、手間が省ける点、第二にバンドシフトでは観察しにくい弱いシグナル伝達も検出できる点が挙げられる。

方法は、タンパク調製法、SDS-PAGE 電気泳動、メンブレントランスファーまでは、Rad53p のウェスタブロットイングとほぼ同じである。(但し、1 レーンに 25 $\mu$ g のタンパクをアプライした。また、トランスファー緩衝液として、192mM glycine、25mM Tris の組成のものを使用した。) その後、7M グアニジンで変性させた後、グアニジンを取り除き、4°C でゆっくりと 15 時間かけて再生させた。メンブレン上に再生した Rad53p に [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP を加えて、取り込んだことで、検出されるバンドの濃さで、自己リン酸化活性を比較する。メンブレン上での Rad53p のバンドは、①アルキル化剤処理した時にはじめて出現すること、②Rad53p に HA-tag を付加した時に、そのバンドの位置が上方に移ることを指標として、同定した。

### 14. パルスフィールドゲル電気泳動法

染色体などのサイズの大きな DNA を分離する電気泳動法で、染色体 DNA サンプルをアガロースプラグ内に包埋し、調製を行った (Burke et al., 1987)。アガロースには、Agarose Low Melting Preparative Grade (Bio-Rad 社) を用い、これを 0.6% で使用した。12 番染色体のサイズの解析する際、約 30.D.<sub>600</sub> まで増殖させた細胞を採取し、染色体を抽出した。また、複製中間体の割合を算出するために、12 番染色体の状態を解析した時には、対数増殖している細胞からサンプル調製を行った。

泳動には、CHEF Mapper™ XA Pulsed Field Electrophoresis System (Bio-Rad 社) を使用した。アガロースには、Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad 社) を用い、泳動中の温度が常に 14°C となる制御下で泳動を行った。その他の泳動条件に関しては、下の表に示す通りであり、これらを用途に応じて使い分けた。泳動後、エチジウムブロマイド水溶液に 30 分浸漬して DNA を染色し、20 分 MiliQ 水で脱色し

た後、UV トランスイルミネーターによって、ゲルに紫外線を照射し、DNA を観察した。

	Chr XII のサイズ解析	対数増殖期の Chr XII の状態解析
泳動バッファー	1×TAE	0.5×TBE
アガロース濃度	0.8%	1.0%
CHEF の種類	CHEF Mapper XA	CHEF Mapper XA
泳動条件	Blk1:20min-22min53s, 2.0v/cm, 106°, 72h Blk2: 25s-2min26s, 6.0v/cm, 120°, 7.5h	Blk1: 0.2s-266s, 6.0v/cm 120°, 15.2h
使用したプローブ	Probe058 for Chr XII (YLL058 遺伝子の近傍)	Probe058 for Chr XII ProbeMCM2 for Chr II

## 15. サザンハイブリダイゼーション

### a) メンブレンへの転写

パルスフィールドゲル電気泳動により、分離した染色体を Hybond-N+メンブレン (アマシャム社) に転写した。12 番染色体のサイズ解析の際には、Vacuum transfer 法 (Bio-Rad 社) を用い、製造元の指示に従って、吸引力 5Hg で 90 分間行った。また、対数増殖期の細胞の 12 番染色体の状態を解析する時には、capillary transfer 法を用いて、Molecular cloning (Sambrook et al.,2001) を参考に、16 時間かけて、転写した。

### b) プローブ DNA の作製

プローブ DNA の作製は、PCR 法により行い、QIAquick™ Gel Extraction Kit (QIAGEN 社) で、ゲル精製した。(プローブ作製時に用いたプライマーは表 2 を参照) その後、精製した PCR 断片にラベルを取り込む方法としては、12 番染色体のサイズ解析の際には、Non-RI で簡易に扱える Gene Image random prime labeling module (Amarsham-Pharmacia 社) を用い、対数増殖期の細胞の 12 番染色体の状態を解析する時には、RI 用の Random Primer DNA Labeling Kit ver.2.0 (TAKARA 社) を使用した。

### c) ハイブリダイゼーション、洗浄、検出

プローブ DNA の標識及び転写後のメンブレンのハイブリダイゼーション、洗浄、検出操作に関しては、12 番染色体のサイズ解析の場合は、Gene Images CDP-Star detection module (Amarsham-Pharmacia 社) を製造元の指示に従って使用した。また、12 番染色体の状態を調べる場合は、Hybond-N+メンブレン (Amarsham-Pharmacia 社) に添付されていたサザンハイブリダイゼーション法

(RI)を参考に行った。

## 16. スポット試験

各変異株の温度感受性や薬剤感受性について、調べる際、培養液を  $2.0 \times 10^6$  cells/ml から 5 倍希釈した希釈系列を作製し、よく乾かしたプレート上に 5 $\mu$ l ずつスポットした。スポットした細胞数は、左から順に 10,000cells、2,000cells、400cells、80cells、16cells となる。特に、記載がない限り各温度で、2.5 日間インキュベートした後に、写真を撮った。UV 感受性を調べる際は、対数増殖している細胞を分取するように心懸けた。

## 17. 高温生残菌の採取法

*orc* 変異株を温度シフトし、しばらく培養した後に、生き残っていた細胞を採取し、YPD プレートにまいた。プレートを許容温度で 3 日ほどインキュベートした後、形成したコロニーをクローンとして回収した。*orc1-4* 変異株は、37°C で 24 時間培養した後の生残菌を、*orc2-1* 変異株は、26°C で 12 時間培養した後の生残菌をそれぞれ回収した。

## 18. rDNA 領域を短縮する方法

出芽酵母の rDNA 領域のコピー数は、pRDN-hyg1 とハイグロマイシンを用いることで、減らすことができる (Chernoff et al., 1994, メカニズムの詳細については、結果の章を参照)。細胞にプラスミドを導入した後、300 $\mu$ g/ml ハイグロマイシンを含んだ YPD に塗布する。3~5 日間してから生えてきたコロニーを採取し、ハイグロマイシンを含む YPD 液体培地に植え継ぎ、増やした後、-80°C でストックした。

## 19. rDNA 領域のコピー数の決定

出芽酵母から glass beads 法によって、DNA を抽出した (Methods of Yeast Genetics)。この時、ゲノムが細切れになるのを防ぐために、beads beater を用いずに、手で 3~4 分間ボルテックスをかけ、細胞を破砕する。精製した DNA を 400ng 分取して、制限酵素 BglII で rDNA 領域を 1 ユニットに切った後、1 $\times$ TAE 緩衝液で、1.0%アガロースゲルに泳動した。capillary transfer 法によって、メンブレンに転写した後、rDNA ユニットに結合する probeC とインターナルコントロールとして MCM2 遺伝子に結合する probeMCM2 で、サザンハイブリダイゼーションを行った。野生株を 150 コピーと仮定して、目的の株との間で probeC/probeMCM2 の比を比較し、rDNA のコピー数を算出した。

## 20. Orc2p の量の測定

細胞からタンパク質を抽出する際、Rad53p と同様に、TCA 法を用いた。Resolving gel : 6%を用いる点を除いて、Rad53p と同様に、SDS-PAGE で分離した。PVDF に

転写した後に、メンブレンを 100kD で切って、2 つにし、100kD 以下の部分をアッフィニティ精製した抗 Orc2p ウサギ抗体（大阪大学故川崎先生から分与）で、100kD 以上の部分を抗 Mcm2p ヤギ抗体（Santa Cruz 社）で、それぞれ 5% スキムミルクが含まれる TBST 溶液を用いて希釈し、室温で 1 時間反応させた。その後、それぞれの 1 次抗体に対するペルオキシターゼ標識付き 2 次抗体で反応させた後、ECL キット-ECL フィルム上でシグナルを検出した。

## 21. プラスミド喪失頻度の測定

YCplac111 (*ARS1*)、pRS414 (*ARSH4*) をそれぞれ導入後、非選択培地に植え継ぎ、23°C で 3 日間培養する。その間、経時的に細胞を採取し、SC プレートと SC-trp プレート、または、SC プレートと SC-leu プレートに希釈してまく。それぞれ、23°C でインキュベートし、コロニーを形成させた後、一回の細胞分裂に、プラスミドを落とす細胞の割合を算出した (Dani et al., 1983)。

## 22. $\alpha$ -ファクターを用いた細胞周期の同調法

23°C で対数増殖している細胞を集め、YPD で洗った後、YPD pH4.0 (0.5% コハク酸) に懸濁し、 $\alpha$ -ファクターを終濃度 3.0 $\mu$ M になるように加える。23°C で 4 時間培養し、フィルター (Naljen 社) を用いて、細胞を集め、大量の YPD で洗い流し、20 $\mu$ g/ml プロテアーゼ E を含んだ YPD に懸濁し、再び 23°C で培養する。

## 23. 二次元ゲル電気泳動法

### a) 二次元ゲル電気泳動用プラグ作製

対数増殖期の細胞を  $8 \times 10^7$  細胞を集め、ソルビトール溶液 (1M Sorbitol, 0.1M EDTA pH7.5, 0.1% NaN<sub>3</sub>) で洗った後、Zymolyase を最終濃度 0.6mg/ml なるように加えて、37°C で 30 分インキュベートする。等量の 1% アガロース溶液 (Sea Plaque GTG agarose, 0.1M EDTA pH8.0) 加え、4°C で 20 分放置し、100 $\mu$ l のプラグを 1 つ作る。その後、ES 溶液 (0.5M EDTA pH9.0, 1% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム) に浸し、Proteinase K (終濃度 1mg/ml) を加え、50°C で一晩反応させる。rDNA ARS の活性を検出する際は、制限酵素 *NheI* で、一方、4 番染色体上の ARS1 の活性を検出する際は、制限酵素 *NcoI* で、プラグ内の DNA を泳動前に前もって切断しておく。

### b) 泳動条件

一次元目は、0.4% のアガロースゲルと 1 $\times$ TBE 泳動バッファーを用いて、1.3V/cm 14 時間 室温の条件で泳動することで、サイズによって DNA を分離する。泳動後、エチジウムブロマイドで染色し、目的のバンドを切り出す。それを 1.2% のアガロースゲル (0.3 $\mu$ g/ml エチジウムブロマイド含む) に埋め込み、0.3 $\mu$ g/ml エチジウムブロマイド含む 1 $\times$ TBE 泳動バッファーを用いて、6V/cm 6 時間 4°C で泳動する (二

次元目)。高い電圧とエチジウムブロマイドの効果で、DNA が形に応じて、分離される (Brewer et al., 1987)。

### c) ハイブリダイゼーションと検出

キャピラリートランスファーで、Hybond-N+メンブレン (Amersham-Pharmacia 社) に転写した後、放射能ラベルした rDNA ARS 付近に結合するプローブ(probe3 ; Kobayashi 2002)と *ARS1* 付近に結合するプローブをそれぞれ用いて、検出する。

## 24. 染色体上の rRNA 遺伝子の転写を抑制する方法

rDNA 領域の短縮する際に使用したプラスミド pRDN-hyg1 とハイグロマイシンを用いて、本研究において考案した方法である。rDNA 領域の短縮する方法と同様に、pRDN-hyg1 を導入し、ハイグロマイシン処理し、耐性株を選択する。このように選択した細胞では、rDNA 領域のコピー数が減少すると同時に、ハイグロマイシンに感受性である染色体上の rRNA 遺伝子からの転写が抑制され、ハイグロマイシンに耐性であるプラスミド上の rRNA 遺伝子から、rRNA が供給されている。この操作を rDNA 短縮細胞に施すと、元々、rDNA 領域が十分短いため、転写の切り替えだけが起こる。

表 1. 菌株リスト

菌株	遺伝子型	入手先
二倍体 <i>orc1-4</i> 変異株の実験		
YMJ11	<i>MATa ura3-52 trp1Δ63 lys2Δ202 ade2Δ::hisG III-14::ADE2</i>	当研究室の渡辺圭一より分与を受けた
YKU34	YMJ11 except <i>III-205::URA3</i>	当研究室の渡辺圭一より分与を受けた
YKU23	<i>MATa lys2Δ202 leu2Δ1 ura3-52 his3Δ200 ade2ΔhisG</i>	当研究室の渡辺圭一より分与を受けた
YMJ15	YMJ11 except <i>orc1-4</i>	当研究室の渡辺圭一より分与を受けた
YSI7	YMJ15 except <i>rad53::RAD53-6His3HA-KanMX6</i>	本研究
YSI12	YSI7 except <i>pRDN-hyg1</i>	本研究
YMJ25	YKU34 except <i>orc1-4</i>	当研究室の渡辺圭一より分与を受けた
YMJ26	YKU23 except <i>orc1-4</i>	当研究室の渡辺圭一より分与を受けた
YMJ35	YMJ25 except <i>rad9Δ</i>	当研究室の渡辺圭一より分与を受けた
YMJ36	YMJ26 except <i>rad9Δ</i>	当研究室の渡辺圭一より分与を受けた
RD300	<i>MATa/MATa lys2Δ202/lys2Δ202 LEU2/leu2Δ1 ura3-52/ura3-52</i>	YMJ11 × YKU23
RD301	RD300 except <i>III-205::URA3</i>	YKU34 × YKU23
RD603	RD301 except <i>orc1-4/orc1-4</i>	YMJ25 × YMJ26
RD613	RD301 except <i>orc1-4/orc1-4 rad9Δ/rad9Δ</i>	YMJ35 × YMJ36
RD702	RD300 except <i>orc1-4/orc1-4 pRDN-hyg1</i>	YSI12 × YMJ26
RD703	RD300 except <i>orc1-4/orc1-4 pRDN-hyg1 hygr</i>	treated with
一倍体 <i>orc2-1</i> 変異株の実験		
NOY408-1b	<i>MAT a ade2-1 ura3-1 his3-11 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>	基礎生物研究所の小林武彦博士より分与を受けた
NOY408-1bf	NOY408-1b except <i>lob1Δ::HIS3</i>	基礎生物研究所の小林武彦博士より分与を受けた
NOY408-1bf30	NOY408-1bf except 30copy number of rDNA	本研究
YNV1	NOY408-1b except <i>orc2-1</i>	当研究室の渡辺寛光より分与を受けた
YNV2	NOY408-1bf except <i>orc2-1</i>	当研究室の渡辺寛光より分与を受けた
YNV7	YNV1 except <i>rad9Δ::kanMX</i>	本研究
YNV13	YNV1 except <i>pRDN-hyg,1 hyg<sup>r</sup>, rdnΔ</i>	本研究
YNV14	YNV1 except <i>rdnΔ</i>	本研究
YNV15	NOY408-1bf30 except <i>orc2-1</i>	本研究
rDNA領域短縮株の変異原に対する感受性実験		
TAK320	NOY408-1bf except 80copy number of rDNA	基礎生物研究所の小林武彦博士より分与を受けた
TAK317	NOY408-1bf except 40copy number of rDNA	基礎生物研究所の小林武彦博士より分与を受けた
TAK300	NOY408-1bf except 20copy number of rDNA	基礎生物研究所の小林武彦博士より分与を受けた
TAK417	TAK317 except <i>pRDN-hyg1, hyg<sup>r</sup></i>	本研究
TAK400	TAK300 except <i>pRDN-hyg1, hyg<sup>r</sup></i>	本研究

III-205::URA3は第III染色体III-205にURA3遺伝子が挿入されていることを示し、III-14::ADE2は第III染色体III-314にADE2遺伝子が挿入されていることを示す。

また、表には記していないが、一倍体 *orc2-1* 変異株の実験で使用した株全てに関して、Rad53pを検出するために、*rad53::RAD53-6His3HA-KanMX6*を導入した株を作製した。

表 2. プライマーリスト

プライマー名	使用目的	配列 (5'→3')
dRAD53-6H3Haf	pU6H3HAを用いた <i>RAD53</i> 遺伝子C末端へのtag導入断片の作製(プライマー1)	ATTGATCCTAGTAAAGAAGGTT AAAAGGGCAAATTTGGACCAA ACCTCAAAGGCCCGGAGAAT TTGCAATTTTCGTCCCACCAC
dRAD53-6H3HAr	pU6H3HAを用いた <i>RAD53</i> 遺伝子C末端へのtag導入断片の作製(プライマー2)	CATCATCATCAC TGAATTCGAGTATTGGTATCT ACCATCTTCTCTTAAAAAG GGGCAGCATTTCATGGGTA TTTGTCTTGGACTATAGGGA GACCGGCAGATC
dRAD53-8	<i>RAD53</i> 遺伝子C末端へのtag導入の確認(プライマー1)	AACGACTTGGTAGAGTCACCG
dRAD53-9	<i>RAD53</i> 遺伝子C末端へのtag導入の確認(プライマー2)	AATTCAACGCGTCTGTGAGG
dorc1	<i>ORC2</i> 遺伝子C末端配列の増幅(プライマー1)	ACGCGGATCCGCTGCAATCATATCGGTTCTC
dorc2	<i>ORC2</i> 遺伝子配列C末端の増幅(プライマー2)	ACGCGGATCCGCAAGGACACAGGAAGGTAGTGC
dF2610	<i>orc2-1</i> 変異の導入を確認するためのサイクルシーケンス用プライマー	GGAACTCTATCCGCTAACACAGG
dFYLLD58W	12番染色体のサイズ解析の際に使用するprobe058の作製(プライマー1)	GAATGTTGAACTCTGCGGTTATCC
dRYLLD58W	12番染色体のサイズ解析の際に使用するprobe058の作製(プライマー2)	TTATACCTCCAAGCAAGGTTACGG
drDNA-C1	12番染色体の状態解析、rDNAのコピー数を決定する際に使用するprobeCの作製(プライマー1)	ACCACACTCCTACCAATAACGG
drDNA-C2	12番染色体の状態解析、rDNAのコピー数を決定する際に使用するprobeCの作製(プライマー2)	AACTACAGTTGATCGGACGG
dMCM2-f	12番染色体の状態解析、rDNAのコピー数を決定する際に使用するprobeMCM2の作製(プライマー1)	ACGTGAGGAAGATGATTCGG
dMCM2-r	12番染色体の状態解析、rDNAのコピー数を決定する際に使用するprobeMCM2の作製(プライマー2)	TGACCATAGATAGACGGTGCC
dARS1-f	2番染色体上にあるARS1の複製開始活性を調べる時に使用するprobeARS1の作製(プライマー1)	TGGTGTGATGTAAGCGGAGG
dARS1-r	2番染色体上にあるARS1の複製開始活性を調べる時に使用するprobeARS1の作製(プライマー2)	TCTCGCATTGATGAGGCAACG

