

氏 名 宮崎 隆明

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1351 号

学位授与の日付 平成 22 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Gene amplification in the ribosomal RNA genes (rDNA)
is associated with selective sister chromatid segregation

論文審査委員 主 査 教授 仁木 宏典
教授 深川 竜郎
教授 荒木 弘之
助教 古谷 寛治
教授 岩崎 博史（東京工業大学）

論文内容の要旨

Irrespective of micro organisms or metazoans, cellular components sometimes unevenly inherited to the progenies during cell division. Currently, this phenomenon, which is known as an asymmetric cell division, is shown to be intimately connected with development and cellular homeostasis maintenance. In the asymmetric cell division subcellular constituents including transcripts, proteins, and organelle such as endoplasmic reticulum and centriole segregate unevenly. Moreover, chromosomal DNAs are also inherited unevenly, though the phenomenon remains to be confirmed. In this study, I constructed a system that enables us to detect the asymmetric sister chromatids segregation. Using the system I analyzed if the event is taken place in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. As a result, I succeeded in obtaining evidence that chromosome is unevenly segregated.

As a model system to analyze the asymmetric chromosome segregation, I employed the rDNA repeats that reside on the chromosome XII in *S. cerevisiae*. In the region, the copy number of rDNA repeats frequently varies and it was expected that distinct sister chromatids arise during DNA replication. For this reason, I assumed the non-random sister chromatid segregation can be observed in the rDNA. I continuously separated the progenies of cell division (the daughter and mother cells) by centrifugal elutriation to trace the fate of sister chromatids that are bearing the rDNA repeats. Consequently, when compared the rDNA copy number in the sorted cells, it was clearly different between the daughter and mother cell lineage. The daughter lineage constitutively inherited a sister chromatid that harbors increased copy number of rDNA, while in the mother lineage the number never changed. Therefore, it seemed like that the Chr. XII was differentiated during cell division and non-randomly segregated to the progenies. Remarkably, the inheritance of sister chromatids showed the lineage specificity. This indicated that *S. cerevisiae* was recognizing the two sister chromatids.

To explore the *cis* acting mechanisms underlying the asymmetric sister chromatid segregation, I analyzed the effect of centromere. In *S. cerevisiae*, centromeric sequences that associate with the kinetochore proteins have directionality. And also, some of the mitotic apparatuses involved in chromosome segregation are polarized during cell division. I speculated that there are some relationship between the polarity of centromere and mitotic apparatus, and the asymmetric sister chromatid segregation. To analyze the relationship, I exchanged the *CEN12* (Chr. XII centromere) sequences with other centromeric fragments that harbors opposite directionality and analyzed the phenotypes in the strain. Though it is still not confirmed about the pattern of sister chromatid segregation, the directionality of centromere seemed not to be important. However, as the inversion affected the growth, it remains unclear whether the

centromeric modification is independent of chromosome segregation.

As the other case, I also analyzed the effect of the directionality of rDNA repeat. On the tandemly aligned rDNA repeats, several biological processes, including transcription and replication, are performed in unidirectional way. I investigated whether this directionality is involved in the asymmetric chromosome segregation. For this purpose, the rDNA repeat was reconstructed in inverted direction using a strain that lost the rDNA repeat completely. Unexpectedly, the newly introduced rDNA repeats had lost the competency for increasing their copy number on Chr. XII. Therefore, the effect of the rDNA directionality could not be estimated.

Apart from the *cis* elements, then I thought about whether *trans* factors associate with the regulation of the sister chromatid segregation. In the mutants that affect stability (*sir2*Δ), nuclear localization (*heh1*Δ), and segregation (*bud6*Δ) of the rDNA, the fate of sister chromatid segregation was analyzed. In the *sir2*Δ and *heh1*Δ, the segregation pattern of Chr. XII was equivalent to that of WT. In the *bud6*Δ, it was not able to detect the rDNA copy number change by the strategy I used for the analysis. From these result, I speculated that nuclear positioning and chromatin structures of the rDNA had little to do with the pattern of sister chromatid segregation. However, it remained unclear about the effect of *bud6*Δ mutation.

Finally, I concerned about the possibility that the asymmetric chromosome segregation specifically occurred in the Chr. XII. To investigate this possibility, I performed BrdU pulse-chase analysis to trace the segregation pattern of whole chromosomes. In this analysis, I could not observe the apparently biased DNA strand retention in 16 chromosomes including the Chr. XII at least when recombination in the rDNA was repressed.

