

氏 名 芹 澤 尚 美

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第773号

学位授与の日付 平成16年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Analysis of the mechanism of transcription-  
mediated hyper-recombination in yeast  
*Saccharomyces cerevisiae*

論文審査委員	主 査 教授	飯田 滋
	教授	西村 幹夫
	教授	長谷部 光泰
	教授	堀内 嵩

体細胞における相同組み換えは DNA ダメージ修復の重要な過程である。傷害を受けた DNA はその相同な配列を利用して障害を受ける前の状態へ回復される。その機構により危機的な変異は抑えられ、世代から世代へ安定に DNA 配列は維持されていく。だが同時に相同組み換えはゲノム中の繰り返し配列のコピー数を変動させたり、染色体間の組み換えでは転座が起こるなどの変化を生じさせる要因となっている。だが減数分裂時における相同組み換えと異なり、体細胞における相同組み換えはゲノム中でランダムに起こる傷害により誘導され、また頻度が低いことから、その分子メカニズムについて解析することは困難であった。

酵母 *HOT1* 配列は新規に挿入した時その近傍の相同配列間の組み換えを数十倍活性化する組み換えのホットスポットとして単離された、リボゾーム遺伝子に由来する DNA 断片である。リボゾーム遺伝子 (rDNA) は 12 番染色体上に約 150 コピーの繰り返し配列として存在しており、一つの単位は 35S rDNA、5S rDNA およびその間の 2 つの非転写領域から構成されている。その構造は様々な生物種においてよく保存されている。*HOT1* は非転写領域内の 35S rDNA 転写のイニシエーター (I: 260bp) 領域およびエンハンサー (E: 310bp) 領域の組み合わせからなっており、その構成の要素、および 35S rDNA の転写因子 PolII が *HOT1* の組み換え活性に必要であることから、PolII による転写が組み換えを活性化していると考えられている。だが、転写による相同組み換えの活性化については他にもいくつか例が知られているが、そのメカニズムについては未知であるところが多い。

今回、*HOT1* の転写量を変化させることにより組み換えの頻度への影響を見ることで、実際に転写が直接組み換えを活性化しているのか、またそのメカニズムについて知見を得ることを目的として行ったのが本実験である。本実験では転写量を上昇させるために rDNA を全て欠失させた系 (*rdn*ΔΔ) を用いた。通常野生株では PolII はほとんどが核小体内の rDNA の繰り返し配列上で働いているが、*rdn*ΔΔ株では rDNA を失うことにより余剰の PolII が *HOT1* での転写を増加させると考えられる。事実、本実験では転写量が百数十倍まで上昇した系を得ることができた。

これらの系について組み換えの頻度を見る事を試みたところ、転写量に比例して組み換え頻度が上昇しており、計測できた中で最も頻度が高いものでは *HOT1* 活性のない系の約 50 倍、細胞分裂 20 回に一回の頻度で相同組み換えが起こっていた。また、*HOT1* 転写量が最も高い系では多くのコロニーが生育せず、あまりにも高頻度な組み換えにより細胞分裂のチェックポイント制御がかかり死に至ったと考えられる。

*HOT1* の E 配列には複製阻害点 (Replication fork barrier; RFB) があり、Fob1 タンパクが結合して複製フォークの進行を阻害することが知られている。*FOB1* は *HOT1* の組み換え活性に必要であることから、*rdn*ΔΔ株において *FOB1* の影響を見たところ、*fob1* 欠失株では転写量、組み換え頻度双方において *FOB1* 株に比べて減少が見られたものの、全く活性がなくなったわけではなかった。このことから *FOB1* は *HOT1* の転写に必須ではないがその効率に関わっていると考えられる。また、rDNA においては Fob1 による複製阻害活性が組み換えに必要であったことからその活性について調べたところ、*rdn*ΔΔ株と野生株では組み換え頻度に差があるにも関わらず複製阻害活性には差が見られず、*HOT1* 活性は複製阻害によって引き起こされているのではないことが示唆された。

以上の結果から、転写量の増加により組み換え頻度は直接的に影響を受けることがわかった。また Fob1 および E 配列は *HOT1* においては複製阻害ではなく、PolII による転写を活性化する因子として働いていることが推測される。今回得られた相同組み換えが高頻度で活性化される系をさらに解析していく