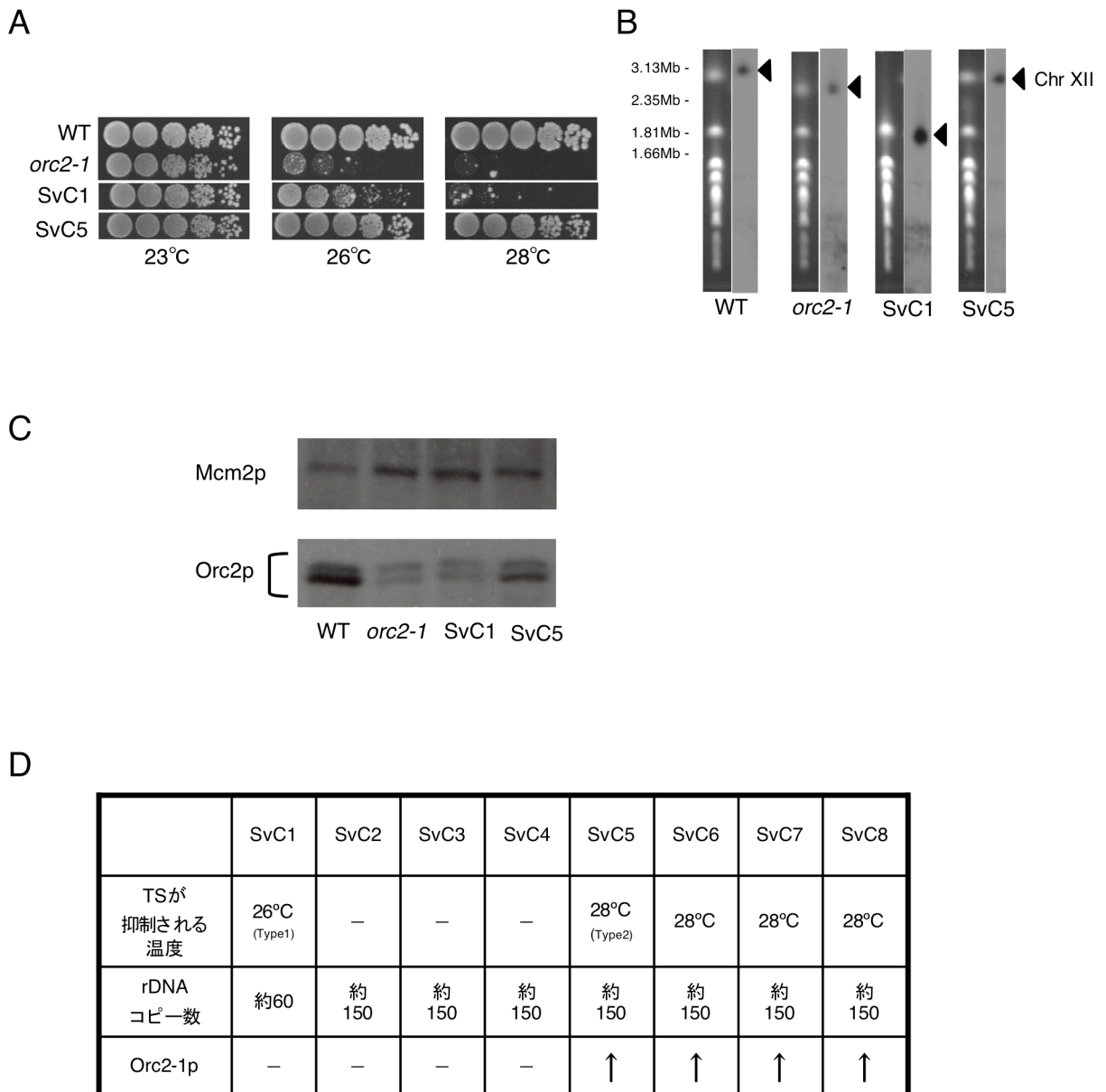


## 結果（第一部）

### 1. *orc2-1* 変異株における高温耐性を獲得した生残菌の出現

まず、最初に、*orc1-4* 変異株で観察された現象の一般性を確認するために、*orc2-1* 変異株においても、生残菌の温度感受性の喪失と rDNA 領域の退縮の相関関係が同様に成立するかを調べることにした。

*orc2-1* 変異株を非許容温度である 26°C で、12 時間培養した後、生き残っていた細胞を YPD プレートにまき、許容温度でコロニーを形成させ、クローンとして回収し、8 つのクローン (SvC1-8) の温度感受性をスポット試験で調べた。その結果、5 つクローンについて、温度感受性が抑制されており、その抑制具合に応じて、2 つのタイプに分類できた (Fig.7.A,D)。26°C では、増殖できるようになっていたが、28°C になると、温度感受性を示す SvC1 をタイプ 1 とし、28°C でも温度感受性が抑制されている SvC5-8 をタイプ 2 と分類した。そして、これら SvC1-8 の 12 番染色体の長さを調べたところ、タイプ 1 である SvC1 の 12 番染色体のみが大きく退縮しており、他の SvC の 12 番染色体は、温度シフト前と同じ長さであった (Fig.7.B)。これらのことから、生残菌で観察されたタイプ 1 の表現型と rDNA 領域の退縮に強い因果関係があることが示唆された。それに対して、タイプ 2 の表現型は、rDNA 領域との短縮との関連が見られなかったのだが、SvC5 の Orc2p 量を調べたところ、*orc2-1* 変異の効果で減少しているはずの Orc2p 量が増加していた (Fig.7.D)。おそらく、これらの細胞では、ゲノム上のどこかにおいて、突然変異または、エピジェネティック変化が起きて、その結果、細胞内の Orc2p 量が増えたため温度感受性が抑制されたと思われる。実際に、他の研究グループにより、プロテオソームの分解経路に関わる遺伝子に突然変異が導入されることによって、*orc2-1* 変異株内の Orc2p の量が回復し、温度感受性が抑制されることが示されている (Shimada et al., 2002)。一方、rDNA 領域が短縮していたタイプ 1 の生残菌では、細胞内の Orc2p 量は、増加していなかった (Fig.7.C)。これらのことから、rDNA 領域が極端に短縮すると、Orc2p 量が回復することとは別に、その温度感受性が抑制されることが示唆された。*orc* 変異株の温度感受性は、DNA 損傷チェックポイントである *RAD9* 遺伝子を欠損させると、部分的に抑制されることから、*orc* 温度感受性は、ゲノム上で発生している DNA 損傷そのものが直接的な原因ではなく、それに呼応して発動する DNA 損傷チェックポイントの細胞死プログラムによるものである。タイプ 1 生残菌において温度感受性が抑制されたのは、rDNA 領域の短縮に伴って、チェックポイントが誘発されなくなったことが原因なのかもしれない。



**Fig.7. *orc2-1*変異株の高温生残菌とrDNA短縮の関係**

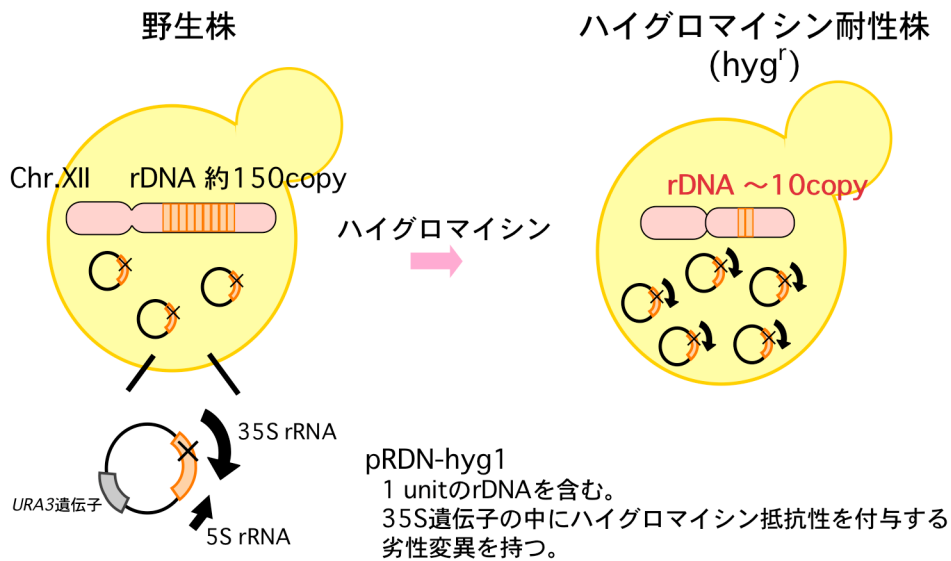
(A) *orc2-1*変異株の高温生残菌の温度感受性について検討した。野生株、*orc2-1*変異株、タイプ1高温生残菌の代表として、SvC1、タイプ2高温生残菌の代表として、SvC5のスポット試験の結果を示した。(B) 各高温生残菌の12番染色体のサイズの解析。(A)で用いた細胞を許容温度で培養した後、染色体を抽出し、パルスフィールドゲル電気泳動によって染色体を分離した。左がエチジウムブロマイド染色の結果で、右が12番染色体に対するプローブ (probe058) によるサザンハイブリダイゼーションの結果。(C) 各高温生残菌の細胞内のOrc2pの量。許容温度で対数増殖している細胞からタンパク質を抽出し、抗Orc2p抗体で検出した。Orc2pは、細胞周期依存的にリン酸修飾を受けるので、対数増殖している細胞内では、リン酸化型と脱リン酸化型の2つのバンドが観察される。インターナルコントロールとして、Mcm2pの量を同時に検出した。(D) 各高温生残菌の温度感受性とrDNAのコピー数とOrc2p量についてまとめた表。

## 2. rDNA 領域のコピー数が減少すると、*orc* 変異株の温度感受性が抑制される

rDNA 領域の短縮が、*orc* 変異株の温度感受性を抑制することの直接の原因であるかどうかを明確にするために、*orc* 変異株の rDNA 領域を人為的に縮めることで、その温度感受性が抑制されるかを調べることにした。前述したように、出芽酵母の rDNA 領域は、150 コピー以上がタンデムに並んでいるが、この領域のコピー数を減らす方法が Chernoff 等によって、編み出されている (Chernoff et al., 1994, Fig. 8. 上図)。簡単に短縮するメカニズムについて説明すると、リボソーム内の 18S rRNA サブユニットを標的とする薬剤 (ハイグロマイシン) と pRDN-hyg1 というプラスミドを用いる。このプラスミドには、rDNA ユニットが一つ組み込まれており、その rDNA ユニット内の 18S rRNA には、ハイグロマイシンに対して抵抗性を付与する劣性変異が導入されている。このプラスミドを細胞に導入し、ハイグロマイシンを処理すると、プラスミド上に組み込まれた rDNA ユニットから、18S rRNA を供給する細胞が選択されてくるのだが、抵抗性 18S rRNA 遺伝子が劣勢変異であるため、選択された細胞では、優性である染色体上の rDNA ユニットのコピー数が、10 コピー以下に極端に減っている。この方法によって、*orc2-1* 変異株と *orc1-4* 変異株の rDNA 領域を短縮させ (*orc2-1 hyg<sup>r</sup>* 株、*orc1-4 hyg<sup>r</sup>* 株 の作製)、短縮前と短縮後の温度感受性について調べた (Fig. 9.A, Fig. 12.A (41 ページ))。その結果、ハイグロマイシンに耐性である *orc1-4* 変異株と *orc2-1* 変異株では、それぞれ 37°C、28°C における温度感受性が部分的に抑制されていた。しかし、この *orc2-1* 変異株の温度感受性のパターンは、生残菌タイプ 1 で観察された温度感受性のパターンと異なり、むしろタイプ 2 の生残菌に近い。そこで、Orc2p 量が回復しているのではないかと疑い、Orc2p 量を測定したところ、予想通り、ハイグロマイシンから除去した直後の *orc2-1 hyg<sup>r</sup>* では、親株である *orc2-1* 変異株と比べて、細胞内の Orc2p 量が増加していた (Fig. 9.B)。このことから、ハイグロマイシンの影響、または rDNA 領域のほとんどが欠損したため、タイプ 2 生残菌と同じように、細胞内の Orc2p 量が増え、その結果、温度感受性が抑制されてしまったと思われる。

そこで、次に rDNA 領域を短縮する方法に、若干改良を加え、短縮細胞を作製し、rDNA 短縮が温度感受性抑制の直接的な原因となるかを再度調べた。rDNA 領域を短縮するステップは、先ほどと同様にハイグロマイシンと pRDN-hyg1 を用いて、プラスミド導入後、薬剤処理を行い、rDNA 領域が短くなった細胞を選択する。ハイグロマイシンを除去し、短縮細胞を何世代か培養した後、5-FOA を含む SC プレート上にまき、プラスミドを落とした細胞を採取する。(Fig. 8. 下図. *orc2-1 rdn $\Delta$*  株の作製法) そうして、選択された *orc2-1 rdn $\Delta$*  株は、ハイグロマイシンの影響をほとんど受けず、かつ染色体上の rDNA 領域から、rRNA の転写が行われており、タイプ 1 生残菌の細胞内の状態に非常に似通っていると思われる。しかし、このプラスミドを落とすステップを踏むと、一つ問題が浮上する。それは、プラスミドを除去すると、染色体上の rDNA 領域から再び転写が行われ始め、それと同時にコピー数を増幅する機構が働きだす。その作用で、コピー数が減少した rDNA 領域が再び、元の 150 コピーに戻

## rDNA短縮株 ver1 (*hyg<sup>r</sup>*株の作製法)



## rDNA短縮株 ver2 (*rdnΔ*株の作製法)

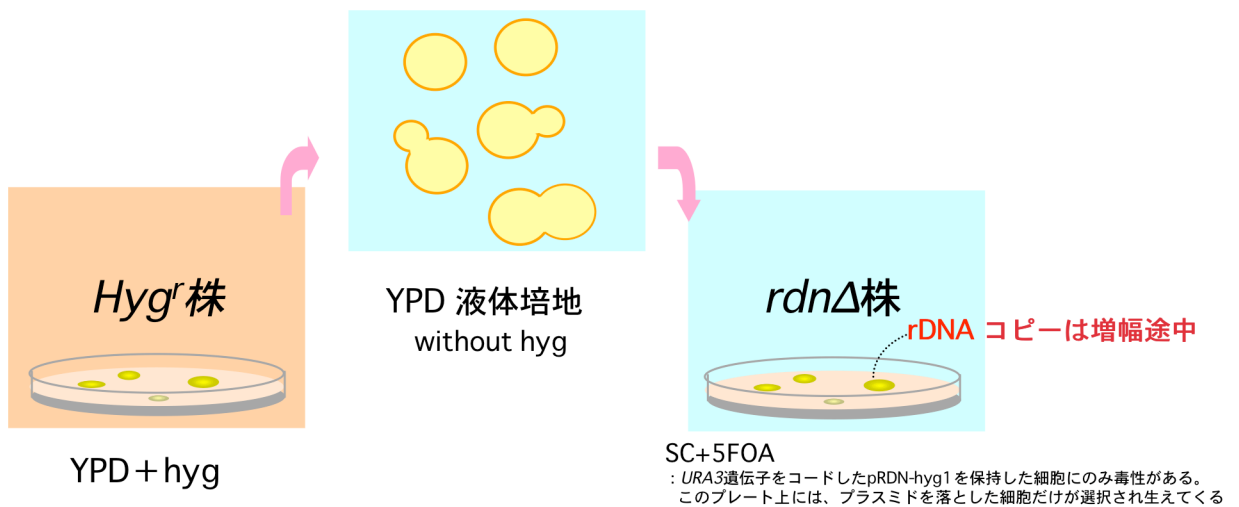
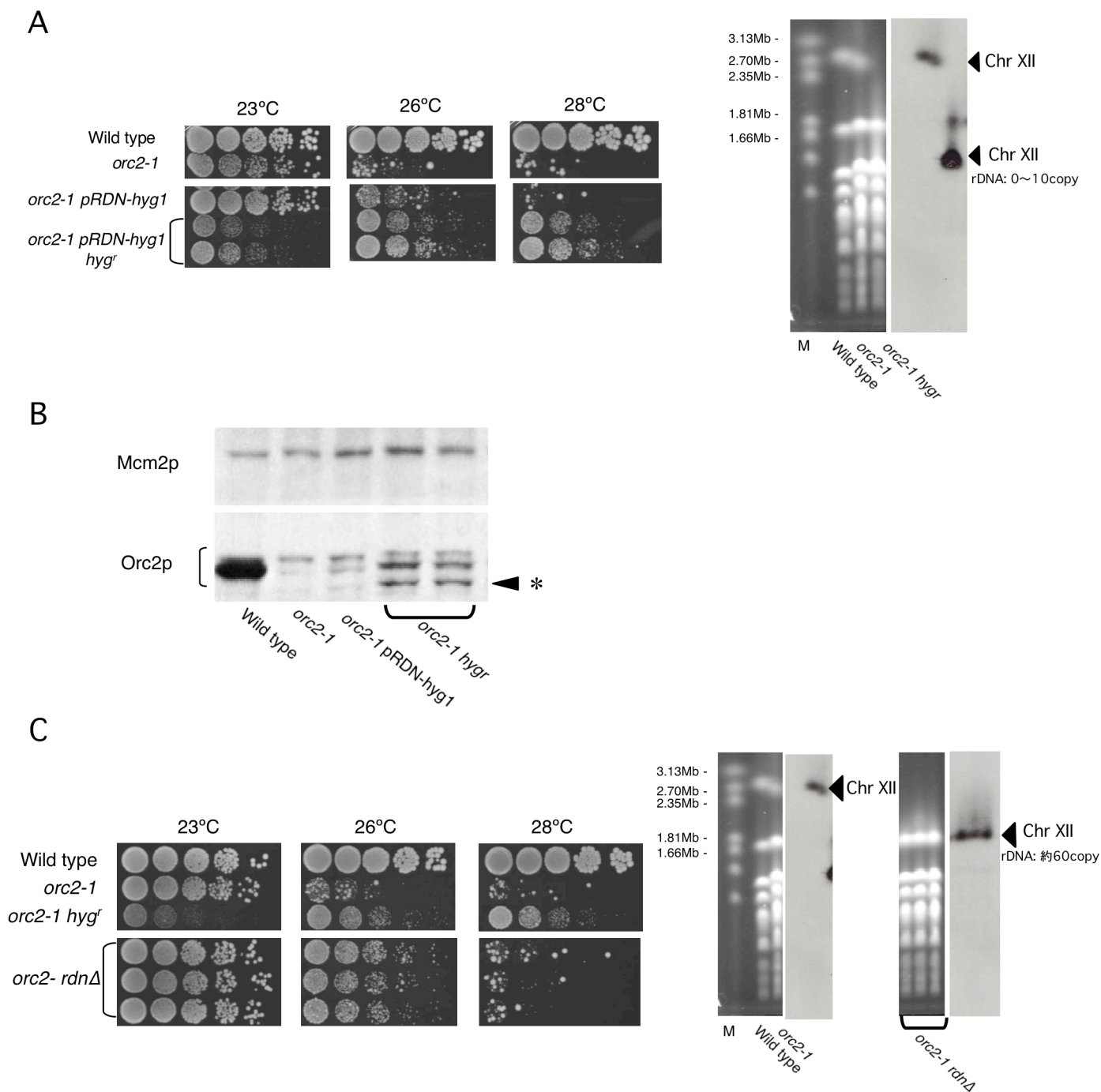


Fig.8. rDNA領域のコピー数を減少させる方法

Chernof等によって考案された、プラスミドpRDN-hyg1とハイグロマイシンを用いたrDNA領域のコピー数を短縮する方法(*hyg<sup>r</sup>*株の作製法)。*hyg<sup>r</sup>*株を一度、非選択培地であるYPDで培養させ、その後、SC+5FOAにまくことで、プラスミドを落とした細胞を選択する。この過程によって、薬剤から解放し、かつプラスミドを落としたrDNA短縮株(*rdnΔ*株)を作製した。方法についての詳細は、本文または材料と方法を参照。