In conclusion, I obtained the first evidence of the asymmetric chromosome segregation in *S. cerevisiae*. Although it is still unclear how such a chromosome segregation was taken place, I speculated that *S. cerevisiae* maintains a system which recognize the two sister chromatids during cytokinesis. I plan to analyze the phenomena in detail to elucidate the mechanism and biological significance.

博士論文の審査結果の要旨

真核生物ではリボゾーム遺伝子が数百コピーにわたり反復配列し、リボゾームDNA領域と呼ばれる特異な染色体構造を形成する。出芽酵母では、約150コピーのリボゾーム遺伝子がXII番染色体上に反復して配列し、この高度な反復配列構造の維持機構やその生物学的な機能について多くの知見が得られている。特に、コピー数の維持の分子機構に、リボゾーム遺伝子のユニット内に存在する複製フォークの複製阻害点における停止とそれに続く組換え反応の関与が示され、DNA複製と組換えの共役反応を議論する上で重要な知見となっている。これを基盤に構築されたリボゾーム遺伝子の増幅モデルでは、リボゾーム遺伝子のコピー数の増加は複製した姉妹染色体分体の一方のみで起ると提唱されている。出芽酵母は非対称分裂によって娘細胞と母細胞に分裂しながら増殖するが、最近、細胞内のRNAやタンパク質も非対称に分配されることが報告された。しかし、染色体DNAが非対称に分配されているのか否かは不明であった。もし、このコピー数増幅を説明するモデルが正しいならば、リボゾーム遺伝子のコピー数の違いをもとに複製した姉妹染色分体を識別できること、そして、これを利用して、姉妹染色分体の娘細胞への分配がランダムであるのか、または、一定の規則性があるのかという問題の検証ができることとなる。宮崎隆明君は、実際に、このことを利用して、出芽酵母のXII番染色体が一定の規則を持って分配されていることを明らかにした。

染色体の上のリボゾーム遺伝子が2コピーまで減少した出芽酵母で、複製阻害点の結合タンパク質 FOB1 の発現を誘導すると複製フォーク停止反応が促進され、リボゾーム遺伝子が2コピーから増加するようになる。娘細胞と母細胞はその大きさの違いからエルトリエーター法により分離することが可能であった。そこでまず、分裂ごとに娘細胞と母細胞が効率よく分離回収できることを示した。FOB1 の発現を誘導の後に、娘細胞と母細胞をそれぞれ分離回収し、そのゲノムを電気泳動で分離した。さらに、リボゾーム遺伝子領域をサザンハイブリダイゼーション法により検出し、そのコピー数の変動を観察したところ、娘細胞の画分で確かにリボゾーム遺伝子の増幅が起こり、5コピーに増えている細胞が検出されることを明らかにした。さらに、6回の分裂まで追跡し、リボゾーム遺伝子の増幅を調べたところ、娘細胞の画分では15コピーまでの増加が認められ、その一方で母細胞の画分では3回の分裂まで観察したが2コピーから増加しないことを示した。これらの結果より、細胞分裂時の姉妹染色体分体の分配では、リボゾーム遺伝子の増幅した染色体が娘細胞へ分配されるという規則性があると結論している。

次に、リボゾーム遺伝子の増幅と姉妹染色体分体の分配様式の関連性を明らかにすべく、リボゾーム遺伝子の増幅に関わる要因についての研究を報告している。染色体上のリボゾーム遺伝子の向きを反対に変えた株では、リボゾーム遺伝子の増幅が起らないことを見いだしている。XII番染色体のセントロメア配列を逆向きに変えた場合やV番染色体のセントロメア配列に置換した場合には、正常なリボゾーム遺伝子の増幅を観察している。他方、染色体の維持に関わる因子等の欠損株として *sir2* と *heh1* 株を用い、これらの遺伝子破壊株では正常なリボゾーム遺伝子の増幅を観察している。しかし、*bud6* 欠損株ではリボゾーム遺伝子の増幅が抑制されることを見いだした。BUD6 はアクチンと相互作用し娘細胞へのタンパク質やプラスミド DNA の分配に関係しており、増幅したリボゾーム遺伝子と

その娘細胞への分配への関与を示唆している。調べた限り rDNA の増幅が起こらないものは、non-random な分配も起こっていないので、両者が密接に関係していると考察している。

以上のように本研究は、リボゾーム遺伝子のコピー数の増加のモデルを実験的に支持すると共に、姉妹染色体分体の分配様式に規則性があることを酵母で初めて証明することに成功したもので、この研究結果の意義は大きく、申請論文が博士の学位を授与するに足ると結論した。