ことにより、体細胞での相同組み換え活性化のメカニズムについて解明を進めることが出来ると期待される。繰り返し、あるいは散在する相同配列を多く持つ高等生物ではゲノムを安定に維持するため、相同組み換えを抑制する機構があると考えられている。組み換え活性化のメカニズムを利用することにより遺伝子組み換え等の技術の向上に貢献できると考えられる。

## 論文の審査結果の要旨

生物における相同時組換えは、減数分裂期や体細胞期において盛んに起こっているが、前者では多様性獲得に必至であり、後者では複製の正常な運行や傷害からの修復などに必至な役割を果たしている。減数分裂期の組換えは、高頻度に限定された部位(ホットスポット)で起こることから、その機構解析が進んでいるが、体細胞期のそれは低頻度でランダムに起こることから、組換え中間体等の解析が難しいのが現状である。そのため、体細胞期の活性の高いホットスポットがあればその解析に寄与することが予想される。本研究の中心テーマは、そのような強力な組換えホットスポットを作り出したことにある。具体的には出芽酵母のホットスポットであるHOT1の組換え頻度を著しく上昇させた系を新たに構築した。

HOT1DNAは、リボゾームRNA遺伝子(rDNAと呼ぶ)の2種類の非転写領域(EとI)から成る。これらはrDNAのエンハンサーとプロモーターに相当し、この断片を他のゲノム部位に挿入しても、そこからrDNA特異的転写酵素(PolII)による強い転写が起こり、それが組換え活性化の原因であることが示唆されていた。一方rDNAは核小体に局在しているが、出芽酵母では全rDNA欠失株(rDNAを有するヘルパープラスミドにより生存させる)が分離されており、その場合核小体は消滅する。この場合、同じく核小体に局在していたPolIIが、核内に拡散するためと思われるが、HOT1からの転写が大きく活性化される。当然、HOT1の組換えも大きく活性化されることが期待され、これを詳しく調べた。HOT1DNA、一倍体、二倍体、さらにFob1タンパク(後述)の影響を調べた。その結果、HOT1転写量と組換え活性化がよく比例し、10~100倍組換え頻度の上昇が観察された。これはおよそ20回分裂毎に一回組換えを起こしていることに相当し、体細胞期では最も高いものと思われる。そのため、組換え活性の高い株では、細胞増殖に異常をきたしたり、正確な組換え頻度測定が困難になることが観察された。一方、rDNAでは複製フォーク阻害が起こるが、それは阻害タンパク(Fob1)が阻害部位(RFB)に結合することで発現する。これまでRFBはHOT1のE断片内に含まれるため、HOT1活性へのフォーク阻害の寄与を調べられており、Fob1は野生株のHOT1活性に必須だが、フォーク阻害因子ではなく、転写活性化因子のように振る舞う。これについて調べたところ、Fob1がRFBに結合しHOT1DNA部分を核小体へ局在化させるモデルを強く支持した。

本論文では、これまでにない極めて活性の高い組換えのホットスポット系を確立している。今後この系を用いて、これまで困難であった組換え中間体分子を捉え、組換えの分子機構やそれに参加する遺伝子産物との関係を明らかにできると期待される。また強い転写が強い組換え活性を誘導することを見出した。ターゲティングの困難な生物ゲノム上の標的部位の転写を活発にすることでターゲティングの頻度上昇が上がる可能性を示している。さらに、Fob1-RFB複合体がHOT1DNA部分の核小体への局在化を促すという、興味ある現象を扱っている。DNAの局在化の興味あるモデルになりうる。

これらを総合的に評価し、本論文は、博士学位論文として十分に相応しい内容であると判断した。なお、本論文の中心部分は Genes to Cells に投稿し受理されている。

学位審査委員会における口頭発表は適切になされた。審査委員による口答試問においても的確な受け答えがなされたことから、申請者は自らの研究分野および関連分野に関して十分な学識を有すると判断された。また、論文が英語で書かれていることから、申請者は十分な英語力を有すると考えられた。以上から、申請者は試験に合格したと判断した。