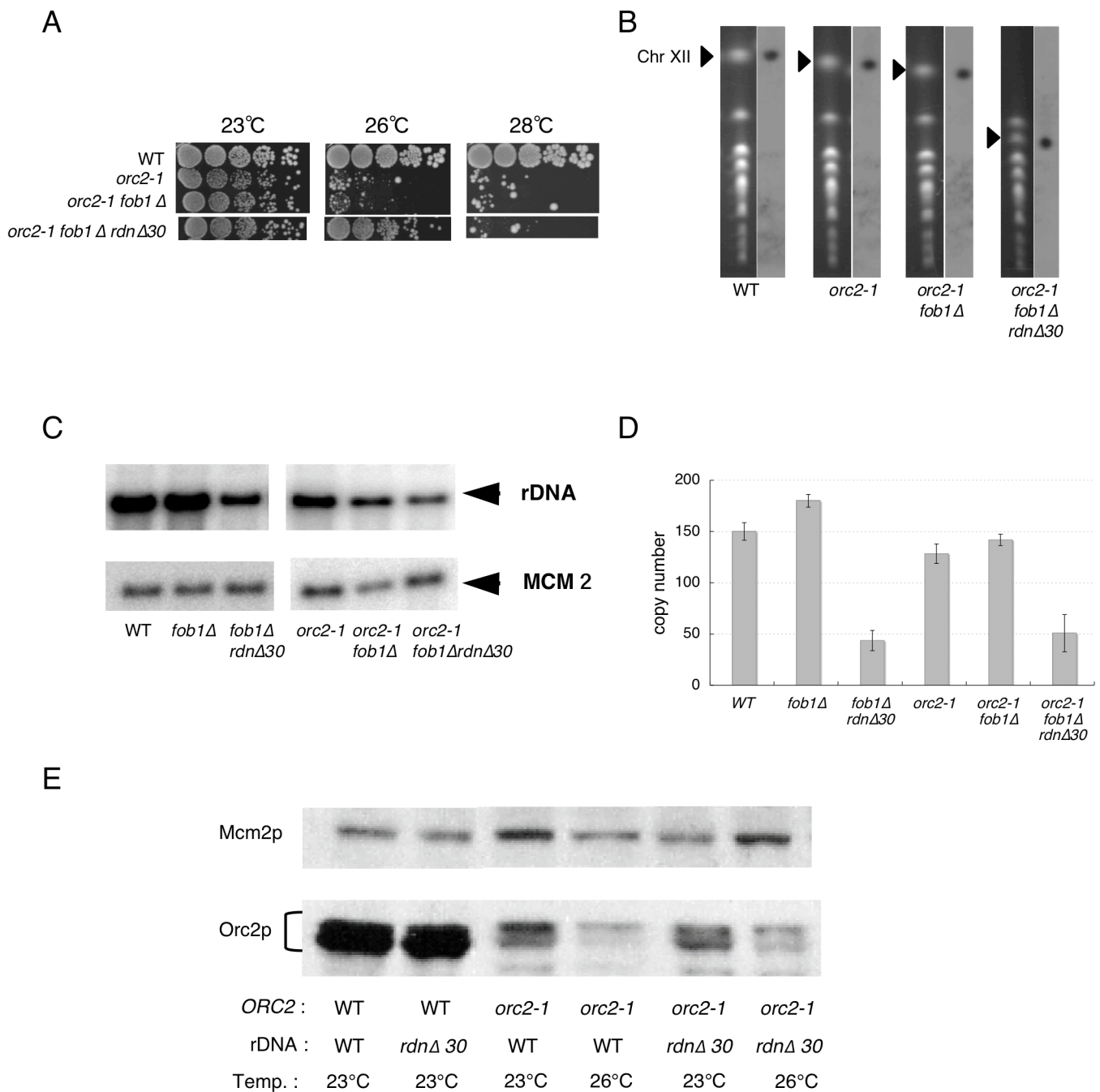


**Fig.9. rDNA領域を短縮させると、*orc2-1*変異株の温度感受性は抑制される**

(A)*orc2-1hyg*株の温度感受性の検討。スポット試験によって温度感受性について調べ、同時に各細胞のrDNA領域の長さをパルスフィールドゲル電気泳動によって、確認した。(B)*orc2-1 hygr*株のOrc2p量の測定。ハイグロマイシン処理によって、小さなバンドが新たに出現する(\*)。(C)*orc2-1 rdnΔ*株の温度感受性の検討。スポット試験と同時に、パルスフィールドゲル電気泳動によって、rDNA領域の短縮を確認した。

ろうとする。この増幅速度は、1細胞分裂の度に1コピーとゆるやかだが、確実に起こる。このコピー数の増幅機構は、基礎生物学研究所の小林武彦博士によって、詳細に研究されており、その増幅機構のモデルが提案されている (Kobayashi et al., 1998)。小林博士の研究の中で、増幅因子として、rDNA ユニット内の複製フォークの進行を阻害する部位 (**Replicaton Fork Block: RFB**) とそこに結合し、実際に複製フォークの進行を阻害するタンパク質 **Fob1p** が同定されている (Kobayashi et al., 1996, Fig6-2)。FOB1 遺伝子を欠損させると、転写が起こっても、増幅機構は働かず、コピー数を短いままに固定することが可能である (Kobayashi et al., 1998)。そこで、念のために、プラスミドを落とした後、細胞を扱う過程で、*orc2-1 rdnΔ*株のコピー数が元に戻る可能性を懸念して、短縮後 *FOB1* 遺伝子を欠損させた、*orc2-1 fob1ΔrdnΔ*株を同時に作製し、*orc2-1 rdnΔ*株と *orc2-1 fob1ΔrdnΔ*株の温度感受性パターンをそれぞれの親株 *orc2-1* 変異株、*orc2-1 fob1Δ*株と比較した。その結果、*orc2-1 rdnΔ*株は、26°Cでは、生えてくるが、28°Cで生えてこず、部分的に温度感受性が抑制されていた (Fig.9.C.左図)。その時のスポッティング直前の細胞の rDNA 領域のコピー数を確認したところ、12番染色体の長さから推定すると、約60コピーであった (Fig.9.C.右図)。また同様に、*orc2-1 fob1ΔrdnΔ*株も26°Cでは生えてくるが、28°Cでは生えてこなかった (Fig.10-1.A)。*orc2-1 fob1ΔrdnΔ*株の rDNA 領域のコピー数は、予想通り *orc2-1 rdnΔ*株ほど増幅していなく、約30コピーぐらいであった (Fig.10-1.B.以下、*orc2-1 fob1Δ rdnΔ30*株と命名)。この *orc2-1 rdnΔ*株と *orc2-1 fob1ΔrdnΔ30*株の温度感受性パターンは、タイプ1生残菌のパターンとほぼ一致した。

次に、継代してもコピー数が安定に維持される *orc2-1 fob1ΔrdnΔ30*株を用いて、rDNA 領域のコピー数が本当に減少していること、そして短縮することによって **Orc2p** 量が減少したままであることを確認することにした。これまでは、12番染色体のサイズによって、rDNA 領域のコピー数を推定してきたが、rDNA ユニット内に一つの認識部位をもつ制限酵素 *BglIII* によって処理し、その時のバンドの濃さで、決定した (Fig.10.C.D)。野生株を150コピーとすると、平均値は40コピーであったが、値の振れが大きく、標準偏差の範囲内に30コピーも含まれており、PFGE から推定した値とほぼ一致した。このことから、rDNA 領域の短縮処理によって、rDNA 領域のコピー数が減少していることが確認できた。続いて、温度シフト前後の細胞の **Orc2p** 量を抗 **Orc2p** 抗体によって測定した (Fig.10.E)。許容温度で培養している *orc2-1 fob1ΔrdnΔ30*株の **Orc2p** 量は、短縮前の *orc2-1 fob1Δ*株と同様に、許容温度下でも、非常に少なく、温度シフトとすると、その量が更に減少した。このことから、*orc2-1 fob1ΔrdnΔ30*株では、タイプ2生残菌や *orc2-1 hyg<sup>r</sup>*株と異なり、変異型 **Orc2p** (**Orc2-1p**) の量が上昇していないことがわかった。以上に示した人為的な rDNA 領域の短縮実験によって、rDNA 領域のコピー数が減少すると、*orc* 変異株の温度感受性が抑制されることが示された。



**Fig.10. rDNA領域を短縮させると、*orc2-1*変異株の温度感受性は抑制される**

(A)スポット試験による*orc2-1*変異株、*orc2-1 fob1Δ*株、*orc2-1 fob1ΔrdnΔ30*株の温度感受性の検討。(B)パルスフィールドゲル電気泳動による各株の12番染色体のサイズの解析。(C)制限酵素*Bgl* IIを用いたrDNAコピー数の確認。制限酵素*Bgl* IIでrDNA領域を1ユニット単位に切断した後、アガロースゲル電気泳動を行い、rDNAユニットに結合するプローブ(probeC)を用いて、サザンハイブリダイゼーションを行った。rDNAのバンドの濃さによって、コピー数が算出できる。*MCM2*遺伝子をインターナルコントロールとして利用した。(D) (C)のサザンハイブリダイゼーションの結果をグラフで表した。各株について、4回実験を行い、それを平均して、コピー数を算出した。但し、野生株のコピー数を150コピーと仮定して、それに対する相対値で、他の株のrDNAのコピー数を表した。(E)*orc2-1 fob1Δ*株と*orc2-1 fob1ΔrdnΔ30*株の細胞内のOrc2p量の比較。許容温度23°Cで対数増殖している細胞と26°Cに温度シフトした後6時間後の細胞からタンパク質を抽出し、抗Orc2p抗体を用いて、細胞内のOrc2p量を測定した。Mcm2pをインターナルコントロールとして、利用した。

### 3. rDNA 領域のコピー数が減少すると、*orc* 変異株では、チェックポイントが活性化されにくくなる

*orc* 変異株では、チェックポイント依存的に温度感受性を示すことから、rDNA 領域の短縮によって、温度感受性が抑制されることの原因として、チェックポイントの誘発が弱くなっていることが1つの候補として挙げられる。そのことを検証するために、*orc2-1 fob1Δ rdnΔ30*株の温度シフトした後のチェックポイントの活性化を FACS による細胞周期の分布の解析とチェックポイントキナーゼである Rad53p のリン酸化を指標に調べた (Fig.11)。親株である *orc2-1* 変異株、*orc2-1 fob1Δ*株は、26°C に温度シフトした後、9 時間後には、2C の細胞が蓄積し、G2/M 期での細胞周期の停止が観察されるが、それに対して *orc2-1 fob1Δ rdnΔ30* 株では、温度シフト後 9 時間でも 1C の細胞の表すピークが残っており、G2/M 期での停止が観察されない。26°C にシフトした後の Rad53p のリン酸化のパターンを比べると、*orc2-1 fob1Δ rdnΔ30* 株でも Rad53p は、一見コントロールと同様にリン酸化されているように見える。しかし、シフト後 3 時間、6 時間の時点で、リン酸化されていない Rad53p がより多く残っており、親株である *orc2-1* 変異株、*orc2-1 fob1Δ*株との間に有意な差があった。また、温度シフト前 (0 時間の時点)、つまり、23°C で増殖している時、親株では、Rad53p の一部がリン酸化修飾を受けていたが、それに対して、*orc2-1 fob1Δ rdnΔ30* 株では、リン酸化を受けた Rad53p は、ほとんど観察されなかった。*orc1-4*変異株においても、同じ様にチェックポイントの誘発の低下が観察された (Fig.12.B)。このことから、rDNA 領域のコピー数を減少させることで、*orc* 変異株でのチェックポイント応答の誘発が弱まることがわかった。つまり、rDNA 領域を短縮する効果は、複製開始制御の異常が生じ、それがチェックポイント機構のエフェクターキナーゼである Rad53p にシグナルが伝わるまでのどこかの過程に影響を及ぼしていると思われる。その結果、チェックポイント依存的な細胞死が起こらなくなり、温度感受性が抑制されると考えられる。



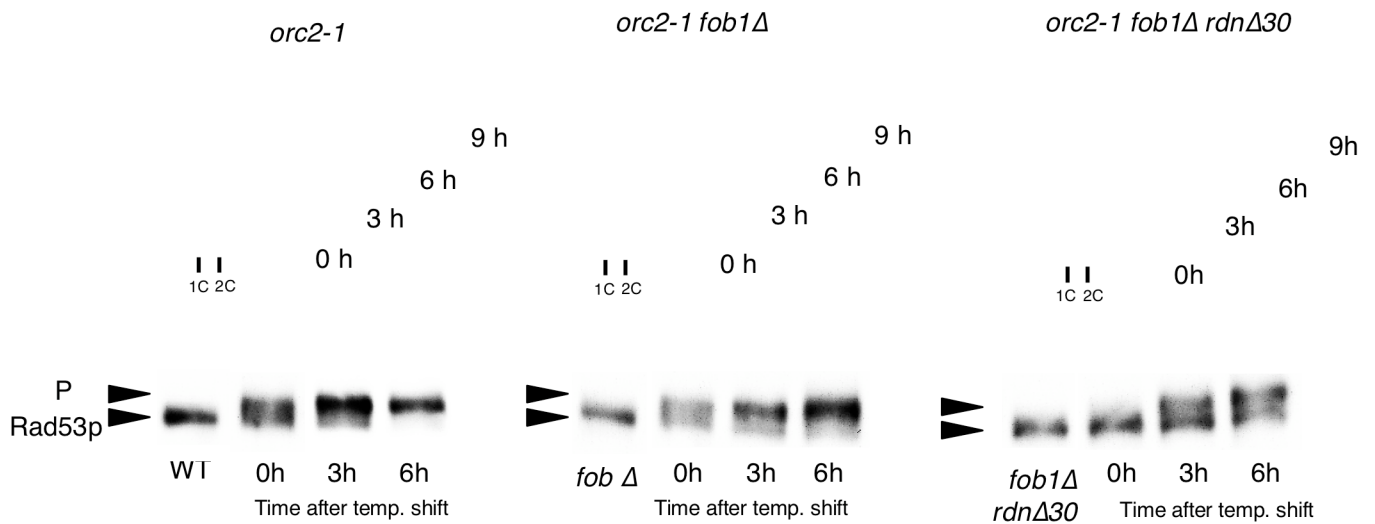
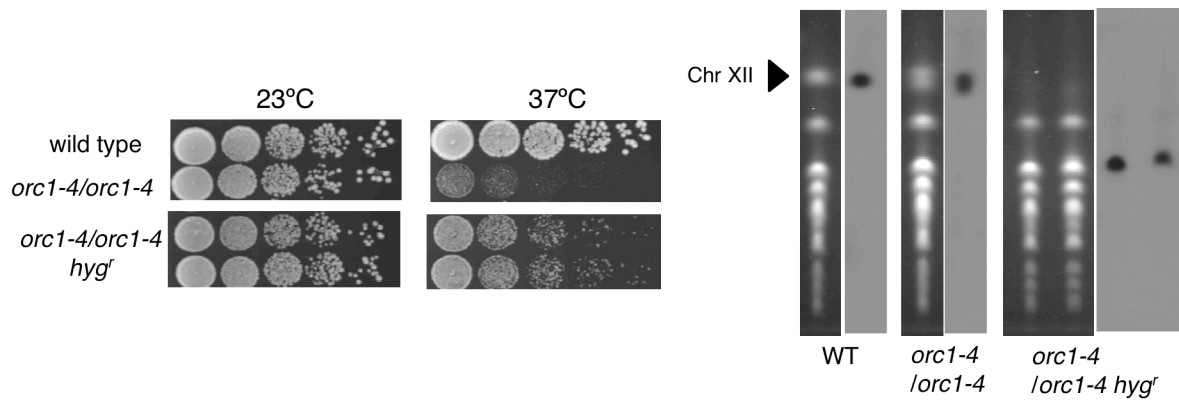


Fig.11. rDNA領域を短縮させると、*orc2-1*変異株でのDNA損傷チェックポイントが誘発されにくくなる

*orc2-1*変異株、*orc2-1 fob1Δ*株、*orc2-1 fob1ΔrdnΔ30*株のDNA損傷チェックポイントの活性化の比較。上のヒストグラムは、FACSによる細胞周期の分布の経時的な解析を表す。下図は、各株のRad53pのウエスタンブロッティングの結果で、Pはリン酸化修飾を受けたRad53pを示している。一番左のレーンに各株の親株にあたる野生株、*fob1Δ*株、*fob1ΔrdnΔ30*株のRad53pを同時に流した。

A



B

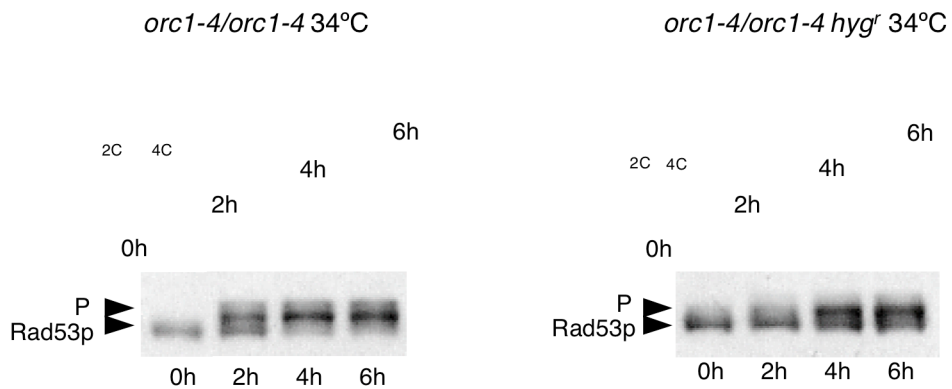


Fig.12. rDNA領域を短縮させると、  
*orc1-4*変異株の温度感受性は抑制される

(A)スポット試験による*orc1-4/hyg<sup>r</sup>*変異株の温度感受性の検討とパルスフィールドゲル電気泳動を用いたrDNA領域の短縮の確認。(B)*orc1-4/hyg<sup>r</sup>*株の温度シフト後のチェックポイント応答の活性化。FACSによる細胞周期の分布の解析とRad53pのリン酸化について調べた。

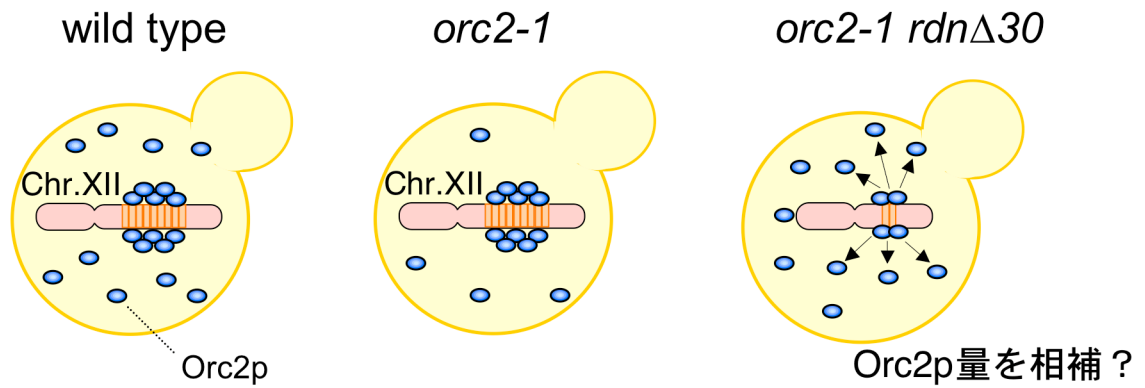
#### 4. rDNA 領域の短縮によって *ORC2* の機能欠損が相補された可能性の検証

*orc* 変異株において、rDNA 領域のコピー数が減少した時、DNA 損傷チェックポイントが誘発されにくくなるのは、なぜであろうか？

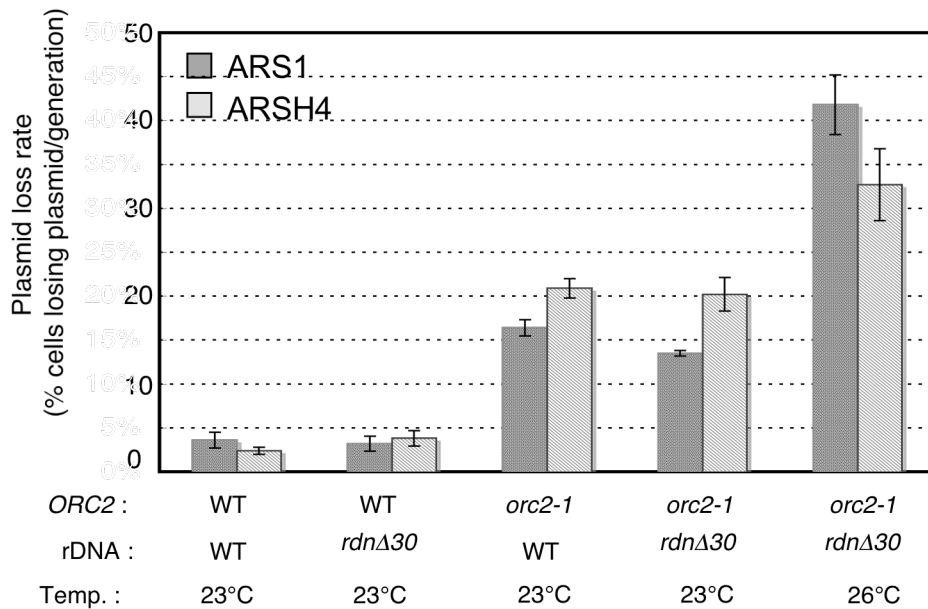
rDNA 領域には、各ユニットに ORC 結合する ARS が存在し、全体で約 150 部位あり、ゲノム全体の ORC 結合部位の約 1/4 を占める (Raghuraman et al., 2001, Wyrick et al., 2001)。このことを考慮すると、rDNA 領域の短縮によるチェックポイントの感度の低下を説明する一つの可能性が考えられる。それは、rDNA 領域のコピー数が減少することで、そこに結合している ORC が遊離して、その結果、少なくなった *Orc2p* 量を補い、ゲノム全体の複製起点の活性が部分的に回復する可能性である。*orc2-1* 変異株では、*orc2-1* 変異によって、細胞内の *Orc2p* が少なくなっているが、rDNA 領域から遊離してきた *Orc2p* によって、その機能欠損自身が回復する可能性は十分考えられる (Fig.13.A)。このことを検証するために、*orc2-1* 変異株内全体の複製開始能を rDNA 短縮前後で変化していないかを比較することにした。細胞内の複製開始能を測定する方法として、ARS 依存的に細胞内で複製されるプラスミド (ARS-プラスミド) を用いる方法が知られている (Dani et al., 1983)。細胞内の複製開始能は、そのプラスミドを導入した後、細胞を培養した時にプラスミドを喪失する頻度で調べられる。実際、ORC, *Cdc6p*, *Mcm2-7p* などの複製開始制御の変異体では、野生株に比べて、分裂ごとに ARS-プラスミドを高頻度に落とすことが示されている (Foss et al., 1993)。そこで染色体上の ARS が組み込まれた 2 種類のプラスミド (*pRS414* : *ARSH4* or *YCplac111* : *ARS1*) を用いて、調べたところ、ORC が正常に機能している *fob1Δ* 株、*fob1ΔrdnΔ30* 株では、それぞれの細胞分裂ごとのプラスミドの喪失頻度は、5%以下であった (Fig.13.B)。一方で、*orc2-1 fob1Δ* 株では、*ARSH4* は 21%、*ARS1* は 16% と高頻度であり、それと同様に、rDNA 領域を短縮した *orc2-1 fob1ΔrdnΔ30* 株も、高頻度にプラスミドを落とすことがわかった (Fig.13.B)。このことから、rDNA 領域が短縮しても、*orc2-1* 変異株では、ゲノム全体の複製起点の活性が上昇していないことが示唆される。

以上の結果から、rDNA 領域を短縮した時、ORC 機能欠損自身の回復が原因で、チェックポイントの感度の低下が起きたわけではないことが明らかになった。

A



B



### Fig.13. rDNA領域を短縮させても、 ゲノム全体の複製起点の活性は上昇しない

(A)rDNA領域を短縮させた時、そこに結合していたOrc2pが遊離し、ゲノム全体に分布した様子を表した。(B)*orc2-1* 変異株、*orc2-1 fob1Δ rdnΔ30* 株のプラスミドの喪失頻度。ARS依存的に保持される2つのプラスミド(YCplac111: ARS1:濃い灰色の棒グラフ、pRS414:ARSH4:薄い灰色の棒グラフ)をそれぞれ細胞に導入した後、非選択液体培地において、23°C、26°Cで対数増殖させた時、一回の細胞分裂ごとのプラスミドを落とした細胞の出現頻度を算出した。

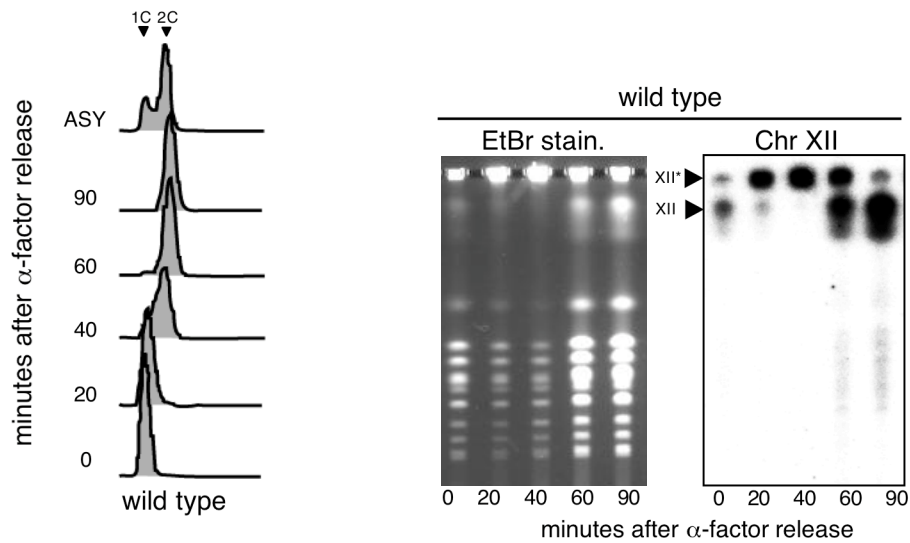
## 5. *orc2-1* 変異株では、rDNA 領域で特異的に複製遅延が起きており、rDNA 領域が短縮すると、その遅延が緩和される

染色体異常頻度の測定実験により、rDNA 領域は、チェックポイントによるゲノム安定性維持能を無視して、不安定化を起こすことが示されたことから、rDNA 領域上では、DNA 損傷が多発することが示唆される。このことから、rDNA 領域の短縮によるチェックポイント活性化の感度の低下は、rDNA 領域上の DNA 損傷が減少したためではないかと考えられる。rDNA 領域上で生じている DNA 損傷は、ゲノム全体で生じる DNA 損傷の大きな割合を占めているのかもしれない。もし、そうであるならば、*orc* 変異株において、rDNA 領域のコピー数が少なくなることに伴い、トータル DNA 損傷の量も低下して、細胞全体の DNA 損傷チェックポイントの活性化が低下するだろう。

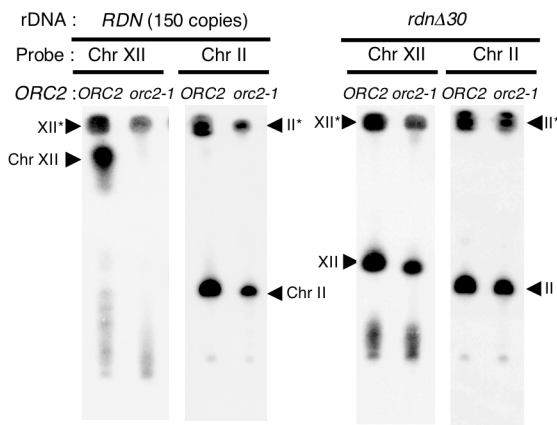
そこで、rDNA 領域上で生じる DNA 損傷がゲノム全体の大部分を占めること、そして、rDNA 領域のコピー数低下に伴い、その DNA 損傷の量が減少することを明らかにすることにした。そのために、DNA 損傷が主に DNA 複製過程で発生していることに着目し、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を用いて、rDNA 領域がコードされている 12 番染色体の複製の状態を調べた。対数増殖している細胞の染色体を抽出して、それを PFGE にかけて、Y 構造やバブル構造などの複製中間体や組み換え中間体を含む染色体は泳動されず、ウェルに残る (Hennessy et al., 1991, Karilaman et al., 2002)。泳動されない染色体は、DNA 複製途中または組み換え修復途中であることを意味しており、ウェルに残ったバンドとゲル内に泳動されたバンドの比によって、それぞれの染色体に対して、複製途中、修復途中のものがどれだけあるかを算出できる。実際、野生株を G1 期で同調し、その後 S 期、G2/M 期に進行させると、S 期の時期においてのみ、染色体のほとんどがウェル内残る (Fig.14.A)。

許容温度で対数増殖している野生株、*orc2-1* 変異株を 26°C に温度シフトし、6 時間培養した後、染色体を抽出し、PFGE を行った。次に、rDNA 領域がコードされている 12 番染色体とコードされていない 2 番染色体を検出用のプローブ (ChXII : probe 058, ChII : probe MCM2) によって、ウェルに残っている染色体のおおまかな割合を算出した結果、2 番染色体に関しては、野生株、*orc2-1* 変異株ともにウェルに 30~40% ほど残っており、ほとんど差がなかった (Fig.14.B.C)。これは、2 番染色体では、複製開始制御の乱れに伴い、複製中間体や組み換え中間体の蓄積していないことを示唆している。一方、12 番染色体は、野生株では約 35% がウェルに残るが、*orc2-1* 変異株では、染色体の約 75% が泳動されていないままであった (Fig.14.B.C)。このことから、*orc2-1* 変異株では 12 番染色体のほとんどが複製途中、修復途中であることが示された。これは、rDNA 領域上で、DNA 損傷が多発していることを反映していると思われる。2 番染色体がほとんど影響を受けていないこと合わせて考えると、rDNA 領域上で生じた DNA 損傷がゲノム全体の大部分を占めていることが推察される。

A



B



C

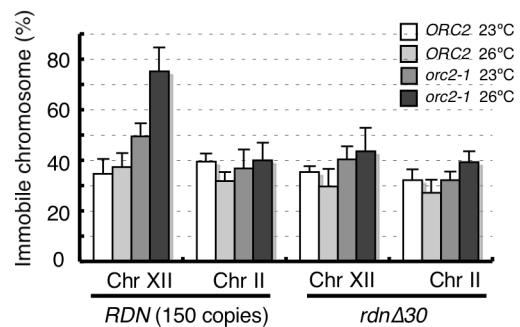


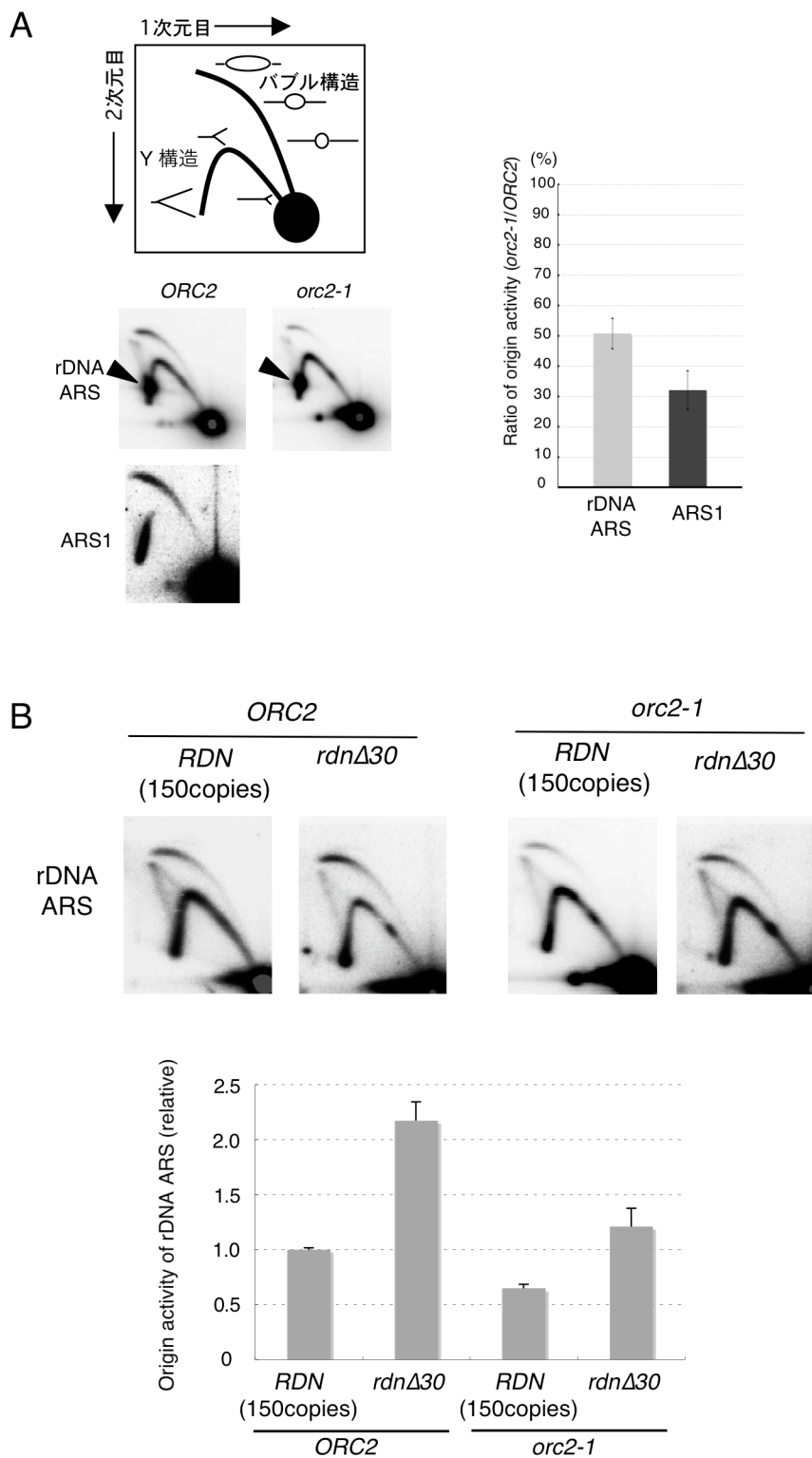
Fig.14. *orc2-1*変異株では、12番染色体の複製は顕著に遅くなっており、その遅れはrDNA領域のコピー数を減少させることで解消される

(A) 複製途中の染色体は、泳動されずウェルに残ることを示した一例。野生株をαファクターによって、G1期に同調した後、αファクターを洗い流し、S期、G2/M期と細胞周期を進行させた。その時のFACSによる細胞周期の分布の変化(左図)と各時点での染色体状態をパルスフィールドゲル電気泳動により分離したもの(右図)を示す。(B) 野生株、*orc2-1*変異株、*rdnΔ30*株、*orc2-1 fob1Δ rdnΔ30*株の12番染色体と2番染色体の状態をパルスフィールドゲル電気泳動によって比較した。26°Cで6時間培養した後の細胞を採取し、染色体を抽出した後に、パルスフィールドゲル電気泳動で、染色体を分離した。12番染色体に結合するプローブ(probe058)、または2番染色体に結合するプローブ(probeMCM2)によるサザンハイブリダイゼーションによって検出した。電気泳動後、ゲル内に泳動されず、ウェルに残った染色体をII\*またはXII\*と記した。(C) 野生株、*orc2-1*変異株、*rdnΔ30*株、*orc2-1 fob1Δ rdnΔ30*株の各染色体で、ゲル内に泳動されず残ったものの割合(II\*またはXII\*)を表すグラフ。全て、独立した3つのサンプルから、平均と標準偏差を算出した。

次に、rDNA 領域のコピー数を減らすことで、12 番染色体で、複製、修復の遅延が解消されるかを *orc2-1* 変異株、*orc2-1 fob1ΔrdnΔ30* 株を比較して調べることにした (Fig.14.B)。*orc2-1 fob1ΔrdnΔ30* 株では、ウェルに残っている 2 番染色体の割合は、*orc2-1* 変異株と同じであるが、12 番染色体については、ゲル内に泳動されたバンドが目ではっきりと観察された。ウェルに残っている割合を正確に算出すると、42%に減少し、2 番染色体とほぼ同程度の割合になった。このことから、rDNA 領域のコピー数が減少することに伴い、複製中間体や組み換え中間体が少なくなることがわかった。rDNA 領域上で発生する DNA 損傷が減っていることが示唆される。

## 6. *orc2-1* 変異が rDNA 領域上の複製起点の活性に与える影響

では、なぜ、コピー数が減少することで、*orc2-1* 変異株での rDNA 領域の複製の遅延が解消されたのであろうか。そのことを明らかにするために、ORC の機能が欠損した時、各株での rDNA 領域の複製起点 (rDNA ARS) が受ける影響について、二次元ゲル電気泳動を用いて調べることにした。二次元ゲル電気泳動は、複製中間体を構造ごとに分けることができる (Brewer et al., 1987)。複製起点付近の DNA を制限酵素で切り、二次元ゲル電気泳動にかけると、複製開始した後の構造 (バブル構造)、隣接した領域から進行してきた複製フォークなどを表す Y 型の構造 (Y 構造) に分けられる (Fig.15.A.左上模式図)。また、複製途中ではない DNA は、一次元目、二次元目共により早く移動し、強いスポットして現われる。複製開始活性は、複製開始したことを示すバブル構造を S 期の細胞に比例する Y 構造で割ることで算出できる。この方法により、rDNA 領域の各ユニットにコードされている複製起点の活性について調べたところ、*orc2-1* 変異株では、予想通り、バブル構造の量が減っており、野生株の半分ほどになっていた (Fig.15.A)。他のゲノム領域の複製起点と比較する意味で、4 番染色体上にある ARS1 について調べたところ、30%までに低下していた。このことから、rDNA 領域上にある複製起点が、取り分け大きな影響を受けているのではないことがわかった。野生株の rDNA 領域では、およそ 5 個の内 1 個の ARS が活性化するのだが、その活性が半分になっている *orc2-1* 変異株では、その複製開始頻度は、10 個の内 1 個になっていると予想される (Fig.16)。続けて、*orc2-1 fob1Δ rdnΔ30* 株について調べると、興味深いことに、rDNA ARS の複製開始活性は野生株と同じくらいのものであった (Fig.15.B)。そして、rDNA 短縮細胞 (*ORC2<sup>+</sup>*) の複製開始活性を調べると、バブル構造の量が野生株の 2 倍に上昇していた (Fig.15.B)。このことから、rDNA 領域のコピー数が低下すると、複製開始頻度が 5 個の内、2 個に増加するので、*orc* 変異の影響で複製開始活性が半分に低下しても、野生株と同等のレベルを維持することができることが明らかになった。コピー数の低下に伴って、rDNA 領域での複製開始能が増強した結果、Orc2p の機能欠損の効果が相殺されたことが推察される。このコピー数の変化による複製開始能の調節が原因で、*orc2-1* 変異株での特異的な rDNA 領域の複製遅延が緩和されたと思われる (Fig.16)。



**Fig.15. *orc2-1*変異がrDNA領域上の複製起点の活性に与える影響**

(A) *orc2-1*変異株におけるrDNA領域の複製起点(rDNA ARS)と4番染色体上にある複製起点(ARS1)の複製開始活性の低下の程度を表した。左上の模式図は、制限酵素処理後、二次元ゲル電気泳動によって、複製起点付近のDNAを分離した時のパターンを示す。左下の写真は、野生株、*orc2-1*変異株におけるrDNA ARS、ARS1の二次元ゲル電気泳動の結果。rDNA ARS上にある矢印は、Fob1pに依存した複製進行阻害点を表す。右の棒グラフは、*orc2-1*変異株における各複製起点の活性が低下した割合を示す。各複製起点の複製開始活性をバブル構造/Y構造で算出し、野生株を100%とした時の割合で記した。全て独立した2サンプルをもとに、定量を行い、平均と標準偏差を算出した。

(B) *orc2-1fob1Δ*株、*orc2-1 fob1ΔrdnΔ30*株でのrDNA領域の複製起点の複製開始活性の低下の比較。*fob1Δ*、*orc2-1fob1Δ*、*fob1Δ*、*rdnΔ30*、*orc2-1 fob1ΔrdnΔ30*株の複製開始頻度を二次元ゲル電気泳動によって測定した。上の写真は、各株の二次元ゲル電気泳動の結果を示す。下の棒グラフでは、各株のrDNA ARSの複製開始活性をバブル構造/Y構造で算出し、*fob1Δ*株の複製開始活性を1として、それに対する比で表した。



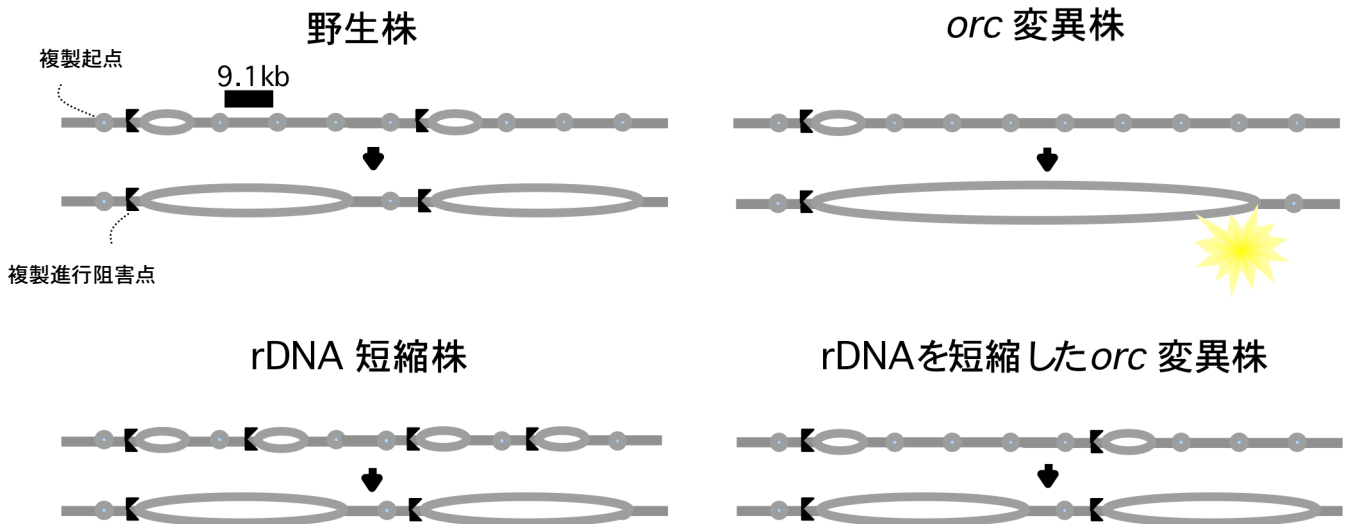


Fig.16. rDNA領域の複製の状況

野生株、*orc2-1*変異株、rDNA短縮株、rDNA領域を短縮した*orc2-1*変異株のrDNA領域の複製の状態を図解した。野生株では、rDNA領域の各ユニットにある複製起点は、5個のうち1個が活性化される。その時形成される2つの複製フォークの片方は、すぐに複製阻害点において進行が阻害されるので、この領域のほとんどは、もう片方の複製フォークによって複製される。*orc2-1*変異株では、複製開始頻度が野生株の半分に落ちこんでいるので、10個に1個しか活性化されなく、その結果、一つ当たりの複製フォークの距離が長くなる。rDNA短縮株では、複製開始頻度が野生株の2倍に上昇しているため、5個のうち、2個が活性化している。そのため、rDNA領域を短縮した*orc2-1*変異株では、*orc2-1*変異の効果で、複製開始頻度が半分になっても、まだ5個のうち1個が活性化されており、野生株と同じパターンが保たれる。

また、この時の二次元ゲル電気泳動のパターン結果を、*orc2-1* 変異株で特異的に観察される DNA 複製中間物に注意して見ていくと、Y 型構造の DNA 上に、わずかに強くなっている一つのスポットが検出された(Fig.17)。このスポットは、5S rRNA 遺伝子がコードされている位置に相当する。これは、*orc2-1* 変異株での rDNA 領域の複製遅延を引き起こしている原因の一つかもしれない。

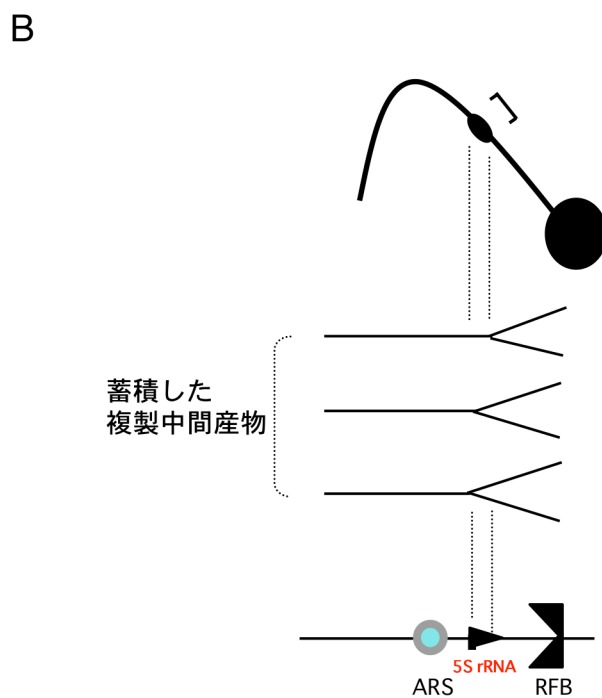
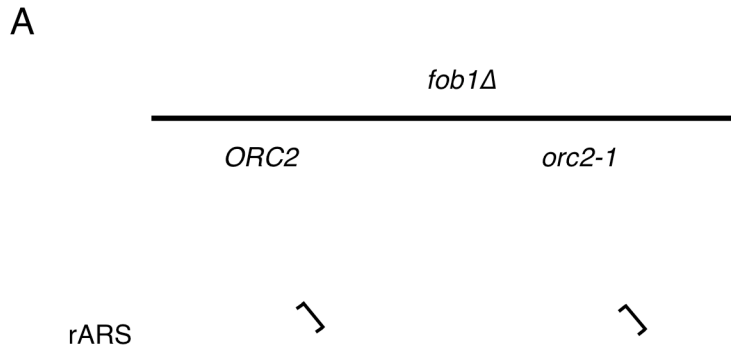


Fig.17. *orc2-1*変異株でスポットとして観察された複製中間物

(A) 二次元ゲル電気泳動によって分離されたrDNA領域の複製中間物。Fig15.Aの*fob1Δ*株、*orc2-1 fob1Δ*株のデータを露光時間を短くすることで、Y型DNA構造上のスポットを見やすくした。

(B) Y型DNA構造上に観察されたスポットの解説。観察されたスポットは、左向きに進んでいる複製フォークが5S rRNA遺伝子がコードされているところを通過した時にできる複製中間産物に相当する。この部位で、複製フォークの進行が阻害され、複製フォークの進行の遅延、または停止が起きていることが推察される。*fob1Δ*株を用いているので、RFB でのスポットは観察されない。

## 考察（第一部）

### 1. rDNA 領域で DNA 損傷が高頻度に発生する

*orc1-4* 変異株と *orc2-1* 変異株における rDNA 領域の短縮と温度感受性の抑制の関係について調べたところ、rDNA 領域が複製開始の乱れに対して脆弱部位であることが明らかになった。rDNA 領域が長い場合、12 番染色体の複製が特異的に遅延を起し、チェックポイント応答が強く誘発される。それに対して、rDNA 領域が短くなると、12 番染色体の複製遅延が解消され、それと平行して、チェックポイント応答の誘発が弱まる。このことから、rDNA 領域の複製過程で問題が起きたり、それに付随して DNA 損傷が高頻度に生じる結果、それが、チェックポイント応答の誘発の主要な要因となっていると思われる。つまり、こうした rDNA 領域での異常は、単に他の染色体に比べて、生じやすいというだけではなく、ゲノム全体で発生している DNA 損傷全体の大部分を占めていることが示唆される (Fig.18)。

*orc1-4* 変異株で観察された、非許容温度シフト後の rDNA 領域がコードされている 12 番染色体のサイズ変動も rDNA 領域の脆弱性が原因なのかもしれない。*orc1-4* 変異株では、非許容温度にシフトし、24 時間培養すると、12 番染色体が細胞集団中 10%以上の細胞で、サイズ変動を起こしている。しかも、12 番染色体の不安定化は、温度シフト後、非常に早い段階から起き、他の染色体が、DNA 損傷チェックポイントの働きにより、安定に維持されているにもかかわらず、12 番染色体は、サイズ変動を引き起こす。こうした rDNA 領域の不安定性は、この領域に相同配列が多コピーあるために、相同組換えが起きやすいことのみを反映しているのではなく、修復能を超えるほどの DNA 損傷が高頻度に生じていることを示唆している。

### 2. rDNA 領域で生じている DNA 損傷の実態

では、一体、*orc* 変異株において、rDNA 領域上で生じている損傷の実態とは何であろうか？また、*orc* 変異株で、染色体を複製する際に、ゲノム全体で生じている DNA 損傷とは何であろうか？一つの候補として、複製フォークの進行阻害が考えられる。活性化する複製起点が少なくなると、通常よりも、少ない数の複製フォークによって、染色体を複製しなければならなくなる。この時、必然的に、一つの複製フォークの進行距離、つまり、ポリメラーゼ反応をする塩基の長さは、長くなる。それに伴い、複製フォークが、隣のまだ複製されていないレプリコンに進行し、正常時とは反対向きに複製が行われると、そこに結合していたタンパク質やトポロジカルなストレスによって、その進行が妨げられるのだろう。長い距離を走らなければならなく、かつ、多数の障害物を乗り越えなければならぬ状況によって、複製フォークの進行が阻害される確率が格段に引き上がると思われる。そのように進行が阻害された複製フォークは、二本鎖切断を引き起こし、最終的に、DNA 損傷という形になるの

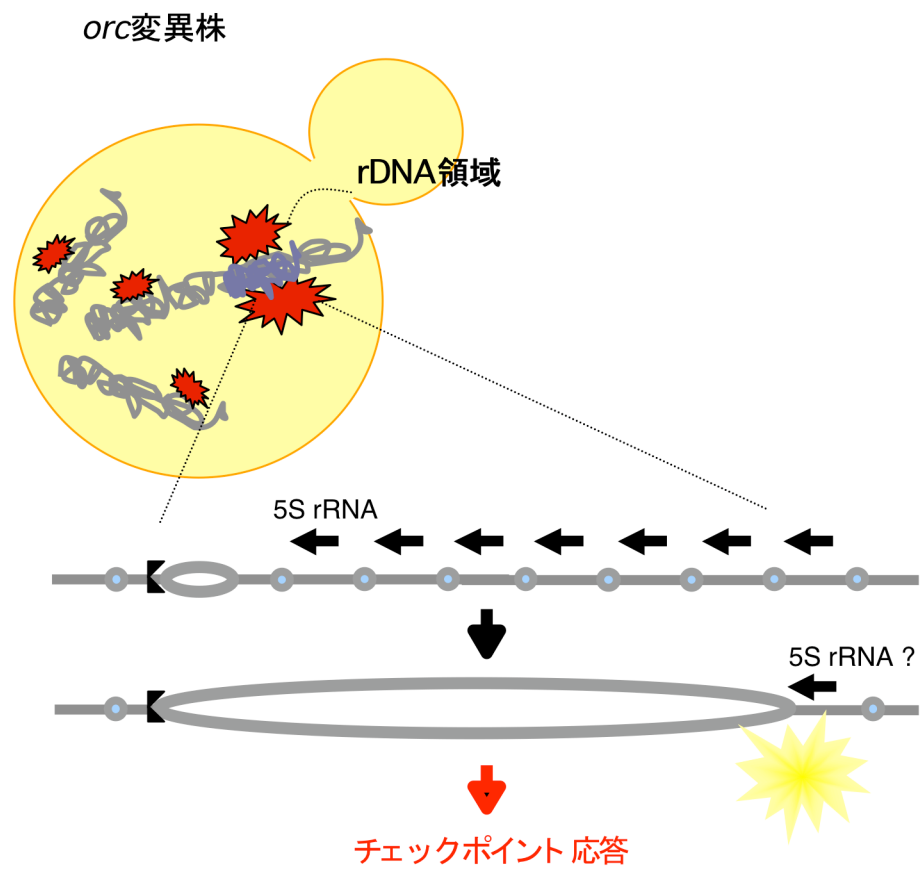


Fig.18. 複製開始制御が乱れた時、脆弱なrDNA領域を中心に起こる現象のまとめ

かもしれない。実際、人工染色体を用いた実験によって、レプリコンサイズが 170kb 以上になると、複製フォークの進行に問題が起き、DNA 損傷チェックポイントがゲノム安定な維持に必要であることが、他のグループの研究により示されている (van Brabant et al., 2001)。

また、*orc2-1* 変異株において、複製フォークの進行阻害が起きていることを示唆するデータとして、DNA 複製停止チェックポイントの構成因子である Mrc1p を欠損させると、合成致死を引き起こす報告が挙げられる (Suter et al., 2004)。Mrc1p は、複製装置のコンパートメントで、フォークの進行に問題が起きた時に、それを感知し複製フォークを安全に停止させるのに必要な因子である (Katou et al., 2003, Osborn et al., 2003)。このことから、Mrc1 を欠損させると、複製フォークの進行が阻害された後、フォーク構造が崩壊して、膨大な DNA 損傷が蓄積するため、*orc2-1* 変異細胞は感受性を示すのかもしれない。

レプリコンサイズの肥大化によって生じる複製フォークの進行阻害こそが *orc2-1* 変異株で生じている DNA 損傷の原因であると考えると、rDNA 領域で DNA 損傷が高頻度に生じ、脆弱性を示す事実が、容易に説明できる。rDNA 領域の各ユニットには、ARS 配列がコードされており、非常に複製起点が密集しているが、ARS のほとんどが early origin で、その約 20%しか活性化されない (Brewer et al., 1988, Linskens et al., 1988, Pasero et al., 2002)。しかも活性化する ARS は、クラスターを形成して、隣接した 2~3 個の ARS が同時に活性化する (Pasero et al., 2002)。そのため、クラスター内のレプリコンサイズは、rDNA の 1 ユニット分で、9.1kb であるが、クラスター間の距離は 60kb 以上で、中には 90kb~130kb になる部分も存在する。他のゲノムのレプリコンサイズが約 45kb であることを踏まえると、この領域はゲノムで最小のレプリコンと最大のレプリコンが混在する特徴的な様式で複製が行われていると言える (Lengronne et al., 2001, Pasero et al., 2002)。このような特殊な領域では、複製開始頻度が低下すると、最小に保たれていたクラスター内のレプリコンサイズは、極端に大きくなるだろうし、クラスター間のギャップは、130kb を超え、非常に大きくなる。rDNA 領域は、このような特徴的な複製様式をとるため、一度複製開始制御が乱れると、そこをひた走る複製フォークの進行に問題が生じる確率が高くなるのではないだろうか。実際、rDNA 領域のコピー数が少なくなることに伴い、活性化される複製開始点の数が増加するために、一つの複製フォークの進む距離が短くなり、その結果、複製過程での問題が解消されることが示された (Fig.16)。rDNA 領域の複製開始頻度が 5 個の内 1 個に抑えられている理由は不明であるが、この元々低い複製開始能が複製開始制御の乱れに対する rDNA 領域の脆弱性の原因となっていると思われる。

このように、隣接した rDNA ユニットに進行し、複製フォークが長距離を走る時、その進行を邪魔する障害物として、一つの有力な候補が考えられる。それは、5S rRNA の転写である。一つの rDNA ユニットには、35S rRNA、5S rRNA の 2 つの転写領域が存在する。35S rRNA の転写と複製フォークの衝突は、35S rRNA の転写終結点

の下流に複製フォークの進行を止める RFB 部位によって、回避されている (Brewer et al., 1988, Kobayashi et al., 1998)。RFB に Fob1p が結合し、35S rRNA の転写と反対向きに進むフォークの進行のみを制御し、35S rRNA の転写領域に侵入しないような仕組みになっている。それに対して、現在わかっている rDNA 領域の複製様式から考えて、正常時においても、複製フォークは 5S rRNA の転写と衝突を繰り返す (Deshpande et al., 1996)。実際、二次元ゲル電気泳動により、*orc2-1* 変異株の DNA 複製中間産物を注意深く観察した時、5S rRNA 遺伝子がコードされているところで、複製中間産物が蓄積されていることがみてとれた。複製開始頻度が低下して、複製フォークの進行距離が伸びると、特にクラスター間でのギャップが肥大化し、非常に大きくなった一つのレプリコンでは、そこを複製する複製装置は RNA ポリメラーゼ III (RNAPolIII) を含む 5S rRNA の転写装置と何十回も衝突を繰り返すのだろう。

もう一つの有力な障害物の候補として、rDNA 領域上で形成されているヘテロクロマチンが考えられる。150 コピーある rDNA の半分は、Sir2p 依存的にヘテロクロマチンが形成されており、転写や組み換えなどが起きないように抑制されている (Ruche et al., 2003)。このヘテロクロマチン構成される領域は、ダイナミクスに変化し、個々の細胞で異なるのは当然であり、同じ細胞内でも S 期の時期において、形成される部分は移っていく。ヘテロクロマチンを形成した領域を複製するには、専用にカスタマイズした複製装置が必要とされると思われる。そのため、複製開始制御が乱れ、隣接した領域にたまたま侵入してきた複製フォークでは、Sir2p などの様々な蛋白質によって固く閉ざされたヘテロクロマチン領域を複製することが難しく、その進行が手前で立ち往生するようなことは十二分に考えられる。二倍体である *orc1-4* 変異株では、その相同な二本の 12 番染色体は、異なるサイズ変化を起こす (Fig.6.A)。一般的に二倍体細胞では、片方の染色体の rDNA 領域が完全にヘテロクロマチンを形成することが知られており、そのことを踏まえると、*orc1-4* 変異株で観察された二本の相同染色体の異なるサイズ変動は、それぞれの染色体がヘテロクロマチン形成されているかそうでないかの違いに起因していると考えられる。

### 3. rDNA 領域内での複製開始制御

rDNA 領域の低い複製開始能が、*orc* 変異株内での rDNA 領域の脆弱性の原因であることが示唆されたが、そもそもの rDNA 領域内での複製開始制御の仕組みについては、ほとんどわかっていない。但し、この領域では、活性化される複製起点に隣接した 35S rRNA は必ず転写されているということが観察されている (Muller et al., 2000)。これは、複製起点の活性化が、転写、またはそれに伴うクロマチン構造の変化と関係していることを示している。本研究に観察された、コピー数の低下に伴い、複製開始頻度の増加した現象も、この転写に伴うクロマチン構造の変化が関与していると思われる。出芽酵母の rDNA 領域では、150 コピー中、80 コピーのユニットで 35S rRNA の転写がおこなれているが、コピー数が 30 コピーまで低下すると、全て

のユニット内で転写が行われる (French et al., 2003)。コピー数の低下に伴うこの変化が起因して、活性化される複製起点の割合も上昇したと考えられる。

#### 4. rDNA 領域の脆弱性と DNA 損傷チェックポイントの関係

複製開始の乱れに対しての rDNA 領域の脆弱性は、ゲノム安定維持のためのバックアップ機構であるチェックポイント応答の誘発と密接に関係しており、効率的なチェックポイント応答の誘発に必要であるという見方ができる。しかも、コピー数を介して、rDNA 領域の複製開始能をコントロールすることで、チェックポイント応答の強さを規定していると言える。しかし、この rDNA 領域の脆弱性は、細胞にとって受動的なものなのか、能動的なものなのか、どちらなのかという点に疑問が残る。具体的に説明すると、rDNA 領域が何らかの目的で特殊な構造をとっていたのだが、複製開始が乱れた時に、たまたま異常が起きやすく脆弱性を示しただけなのか、それとも細胞がわざわざ rDNA 領域上に存在する ARS の使用頻度を抑え、特殊な複製様式をとることで、脆弱性部位を作り上げ、しかもその部位を多コピーもつことで、チェックポイントシグナルをより効率的に伝える仕組みに仕立て上げたのか？ どちらなのかということである。我々の研究グループは、この問いへの答えを示唆するデータを現在までに持ち得ていない。確かに、rDNA 領域は、タンデムリピート構造をとるため、柔軟性にとんでおり、複製フォークの進行が阻害されても、組み換え修復による再スタートを切るための相同配列に富んでいるし、あるユニット上で問題が起きても、他のユニットから rRNA を供給することができ、本来の役割を果たす上で、何の支障も起きないだろう。こうした状況証拠は、いくつも上げられるが、rDNA 領域の脆弱性が、複製開始異常をチェックポイント機構に効率的に伝えるために果たすために作られたのかは不明である。もし、rDNA 領域で生じる複製異常のみを感知するチェックポイントの新たな因子などが見つければ、rDNA 領域が、そうしたことに利用されていることを容易に想像できるだろう。しかし、rDNA 領域に特化したチェックポイント因子は、必ずしも必要なものではない。ないからといって、複製開始制御が乱れた時、rDNA 領域が効率的なチェックポイントの活性化の一助を担っていることは、完全に否定されるわけではない。事実として、複製開始制御が乱れた *orc* 変異細胞内では、100 コピー以上から成る rDNA 領域が存在すると、そこで生じる損傷によって、チェックポイント応答が感度よく誘発される、ということが示された。このことから、細胞は、こうした rDNA 領域の脆弱性を効率的なチェックポイント応答の発動に利用しているかもしれないと想像できる。

仮に、細胞が rDNA 領域の脆弱性を利用して、チェックポイントの活性化能を規定しているという説に基づいて考えると、複製開始が乱れた状態が続いた時、細胞集団中に、コピー数を極端減少させて、チェックポイント活性化を弱めた生残り細胞が出現してくる現象は、非常に興味深く思えてくる。偶然、大きなサイズ変動が起きて出現してきたのか、あるいは、元々の細胞集団の中に潜在していたのかは、不明である



が、これは、まるで細胞がチェックポイント応答の感度を弱めるために、コピー数を調節したのではないかと思わせる。複製開始制御が乱れた時、細胞が、rDNA 領域のコピー数を調節し、チェックポイント発動の感度をコントロールすることを示したデータと捉え直すことができる。

## 5. 今後の展望と課題

これまで、*orc* 変異株を用いた研究によって、複製開始制御が乱れた時に誘発されるチェックポイントの感度と rDNA 領域のコピー数の関係が示された。今後、この研究を進める上での、重要な課題をいくつか枚挙する。まず、*orc* 変異株の rDNA 領域で生じている実態を捉えることが我々の主張を確定するためには、必須な課題であろう。二次元ゲル電気泳動法によって、5S rRNA 遺伝子コード領域に複製中間産物が観察されたが、これが本当に DNA 損傷の実態なのかは、断定できない。このことを検証するためには、rDNA 領域を 2 コピーにした後で、染色体上の rDNA 領域の 5S rRNA 遺伝子を欠損させ、再度 rDNA 領域を 150 コピーに増幅させた時の *orc* 変異株の温度感受性などについて調べることが必要である (Kobayashi et al., 2001)。また、蛍光ラベルした dNTPs の疑似体を用い、その取り込み効率を経時的に測定することで、rDNA 領域での複製フォークの進行速度が実際に影響を受けているかを確認する必要もある (Lengronne et al., 2001)。

2 つめの課題としては、脆弱な rDNA 領域により効率的に誘発されるチェックポイントは、他の染色体領域の安定化に関与しているのか？という疑問を検証する必要がある。rDNA 領域が偶発的に起るショックを敏感に吸収し、他のゲノム領域を守るための機能を有しているという考え (shock absorbance 説) は、非常に興味深い。rDNA 領域のコピー数が減少したことによって、チェックポイント応答の発動具合が低下したときに、他の染色体領域が不安定化を示すかどうかを調べれば検証可能であろう。これは、先ほど述べた rDNA 領域の脆弱性は受動的なのか、能動的なのかという問いにヒントを与える実験であろう。

最後に、*orc* 変異株以外の複製開始制御に異常をきたした細胞でも、チェックポイントの発動と rDNA 領域のコピー数の間に相関関係が見つけられるかを明らかにすることは、今後この発見の意義を拡大するという点で、最も重要な課題である。他の pre-RC の構成因子の変異株はもちろん、複製開始頻度が低下した状況が起きている CDK/cyclin が異常活性化した細胞についても調べてみたいところである。なぜ、CDK/cyclin が異常活性化した細胞では、染色体複製時において、複製開始頻度が低下するかというと、序論でも記したが、CDK は、pre-RC から複製開始反応を引き起こす役割以外に、一度複製が開始された複製起点に、再度 pre-RC が形成するのを防ぐ役割を果たしているからである (Nguyen et al., 2001, Fig.2)。本来、この再複製防止機能は、M 期後期から G1 期初期にかけて起こるサイクリンの分解と同時に解除され、pre-RC が次の複製に備えて、再び形成されるのだが、サイクリンが分解されな

いことなどで、M 期後期から G1 期初期においても CDK/cyclin の活性が残っていると、多数の複製起点で pre-RC が形成されなくなる。その結果、S 期において活性化される複製起点の数が減少する。サイクリンなどの過剰発現による複製開始頻度の低下は、出芽酵母のみならず、培養細胞でも観察されている (Tanaka et al., 2002, Lengronne et al., 2002, Ekholm-Reed., 2004)。こうした CDK/cyclin の異常活性化は、ガン細胞や腫瘍細胞でも起こっており、複製開始の乱れやそれに伴うゲノムの不安定性は、細胞のガン化や腫瘍細胞の悪性化と密接に関与している可能性が考えられる (Barlkova et al., 2005)。但し、現在までに、出芽酵母において、CDK を異常活性化させ、ゲノム全体の複製開始頻度を低下させても、*orc* 変異株で見られるように Rad53p が強く活性化するということが報告されていない (Tanaka et al., 2002, Lengronne et al., 2002)。一方、培養細胞において、CDK を異常活性化させると、強いチェックポイント応答が誘発されることが示されている (Ekholm-Reed., 2004)。

また、最近、ORC が複製開始以外に、別の役割を果たしていることが示唆され始めていることにも注意を払わなければならない。一つは、染色体を複製した後に、姉妹染色体分体を繋ぎ止めるコヒーシンとしての働きである (Suter et al., 2004)。rDNA 領域においても、コヒーシンが結合する部位が特定されている (Laloraya et al., 2000)。最近、出芽酵母の近縁種を使って、rDNA ユニット内で保存されている配列を探索することにより (rDNA ユニットの系統学的フットプリントの解析)、ORC が結合する ARS の共通配列 ACS がちょうどコヒーシンが結合する部位に保存されていることが見つかっている (Ganley et al., 2005)。ORC の機能が欠損すると、複製開始制御が乱れると同時に、コヒーシンの形成も上手くいかないため、rDNA 領域が脆弱性を示し、強いチェックポイント応答が誘発された可能性は否定できない。もしかしたら、rDNA 領域とチェックポイントの関係は、複製開始制御が乱れ時全てにおいて観察されるわけではなく、*orc* 変異株に特有のものなのかも知れない。我々が今回示した *orc* 変異株で観察された rDNA 領域のコピー数によるチェックポイントの感度の調節という発見が、複製開始制御に異常が起こった状況全てに成立するのかを調べることは、最重要の課題である。

## 結果（第二部）

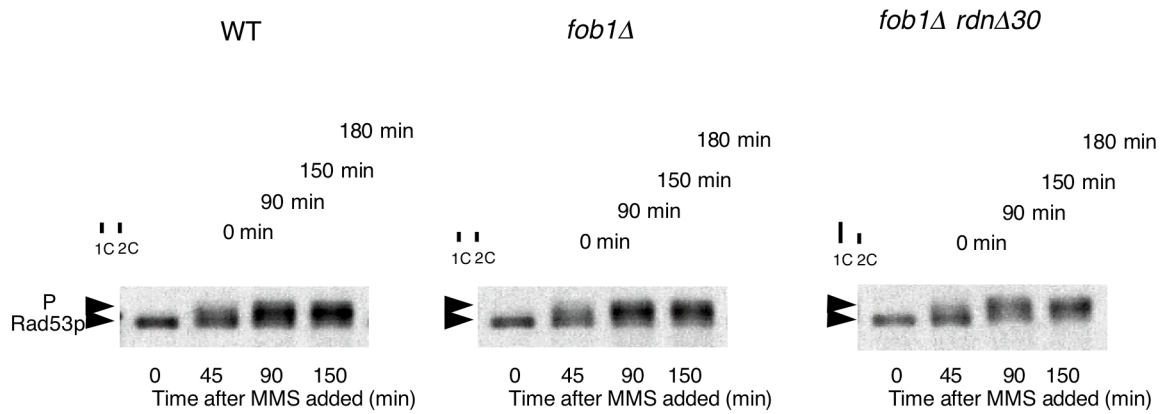
### 1. rDNA 領域が短縮すると、一般的に DNA 損傷チェックポイントの感度が低下するのか？

*orc* 変異株で観察されたチェックポイント活性化の感度と rDNA 領域のコピー数の関係は、*orc* 変異株に限ったことなのか？複製開始制御が乱れた時に限ったことなのか？それとも、複製フォークが阻害され、チェックポイントが誘発される時、全ての状況化において成立することなのだろうか？一般的なチェックポイント応答の誘発と rDNA 領域のコピー数の関係の可能性を検証するため、DNA の塩基などに修飾し、複製フォークの進行を阻害するアルキル化剤（MMS）を rDNA 領域のコピー数が減少した株に投与し、正常にチェックポイントが活性化するかどうかを調べた (Fig.19)。

野生株、*fob1Δ*株、*fob1ΔrdnΔ30*株を、それぞれ MMS を含んだ培地に移し、培養したところ、3 株ともに 180 分までに G2/M 期の停止が観察された (Fig.19.A)。同様に、Rad53p のリン酸化の経時的変化に関しても、3 株間に全く差がなかった。このことを更に確信するために、MMS の濃度をできる限り低濃度 (0.001%) に抑え、かつコピー数が更に短い 20 コピー細胞（野生株と生育速度が同じぎりぎりのコピー数）を用い、かつより高感度なチェックポイントの活性化の指標となる Rad53p の自己リン酸化活性を用いて、150 コピーの細胞と短縮細胞のチェックポイント応答誘発の感度を比較した (Fig.19.B)。その結果、*fob1Δ*株では、MMS 投与後、60 分の時点で、自己リン酸化された Rad53p バンドが検出されるのに対して、*fob1ΔrdnΔ20*株では、60 分の時点で検出できず、75 分経ってから検出され、一見、チェックポイントの活性化に差があるように思えた。しかし、MMS 投与後、時間ごとに Rad53p の自己リン酸化活性を Rad53p/非特異的タンパクの比でグラフにすると、確かに 60 分の時点では、*fob1Δ*株、*fob1ΔrdnΔ20*株の間に差はあるものの、45 分、75 分では、差はない。0 分、15 分、30 分の値が振れるという実験的誤差も考慮すると、60 分で観察された Rad53p の自己リン酸化の差は有意と言えない。このことから、チェックポイント応答の感度と rDNA 領域のコピー数の相関関係は、複製開始制御が乱れた時、正確には、2つの *orc* 変異株でしか成立しないと結論づけた。

チェックポイントの活性化の比較実験と平行に、野生株と短縮株の MMS に対する感受性についての実験を行っていた。このことが、後の研究の大きな分岐点となる。*FOB1* 遺伝子を欠損させ、コピー数を固定した 150 コピー以上の細胞と 30 コピーの細胞の感受性を MMS 濃度 0.008% の YPD プレート上で比較したところ、30 コピーの細胞は、MMS に対して高感受性を示した (Fig.20.A)。チェックポイントの活性化の具合に差はなかったが、一方、プレート上での感受性には、大きな差があることがわかった。結果の第二部として、この rDNA 短縮株の MMS 感受性について調べた軌跡を記す。

A



B

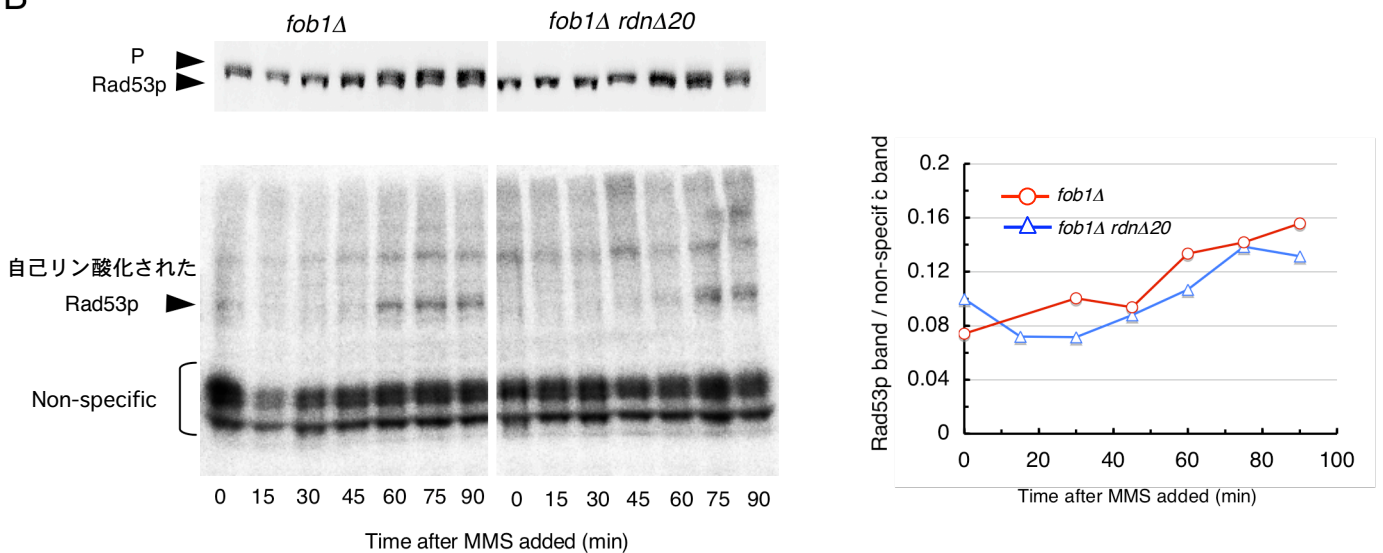
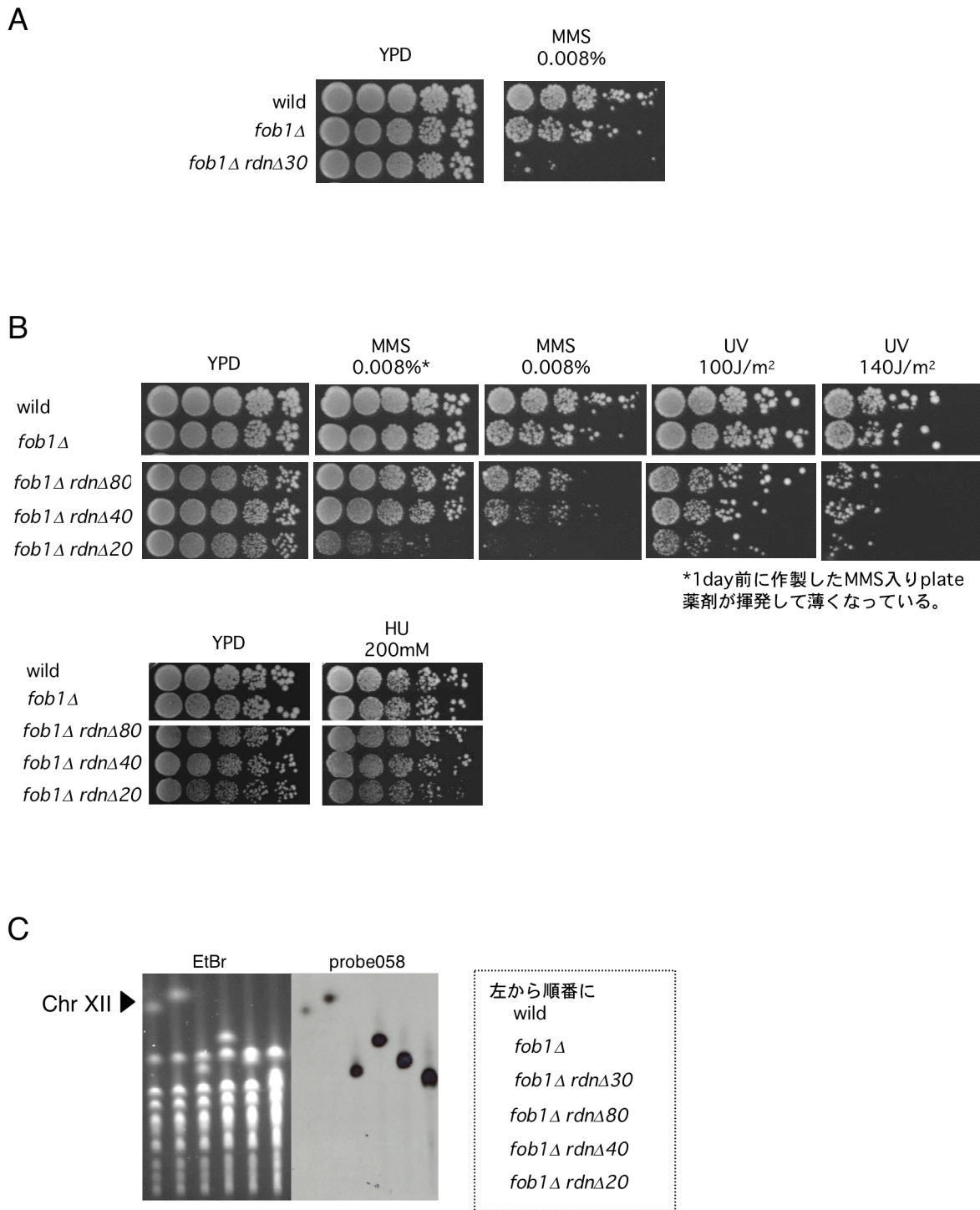


Fig.19. アルキル化剤により傷害を受けた時、rDNA領域のコピー数が減少しても、正常にDNA損傷チェックポイントが誘導される

(A)野生株、*fob1Δ*株、*fob1ΔrdnΔ30*株にアルキル化剤MMSを処理した時のDNA損傷チェックポイントの活性化の比較。対数増殖している各株を 0.004% MMSを含む液体培地に移し、FACSによる細胞周期の分布の解析とRad53pのリン酸化を指標として、チェックポイント活性化を経時的に調べた。(B)*fob1Δ*株、*fob1ΔrdnΔ20*株にMMS処理した後のRad53pの自己リン酸化活性の比較。MMSの濃度は、0.001%。MMS処理後、経時的に細胞を採取し、タンパク質を抽出後、SDS-PAGEによってRad53pを分離した(左上図:Rad53pのウェスタンブロッティング)。膜上で変性、再生処理を行った後、Rad53pの自己リン酸化活性を $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ の取り込みによって、検出した(左下図)。右図は、経時おきに、各株の $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ の取り込みにより出現したRad53pのバンドと非特異的タンパク質のバンドの比をプロットしたグラフ。



**Fig.20. rDNA領域のコピー数の減少に伴って、  
アルキル化剤や紫外線に対して段階的な感受性を示す**

(A)スポット試験により、rDNA短縮株のアルキル化剤に対する感受性について調べた。対数増殖している野生株、*fob1Δ*株、*fob1ΔrdnΔ30*株をYPDプレート、MMS入りプレート(0.008%)に10000細胞から始め、5倍希釈してスポットした。30°Cで2.5日間培養した。(B)rDNA短縮株のMMS、UV、HUに対する感受性についてスポット試験によって検討した。対数増殖している野生株、*fob1Δ*株、*fob1ΔrdnΔ80*株、*fob1ΔrdnΔ40*株、*fob1ΔrdnΔ20*株を採取し、MMSを含むYPDプレート(0.008%)にスポットした後、またはUVを照射した後に30°Cで2.5日間培養した。HUを含むYPDプレートには、30°Cで5日間培養した。(C)パルスフィールドゲル電気泳動による各株のrDNA領域のコピー数の確認。スポットする前の細胞を2-3回分裂させ、増殖させた後に採取して、染色体を抽出し、泳動した。左図はエチジウムブロマイド染色、右図は12番染色体に結合するプローブ(probe058)によるサザンハイブリダイゼーションの結果を表す。

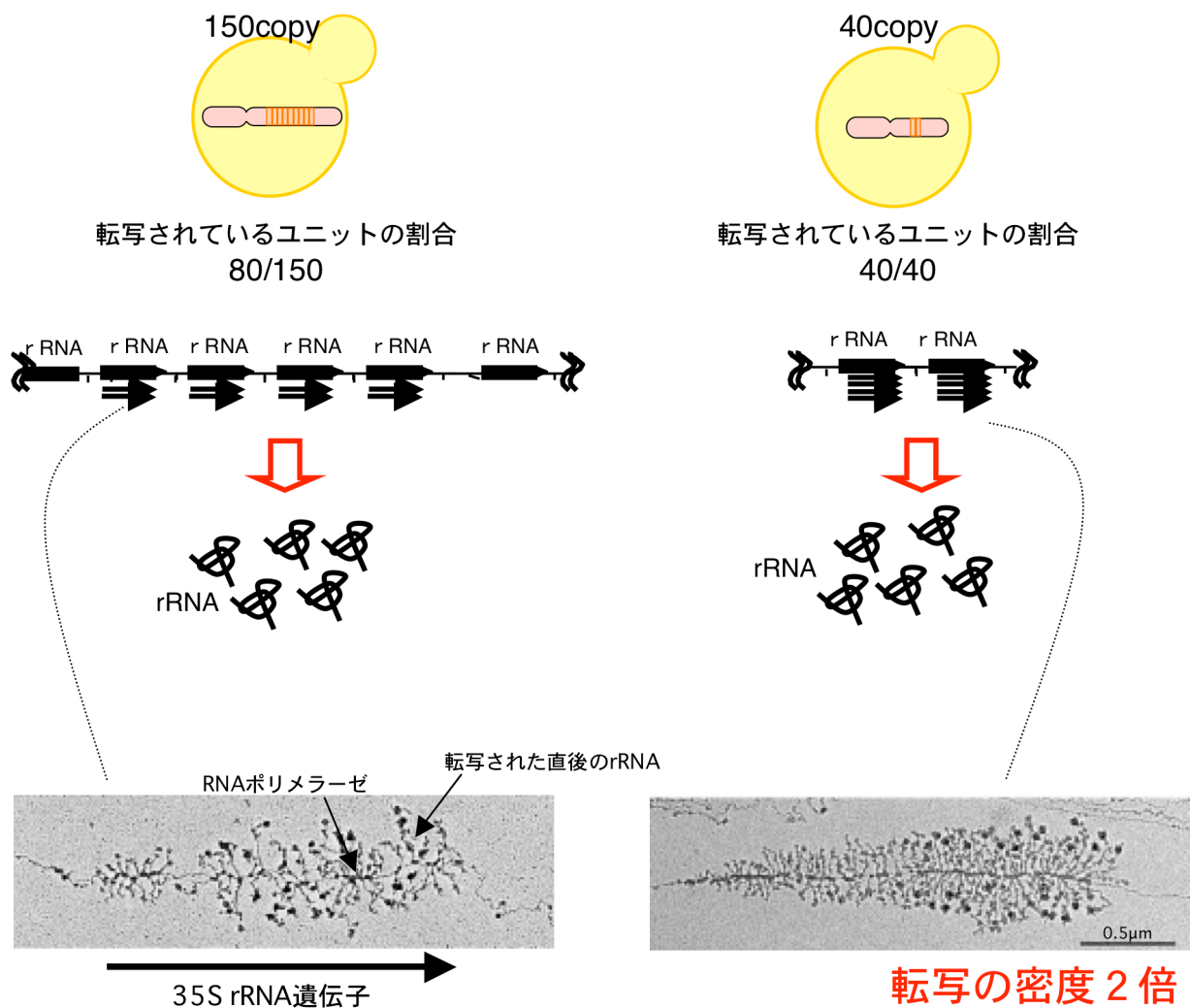
## 2. 種々の変異原に対する rDNA 短縮株の感受性の検討

まず、細胞の MMS 感受性と rDNA 領域のコピー数との関係についてより詳細に検証するために、基生研の小林武彦博士から分与して頂いたコピー数が 20 コピー、40 コピー、80 コピーの細胞について、アルキル化剤 (MMS) と紫外線 (UV) と dNTPs を枯渇させ、フォークの進行を阻害するヒドロキシ尿素 (HU) などに対する感受性を調べた (Fig.20.B)。その結果、MMS に対して、80 コピーの細胞は、感受性を示さなかったが、40 コピーの細胞は、80、150 コピーの細胞より、感受性になっており、20 コピーの細胞は、40 コピーの細胞に比べて、更に強い感受性を示した。このことから、rDNA 領域が 80 コピー以下になると、段階的に MMS 感受性を示すことがわかった。UV に対しても、MMS とほぼ同じような感受性パターンを示したが、HU に対する感受性には、全く差が観察されなかった。MMS や UV など DNA に傷害を与える種の異常に対しては、感受性を示すが、一方で HU によって、dNTPs を枯渇させ、複製フォークの進行を阻害しても、rDNA 短縮細胞は感受性を示さない。rDNA 短縮細胞が MMS や UV に対して感受性であるのは、複製フォークの進行が阻害されることが原因ではなく、何か他のことが原因であることが推察される。このことと一致して、rDNA 短縮株に MMS を処理した時に、150 コピーの株と同じようにチェックポイント応答が誘発されていることも、150 コピーであろうが、コピー数が少なくなっていようが、チェックポイントが感知する DNA 複製での異常に量的な違いがないことを示唆している (Fig.19.A)。更にまた、コピー数が大きく異なる 150 コピーと 80 コピーの細胞の間に、MMS に対する感受性に差はないことにも注目したい。しかも、感受性は 80 コピー以降、段階的に強くなることから、細胞内で、80 コピー以下になってから段階的に変化する何かの事象が MMS によって、阻害されたことが原因で感受性になったと思われる。プレート上での感受性試験によって、明確に観察された段階的な感受性のパターンは、非常に興味深い。コピー数が変わると、単に rDNA コピー数が減るという以上に、それに伴って、細胞内で何かかが変化しているのではないかと考えられた。

### 3. DNA 傷害による rRNA の転写の阻害

コピー数と比例して段階的に変化するのは何か、という疑問から rDNA 短縮株に対する知見について調べていくと、注目すべき文献が公表されていた。それは、出芽酵母で、rDNA 領域のコピー数が 40 コピーになっても、150 コピーの細胞と同様に生育速度が変わらないのは、一つの rRNA 遺伝子がより多く転写されることで、増殖に必要な量の rRNA を供給されるからであることを報告したものであった (French et al., 2003, Fig.21)。もう少し詳しく説明すると、出芽酵母では、150 コピーある rDNA ユニットの内、約半分、80 コピーが 35S rRNA 供給のために転写されているのだが、40 コピーの細胞では、同量の rRNA を供給するために、rRNA 遺伝子当たりの転写量が 2 倍になっていることが電子顕微鏡によって観察されていた。つまり、短縮細胞内では、RNA ポリメラーゼ I がリクルートされる量に変化して、35S rRNA 上の転写の密度が変化していることが示されていた。この報告に基づくと、150 コピーの細胞と 80 コピー細胞の間には、転写の密度は同じであるが、80 コピー以下から転写の密度が変化することになる。40 コピーの細胞では、150 コピーの細胞、80 コピーの細胞の 2 倍の密度で転写されており、20 コピーの細胞では、4 倍の密度で転写されているはずである。この変化こそが、MMS などの DNA 傷害に対する感受性の原因なのではないか、つまり、転写密度が高くなった時、MMS などによって DNA が傷害を受けると、rRNA が供給できなくなって感受性を示す可能性が考えられた。

この可能性を検討するために、遺伝学的な方法を使い、染色体上の rRNA の転写を抑制した時、rDNA 短縮株の MMS に対する感受性が抑制されるかを調べることにした。染色体上の rRNA の転写を止める方法として、rDNA を短縮する際に使用したプラスミド pRDN-hyg1 と ハイグロマイシンを利用した (Chernoff et al., 1994)。このプラスミドを導入した細胞にハイグロマイシンを処理すると、染色体上の rRNA の転写が抑制され、(これと同時に rDNA 領域のコピー数が短縮される)、プラスミド上の rRNA 遺伝子からの転写に切り換わり、必要な rRNA が供給される。rDNA 短縮株では、もともとコピー数が少ないため、この処理では、それ以上 rDNA の短縮は起らないはずで、単純に細胞内の rRNA の供給場所が染色体からプラスミドへ移行する (Fig.22.A)。この仕組みを利用して、40 コピーと 20 コピーの細胞の感受性の変化を調べたところ、両細胞に観察された MMS 感受性は、ハイグロマイシンにより、染色体上の転写を止めると、完全に抑制された (Fig.22.A)。このことから、rDNA 短縮株の DNA 傷害に対する感受性には、rRNA の転写が関与していることが示唆された。



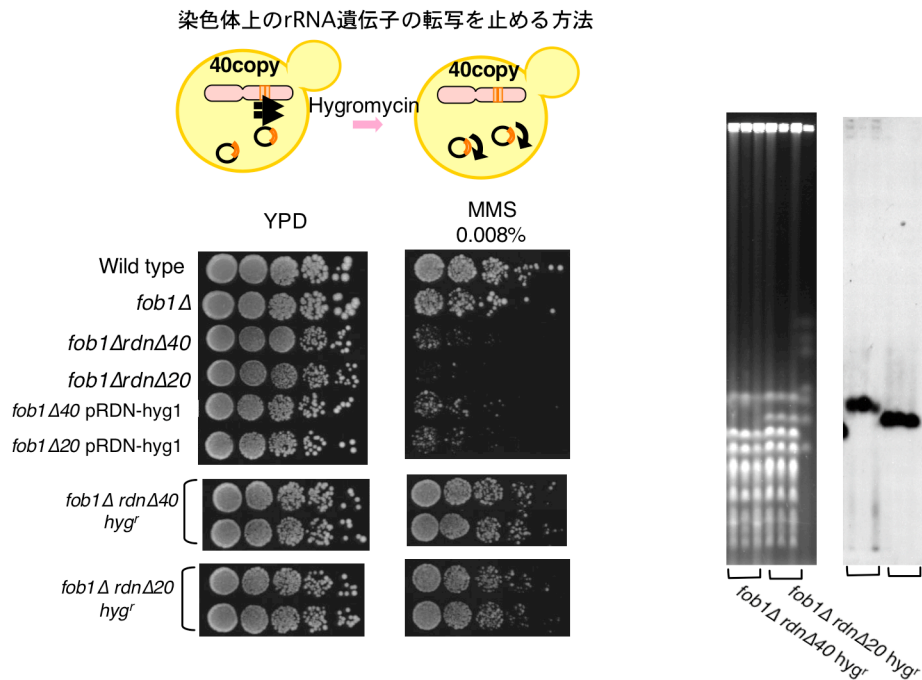
Sarah L. French et al Molecular and Cellular Biology, March 2003, p. 1558-1568から抜粋

## Fig.21. rDNA短縮株では、35S rRNA遺伝子当たりの転写量が上昇している

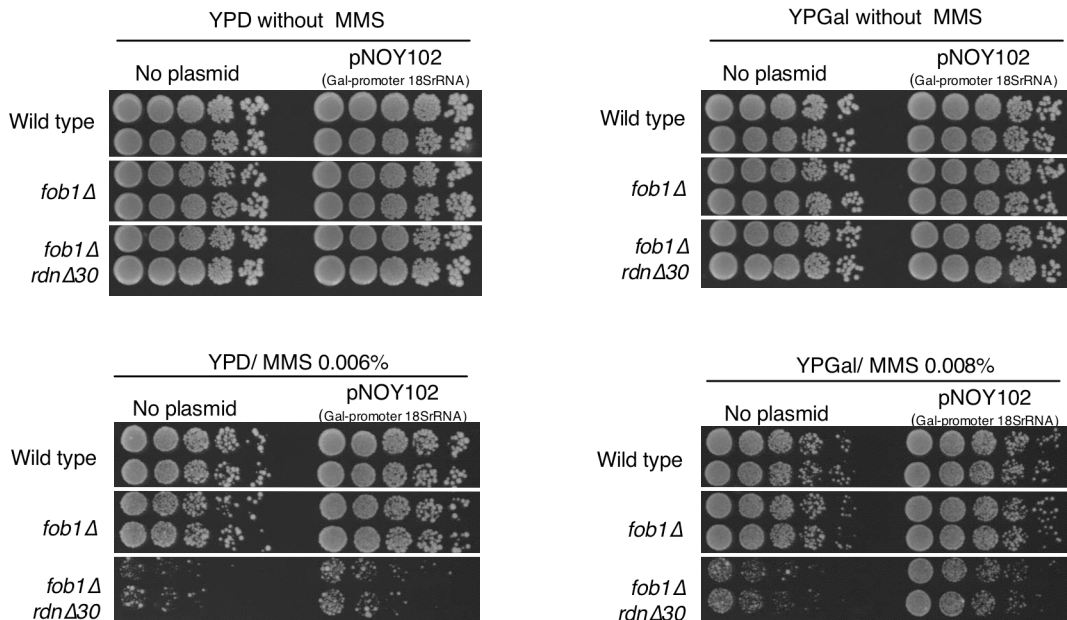
rDNA領域のコピーを150コピー持つ細胞と40コピー持つ細胞では、細胞内で供給されているrRNA量は同じである。rRNA遺伝子の転写の状態を電子顕微鏡で観察したところ、150コピーの細胞では、150コピー中80コピーが転写されており、一方で40コピーの細胞では、40コピー全てで転写が行われていた。しかも、転写が行われている40コピーの35S rRNA遺伝子上では、RNAポリメラーゼ I が非常に密集しており、一つのrRNA遺伝子当たりの転写の量が2倍になっていることが示されている。Bar=0.5μm



A



B



**Fig.22.染色体上のrRNAの転写を止めることやrRNAを供給することで、  
rDNA短縮株のアルキル化剤に対する感受性が抑制される**

(A) ハイグロマイシンとpRDN-hyg1を利用して、染色体上でのrRNAの転写を止めた時のrDNA短縮株のMMS感受性について調べた。左上の模式図は、ハイグロマイシン処理によって、染色体上のハイグロマイシン感受性であるrRNAの転写が止まり、プラスミド上のハイグロマイシン耐性のrRNAが供給されるようになることを表している。スポット試験は*fob1*Δ*rdn*Δ40株、*fob1*Δ*rdn*Δ20株にpRDN-hyg1を導入後、ハイグロマイシン処理後それぞれのMMSに対する感受性の変化を示す。ハイグロマイシンを処理した後、短縮株のrDNAのコピー数が維持されていることを、パルスフィールドゲル電気泳動で確認した。(B)プラスミドを用いて、Gal7プロモーターで発現を調節できる35S rRNA遺伝子を導入し、プラスミドからrRNAを供給した時のrDNA短縮株のMMS感受性について調べた。pNOY102では、Gal7プロモーターの下流に35S rRNA遺伝子がコードされている。糖源としてグルコースを含むYPD上では、転写されないが、糖源としてガラクトースを含むYPGal上では、RNApolIIIによって35SrRNAが転写される。

しかし、染色体上の rRNA 遺伝子の転写抑制実験は、我々が考案したトリッキーな実験のため、他の方法で転写との関連を確かめることにした。そこで、*Gal7* プロモーターによって、発現を調節できる 35S rRNA 遺伝子が挿入されたプラスミドを rDNA 短縮株（30 コピーの細胞）に導入し、発現誘導の ON/OFF で、MMS に対する感受性が抑制されるかどうかを確かめた (Fig.22.B)。その結果、糖源としてグルコース含んだ培地では、同様に MMS に対して感受性が示すが、ガラクトースを含んだ培地にスポットし、プラスミド上の rRNA 遺伝子を発現させると、その感受性が部分的に抑制されていた。このことから、この方法によっても、rDNA 短縮株が MMS に対し感受性を示すのは、DNA 傷害によって、35S rRNA の転写が阻害されたことが一因であることが示唆された。

## 考察（第二部）

### 1. rDNA 短縮株のアルキル化剤に対する感受性

DNA が傷害を受けた時に、誘発されるチェックポイントの感度と rDNA 領域のコピー数の関係について調べていた経緯で、rRNA 遺伝子のコピー数が少なくなると、それに伴い、細胞が変異原であるアルキル化剤や紫外線に感受性を示すという非常に興味深い現象を見つけた。我々は、rDNA 領域のコピー数が低下すると、細胞内の rRNA 遺伝子当たりの転写の量(転写密度)が上昇するという報告に基づき、35S rRNA の転写と DNA 傷害に対する感受性の関係について調べた。その結果、①MMS に対する感受性は、rRNA コピー数が 80 コピー以下に低下してからはじめて観察され、コピー数の低下に伴う 35S rRNA の転写密度の上昇と比例して、MMS に対して強い感受性を示すこと、②遺伝学的方法を用いて、染色体上の rRNA の転写を止めることによって、その感受性が完全に抑制されること、③35S rRNA 遺伝子を含むプラスミドを短縮細胞に導入し、rRNA を供給すると、感受性が部分的に抑制されること、がわかった。これらの結果から、rDNA 短縮細胞の感受性には、RNA ポリメラーゼ I の転写が関わっていることが判明した。

今回示した変異原に対する短縮細胞の感受性のデータは、rDNA 領域のコピー数が少ないと、DNA に傷害を受けた時、単純に、rRNA の供給に関わる rRNA 遺伝子の数が少なくなるため、細胞が感受性を示すということの意味しているわけではない。もし、そうであるならば、80 コピーと 150 コピー細胞の間に、感受性の差が観察されてもよいはずである。80 コピー以下に低下した時はじめて感受性の表現型が表出することは、短縮細胞の MMS 感受性は、遺伝子の数という物理的な変化より、その遺伝子上の転写密度の変化という生物学的現象と結びついていることを示唆している。

### 2. 変異原が転写に与える影響

rRNA 遺伝子の転写の密度が上昇すると、傷害によって、転写が阻害され、その結果、rRNA を供給できなくなり、細胞が死んでしまうと思われるが、なぜ転写密度が上昇すると、そのようなことが起こるのだろうか？転写密度が上昇することによって、第一に、DNA が傷害を受けやすくなっている可能性が考えられる。一般的に一本鎖 DNA (ssDNA) は、二本鎖 DNA (dsDNA) より、塩基等を露出するので、変異原からの攻撃を受けやすい (Frederico et al., 1990, Agilera et al., 2002)。RNA ポリメラーゼ I によって、盛んに転写が行われると、ssDNA が露出する頻度が増して、rRNA 遺伝子上により多くの DNA 損傷が生じるのかもしれない。第二の理由として、転写阻害を受けた後、その異常が解消されにくくなっていることが考えられる。多数の

RNA ポリメラーゼ I が密に詰まって転写している rRNA 遺伝子では、損傷によって、一つの RNA ポリメラーゼが急停止すると、後ろから、次々と、別の RNA ポリメラーゼが衝突し、玉突きの事故のような解消不能な状態になるのかもしれない。

今まで転写と変異原の関係については、転写が盛んであると DNA 傷害を受けた時、突然変異頻度が上昇するだとか、転写が DNA 上に生じた UV 損傷によって阻害されたことを感知し、活性化する修復機構（転写共役修復システム）の存在などが明らかにされている (Selby et al., 1993)。しかし、これらは、変異原が転写に与える影響を突然変異という形で検出し、調べられてきた。突然変異レベルでの検出は、全細胞集団中のわずかな細胞で生じるという低頻度の現象のため、転写と変異原の関係を明らかにするための手段が限られていた。rDNA 短縮細胞でのアルキル化剤による転写阻害の効果は、細胞の感受性のレベルで検出できるため、変異原が転写に与える影響を詳細に調べる系としての利用価値も高いと思われる。

### 3. rRNA の転写密度とアルキル化剤に対する感受性

今回の発見は、rRNA 遺伝子上での転写密度が、アルキル化剤に対する細胞の感受性を規定していることを示している。今まで、変異原であるアルキル化剤の致死性に関しては、DNA 複製への影響という側面だけが注目されてきた。だからこそ、染色体複製のバックアップ機構として働く組み換え修復やチェックポイント機構に研究の焦点が当てられていた。実際、組換え修復やチェックポイントの遺伝子が欠損した細胞では、アルキル化剤に対して、高感受性を示す。rDNA 短縮細胞に見られたアルキル化剤に対する感受性に関しても、現段階では、複製が全く関係していないとは、言い切ることができない。しかし、rRNA の転写の密度が中心になって、細胞の感受性を決めているという事実は、アルキル化剤によって細胞が死ぬ理由を考える上で、今までにはない新たな視点を我々に与えていると思われる。もしかしたら、コピー数が十分存在する時にも rRNA 遺伝子上での転写阻害が細胞の感受性の原因なのかもしれない。もしそうならば、これまでに知られているアルキル化剤に対する修復遺伝子の中にも、rRNA 遺伝子上での転写ストレスを解消することに関わっているものが埋没していると思われる。このような遺伝子を特定する手段としては、様々な修復遺伝子が単独欠損した株のライブラリーから、rRNA 遺伝子がコードされているプラスミドを導入することで、アルキル化剤に対する感受性が抑制されるものを選択する方法が考えられる。

### 4. rDNA 領域が 100 コピー以上に増幅された起源

最後に、今回見つかった現象から考えられる、生物が rDNA 領域を現在の形にまで形成してきた経緯について考察する。rRNA 遺伝子が 100 コピー以上ゲノム上に存在する理由として、教科書には、増殖する際に、大量の rRNA が必要とされるが、一

方で、産物を翻訳レベルで増幅することができないため、100 コピー以上の遺伝子が存在し、大量の rRNA を賄っていると書かれている。しかし、出芽酵母では rRNA 遺伝子を 40 コピーまで低下させても、RNA ポリメラーゼ I の転写のレベルを調節することで、同量の rRNA を供給することができる (French et al., 2003)。これにより、教科書に書かれていることは明確に否定されており、その理由は不明であった。今回示した rRNA 遺伝子の転写密度と DNA 傷害に対する感受性の関係によって、細胞が rRNA 遺伝子を 100 コピー以上獲得してきた理由を新しい形で説明できる。真核生物は rRNA 遺伝子を 100 コピー以上に維持することで、遺伝子当たりの転写のノルマを分配し密度を低下させて、転写阻害に対する防御機構または修復システムを効率的に働かしているのではないかと考えられる (Fig.23)。1 遺伝子当たりの大量の転写に伴うリスクの回避こそが rDNA 領域が 100 コピー以上に増幅された最初のきっかけなのかもしれない。

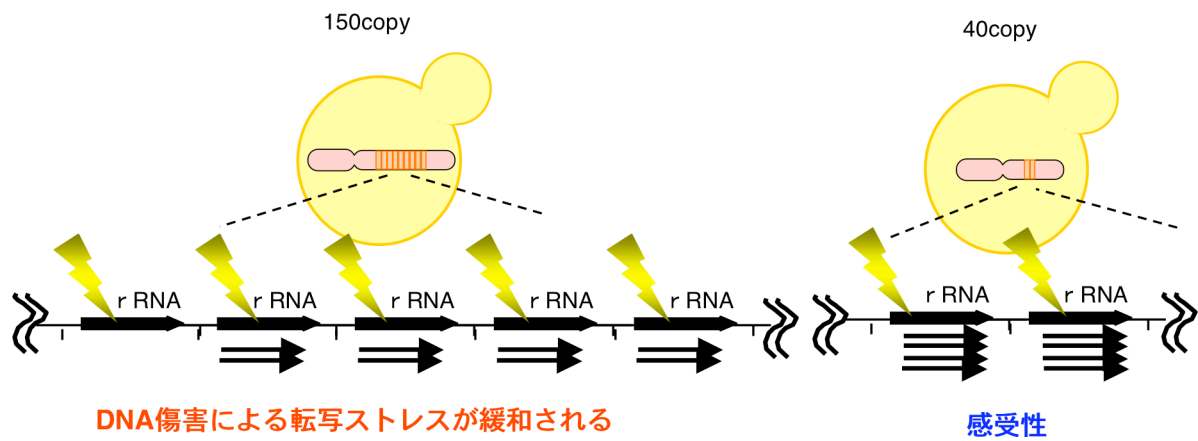


Fig.23.染色体上のrRNAでの転写レベルがrDNA短縮株のMM S感受性に深く関与している

## 謝辞

本研究は、様々な人達の助けがあって初めて達成されたものであり、この場を借りて感謝したいと思います。奈良先端科学技術大学院大学、原核生物分子遺伝学講座の真木寿治教授に、ご指導、ご助言を賜りました。特に、本研究を通して、サイエンスの進め方について、先生の姿を手本として、学んで参りました、ここに厚く御礼申し上げます。今後もその背を見て、学びとっていきたいと思っております。次に、国立遺伝学研究所の小林武彦先生には、rDNA 短縮株の作製方法や二次元ゲル電気泳動を懇切に教えて頂き、かつ研究の指針を決める際にも、有用なアドバイスを賜りました。小林先生の力添え無くしては、研究は完遂できなかつたと思われまふ。心から感謝致します。東京工業大学の白髭克彦先生には、*orc1-4* 変異株、*orc2-1* 変異株を作製するためのプラスミドや Rad53p に HA タグを作製するためのプラスミドを、大阪大学の川崎泰生先生には、抗 Orc2p 抗体を分与して頂きました。お二人の先生に感謝致します。当研究室のスタッフ、諸先輩方、同僚、後輩達には、本研究に関する有意義な論議をして頂きました。感謝致します。博士課程進学後出合い、現在、婚約者である山崎春菜さんには、実験や論文を執筆する過程で苦しい時に、精神面で支えられました。深く感謝致します。

そして、最後に私の意志を尊重し、快く博士課程への進学を認め、経済面でも精神面でも私を支えてくれた両親に深く深く感謝致します。

## 参考文献

(Paper)

1. **Aguilera, A.** 2002. The connection between transcription and genomic instability. *Embo J* **21**:195-201.
2. **Asai, T., D. B. Bates, and T. Kogoma.** 1994. DNA replication triggered by double-stranded breaks in *E. coli*: dependence on homologous recombination functions. *Cell* **78**:1051-1061.
3. **Bartkova, J., Z. Horejsi, K. Koed, A. Kramer, F. Tort, K. Zieger, P. Guldberg, M. Sehested, J. M. Nesland, C. Lukas, T. Orntoft, J. Lukas, and J. Bartek.** 2005. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* **434**:864-870.
4. **Bell, S. P.** 2002. The origin recognition complex: from simple origins to complex functions. *Genes Dev* **16**:659-672.
5. **Bell, S. P., and A. Dutta.** 2002. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* **71**:333-374.
6. **Bell, S. P., R. Kobayashi, and B. Stillman.** 1993. Yeast origin recognition complex functions in transcription silencing and DNA replication. *Science* **262**:1844-1849.
7. **Brewer, B. J., and W. L. Fangman.** 1988. A replication fork barrier at the 3' end of yeast ribosomal RNA genes. *Cell* **55**:637-643.
8. **Brewer, B. J., and W. L. Fangman.** 1987. The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*. *Cell* **51**:463-471.
9. **Bruschi, C. V., J. N. McMillan, M. Coglievina, and M. S. Esposito.** 1995. The genomic instability of yeast *cdc6-1/cdc6-1* mutants involves chromosome structure and recombination. *Mol Gen Genet* **249**:8-18.
10. **Burhans, W. C., M. Weinberger, M. A. Marchetti, L. Ramachandran, G. D'Urso, and J. A. Huberman.** 2003. Apoptosis-like yeast cell death in response to DNA damage and replication defects. *Mutat Res* **532**:227-243.
11. **Burke, D. T., G. F. Carle, and M. V. Olson.** 1992. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. 1987. *Biotechnology* **24**:172-178.
12. **Chernoff, Y. O., A. Vincent, and S. W. Liebman.** 1994. Mutations in eukaryotic 18S ribosomal RNA affect translational fidelity and resistance to aminoglycoside antibiotics. *Embo J* **13**:906-913.
13. **Culotta, E., and D. E. Koshland, Jr.** 1993. p53 sweeps through cancer



- research. *Science* **262**:1958-1961.
14. **Dani, G. M., and V. A. Zakian.** 1983. Mitotic and meiotic stability of linear plasmids in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**:3406-3410.
  15. **De Antoni, A., and D. Gallwitz.** 2000. A novel multi-purpose cassette for repeated integrative epitope tagging of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **246**:179-185.
  16. **Deshpande, A. M., and C. S. Newlon.** 1996. DNA replication fork pause sites dependent on transcription. *Science* **272**:1030-1033.
  17. **Dutta, A., and S. P. Bell.** 1997. Initiation of DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* **13**:293-332.
  18. **Ekhholm-Reed, S., J. Mendez, D. Tedesco, A. Zetterberg, B. Stillman, and S. I. Reed.** 2004. Deregulation of cyclin E in human cells interferes with prereplication complex assembly. *J Cell Biol* **165**:789-800.
  19. **Elble, R., and B. K. Tye.** 1992. Chromosome loss, hyperrecombination, and cell cycle arrest in a yeast *mcm1* mutant. *Mol Biol Cell* **3**:971-980.
  20. **Elledge, S. J.** 1996. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* **274**:1664-1672.
  21. **Foss, M., F. J. McNally, P. Laurenson, and J. Rine.** 1993. Origin recognition complex (ORC) in transcriptional silencing and DNA replication in *S. cerevisiae*. *Science* **262**:1838-1844.
  22. **Frederico, L. A., T. A. Kunkel, and B. R. Shaw.** 1990. A sensitive genetic assay for the detection of cytosine deamination: determination of rate constants and the activation energy. *Biochemistry* **29**:2532-2537.
  23. **French, S. L., Y. N. Osheim, F. Cioci, M. Nomura, and A. L. Beyer.** 2003. In exponentially growing *Saccharomyces cerevisiae* cells, rRNA synthesis is determined by the summed RNA polymerase I loading rate rather than by the number of active genes. *Mol Cell Biol* **23**:1558-1568.
  24. **Ganley, A. R., K. Hayashi, T. Horiuchi, and T. Kobayashi.** 2005. Identifying gene-independent noncoding functional elements in the yeast ribosomal DNA by phylogenetic footprinting. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:11787-11792.
  25. **Gietz, R. D., and A. Sugino.** 1988. New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**:527-534.
  26. **Harris, C. C.** 1993. p53: at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. *Science* **262**:1980-1981.
  27. **Hennessy, K. M., A. Lee, E. Chen, and D. Botstein.** 1991. A group of interacting yeast DNA replication genes. *Genes Dev* **5**:958-969.

28. **Hori, Y., K. Shirahige, C. Obuse, T. Tsurimoto, and H. Yoshikawa.** 1996. Characterization of a novel CDC gene (ORC1) partly homologous to CDC6 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **7**:409-418.
29. **Huang, D., and D. Koshland.** 2003. Chromosome integrity in *Saccharomyces cerevisiae*: the interplay of DNA replication initiation factors, elongation factors, and origins. *Genes Dev* **17**:1741-1754.
30. **Jacobson, M. D., C. X. Munoz, K. S. Knox, B. E. Williams, L. L. Lu, F. R. Cross, and E. A. Vallen.** 2001. Mutations in SID2, a novel gene in *Saccharomyces cerevisiae*, cause synthetic lethality with sic1 deletion and may cause a defect during S phase. *Genetics* **159**:17-33.
31. **Kaliraman, V., and S. J. Brill.** 2002. Role of SGS1 and SLX4 in maintaining rDNA structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **41**:389-400.
32. **Katou, Y., Y. Kanoh, M. Bando, H. Noguchi, H. Tanaka, T. Ashikari, K. Sugimoto, and K. Shirahige.** 2003. S-phase checkpoint proteins Tof1 and Mrc1 form a stable replication-pausing complex. *Nature* **424**:1078-1083.
33. **Kobayashi, T., D. J. Heck, M. Nomura, and T. Horiuchi.** 1998. Expansion and contraction of ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae*: requirement of replication fork blocking (Fob1) protein and the role of RNA polymerase I. *Genes Dev* **12**:3821-3830.
34. **Kobayashi, T., and T. Horiuchi.** 1996. A yeast gene product, Fob1 protein, required for both replication fork blocking and recombinational hotspot activities. *Genes Cells* **1**:465-474.
35. **Kobayashi, T., M. Nomura, and T. Horiuchi.** 2001. Identification of DNA cis elements essential for expansion of ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **21**:136-147.
36. **Kolodner, R. D., C. D. Putnam, and K. Myung.** 2002. Maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* **297**:552-557.
37. **Laloraya, S., V. Guacci, and D. Koshland.** 2000. Chromosomal addresses of the cohesin component Mcd1p. *J Cell Biol* **151**:1047-1056.
38. **Lengronne, A., P. Pasero, A. Bensimon, and E. Schwob.** 2001. Monitoring S phase progression globally and locally using BrdU incorporation in TK(+) yeast strains. *Nucleic Acids Res* **29**:1433-1442.
39. **Lengronne, A., and E. Schwob.** 2002. The yeast CDK inhibitor Sic1 prevents genomic instability by promoting replication origin licensing in late G(1). *Mol Cell* **9**:1067-1078.
40. **Linskens, M. H., and J. A. Huberman.** 1988. Organization of

- replication of ribosomal DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **8**:4927-4935.
41. **Lipford, J. R., and S. P. Bell.** 2001. Nucleosomes positioned by ORC facilitate the initiation of DNA replication. *Mol Cell* **7**:21-30.
  42. **Melo, J., and D. Toczyski.** 2002. A unified view of the DNA-damage checkpoint. *Curr Opin Cell Biol* **14**:237-245.
  43. **Muller, M., R. Lucchini, and J. M. Sogo.** 2000. Replication of yeast rDNA initiates downstream of transcriptionally active genes. *Mol Cell* **5**:767-777.
  44. **Neecke, H., G. Lucchini, and M. P. Longhese.** 1999. Cell cycle progression in the presence of irreparable DNA damage is controlled by a Mec1- and Rad53-dependent checkpoint in budding yeast. *Embo J* **18**:4485-4497.
  45. **Nguyen, V. Q., C. Co, and J. J. Li.** 2001. Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms. *Nature* **411**:1068-1073.
  46. **Nogi, Y., L. Vu, and M. Nomura.** 1991. An approach for isolation of mutants defective in 35S ribosomal RNA synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:7026-7030.
  47. **Nyberg, K. A., R. J. Michelson, C. W. Putnam, and T. A. Weinert.** 2002. Toward maintaining the genome: DNA damage and replication checkpoints. *Annu Rev Genet* **36**:617-656.
  48. **Osborn, A. J., and S. J. Elledge.** 2003. Mrc1 is a replication fork component whose phosphorylation in response to DNA replication stress activates Rad53. *Genes Dev* **17**:1755-1767.
  49. **Paciotti, V., G. Lucchini, P. Plevani, and M. P. Longhese.** 1998. Mec1p is essential for phosphorylation of the yeast DNA damage checkpoint protein Ddc1p, which physically interacts with Mec3p. *Embo J* **17**:4199-4209.
  50. **Pasero, P., A. Bensimon, and E. Schwob.** 2002. Single-molecule analysis reveals clustering and epigenetic regulation of replication origins at the yeast rDNA locus. *Genes Dev* **16**:2479-2484.
  51. **Raghuraman, M. K., E. A. Winzeler, D. Collingwood, S. Hunt, L. Wodicka, A. Conway, D. J. Lockhart, R. W. Davis, B. J. Brewer, and W. L. Fangman.** 2001. Replication dynamics of the yeast genome. *Science* **294**:115-121.
  52. **Rothstein, R., B. Michel, and S. Gangloff.** 2000. Replication fork pausing and recombination or "gimme a break". *Genes Dev* **14**:1-10.

53. **Rusche, L. N., A. L. Kirchmaier, and J. Rine.** 2003. The establishment, inheritance, and function of silenced chromatin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Biochem* **72**:481-516.
54. **Selby, C. P., and A. Sancar.** 1993. Molecular mechanism of transcription-repair coupling. *Science* **260**:53-58.
55. **Shimada, K., P. Pasero, and S. M. Gasser.** 2002. ORC and the intra-S-phase checkpoint: a threshold regulates Rad53p activation in S phase. *Genes Dev* **16**:3236-3252.
56. **Shirahige, K., Y. Hori, K. Shiraishi, M. Yamashita, K. Takahashi, C. Obuse, T. Tsurimoto, and H. Yoshikawa.** 1998. Regulation of DNA-replication origins during cell-cycle progression. *Nature* **395**:618-621.
57. **Spruck, C. H., K. A. Won, and S. I. Reed.** 1999. Deregulated cyclin E induces chromosome instability. *Nature* **401**:297-300.
58. **Suter, B., A. Tong, M. Chang, L. Yu, G. W. Brown, C. Boone, and J. Rine.** 2004. The origin recognition complex links replication, sister chromatid cohesion and transcriptional silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **167**:579-591.
59. **Tanaka, S., and J. F. Diffley.** 2002. Deregulated G1-cyclin expression induces genomic instability by preventing efficient pre-RC formation. *Genes Dev* **16**:2639-2649.
60. **van Brabant, A. J., C. D. Buchanan, E. Charboneau, W. L. Fangman, and B. J. Brewer.** 2001. An origin-deficient yeast artificial chromosome triggers a cell cycle checkpoint. *Mol Cell* **7**:705-713.
61. **Vaziri, C., S. Saxena, Y. Jeon, C. Lee, K. Murata, Y. Machida, N. Wagle, D. S. Hwang, and A. Dutta.** 2003. A p53-dependent checkpoint pathway prevents rereplication. *Mol Cell* **11**:997-1008.
62. **Vogelauer, M., L. Rubbi, I. Lucas, B. J. Brewer, and M. Grunstein.** 2002. Histone acetylation regulates the time of replication origin firing. *Mol Cell* **10**:1223-1233.
63. **Watanabe, K., J. Morishita, K. Umez, K. Shirahige, and H. Maki.** 2002. Involvement of RAD9-dependent damage checkpoint control in arrest of cell cycle, induction of cell death, and chromosome instability caused by defects in origin recognition complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **1**:200-212.
64. **Weinberger, M., L. Ramachandran, L. Feng, K. Sharma, X. Sun, M. Marchetti, J. A. Huberman, and W. C. Burkans.** 2005. Apoptosis in budding yeast caused by defects in initiation of DNA replication. *J Cell Sci* **118**:3543-3553.

65. **Wyrick, J. J., J. G. Aparicio, T. Chen, J. D. Barnett, E. G. Jennings, R. A. Young, S. P. Bell, and O. M. Aparicio.** 2001. Genome-wide distribution of ORC and MCM proteins in *S. cerevisiae*: high-resolution mapping of replication origins. *Science* **294**:2357-2360.
66. **Yamashita, M., Y. Hori, T. Shinomiya, C. Obuse, T. Tsurimoto, H. Yoshikawa, and K. Shirahige.** 1997. The efficiency and timing of initiation of replication of multiple replicons of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VI. *Genes Cells* **2**:655-665.

*(Book)*

1. **Sambrook, J., and D.W.Russell.** 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Ed. 3., vol. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
2. **Dan Burke, Dean Dawson, Tim Stearns.** 2000. *Methods in Yeast genetics*, Ed. 2000., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.