

氏 名 鵜之沢 英理

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1840 号

学位授与の日付 平成28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 The ribosomal RNA gene repeat is transported to the nuclear  
pore complex for the repeat maintenance

論文審査委員 主 査 教授 仁木 宏典  
教授 角谷 徹仁  
教授 前島 一博  
教授 北川 大樹  
教授 岩崎 博史 東京工業大学大学院

論文内容の要旨  
Summary of thesis contents

The broken chromosomal DNAs need to be repaired correctly. The broken ends are usually repaired by DNA repair systems. If the broken ends are not repaired properly, they may cause rearrangement of the genome, such as deletion, translocation and amplification. These rearrangements could lead to diseases including cancer and cellular senescence. Therefore, it is important for cells to repair the broken ends correctly.

In DNA replication, the replication fork is stalled at a replication fork blocking site. The stalled replication fork possibly leads to the broken end at the site. The ribosomal RNA gene repeats (rDNA) in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* has a replication fork block site in which gene amplification recombination is induced. By the recombination, rDNA repeat number is recovered through the DNA double-strand break (DSB) repair pathway. In this system, DSB that is induced by Fob1 at the replication fork barrier (RFB) site is repaired by unequal sister-chromatid recombination. As the result, the some repeats are replicated twice to increase the repeat number. When the broken end recombines with improper repeating unit, deletional recombination or reorganization of the repeat may occur and the rDNA becomes unstable. Therefore, the rDNA is expected to have a system in which the recombination is properly regulated.

In our laboratory, through screening of genes that reduce rDNA stability, *TEL1* was identified. *TEL1* is an ortholog of ATM in mammals. Tell has several functions, such as telomere maintenance, checkpoint control, and DSB repair.

First, to confirm the change of repeat number in the rDNA, Chr.XII that has the huge rDNA repeat was analyzed by pulsed-field gel electrophoresis (CHEF). As the result, in the *tell* mutant, the rDNA was highly unstable to compare with that in the wild-type. Next, I investigated whether the function of Tell in the rDNA is dependent on Fob1 or not. When both *TEL1* and *FOB1* were deleted, the rDNA was stable. Thereby suggesting that Tell is involved in recombination repair for DSB caused by Fob1 at the RFB.

Tell is also known to be involved in the transportation of unrepairable DSB of non-rDNA to the NPC. However, the significance of the system is not revealed. We speculated that the rDNA is also isolated near the NPC and prevented recombination with improper copies. Our research purposes were to uncover whether the rDNA is translocated to the nuclear pore complex and to identify genes that are related to the translocation. If Tell is related to translocation of the rDNA to the NPC, it will be an important function of Tell to maintain the rDNA.

(別紙様式 2)  
(Separate Form 2)

To know whether the transportation system exists in the rDNA region, I performed ChIP assay and investigated the localization of the rDNA. As the result, the rDNA is surely located around the NPC. On the other hand, the pore localization of the rDNA is decreased in the *fob1* mutant. In the *fob1* mutant, as DSB is not induced, I speculate the Fob1-dependent DSB is necessary for translocation of the rDNA to the NPC. Moreover, the rDNA association with the NPC is decreased in the *tell1* mutant. The DSB translocation of non-rDNA region was shown in an artificial system that an unreparable DSB is induced by HO endonuclease without any template for repair in the mating type locus on the ChrIII. On the other hand, DSB in the rDNA is induced in the natural process. In the replication of the rDNA, the broken end occurs at the RFB site by blocking the replication fork machinery. Hence I expected the some factors for the transportation of the rDNA to the NPC are different from those for the anchoring the artificial DSB to the NPC. I focused on factors that function in both the rDNA and the nuclear membrane. By ChIP assay, I found that the condensin recruiting factors to the RFB are necessary for the transportation of the rDNA to the NPC.

As for the biological meaning of the rDNA translocation, I speculate that DSB should be isolated from other repeats to avoid improper recombination. Moreover, we assume that the localization is required for the rDNA condensation that is important for chromosome segregation and repeats maintenance.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

出芽酵母のrRNA遺伝子は第12番染色体上に150コピーほどの繰り返し配列として存在する。一般に繰り返し配列では重複や欠損によるコピー数の変動が生じやすいにもかかわらず、出芽酵母の野生株ではrRNA遺伝子のコピー数はほぼ一定に保たれている。これまでに遺伝学的な解析から出芽酵母でのrRNA遺伝子のコピー数の安定維持機構の一端が明らかになっている。rRNA遺伝子領域内には複製フォークバリアー (RFB)と呼ばれる複製停止配列があり、そこに結合するFob1タンパク質により複製フォークは停止する。この停止した複製フォーク内でDNAの二重鎖切断 (DSB)が誘発される。生じたDNA切断は組換え反応により修復を受けるのであるが、修復の際にrRNA遺伝子領域の姉妹染色体の間で不均衡組換え反応が起り、この不均衡組換え反応によりrRNA遺伝子の増減が起こると説明されている。実際にFob1タンパク質やその関連因子、DNA切断の組換え修復反応の制御に関わる因子がrRNA遺伝子の増幅の制御に関与していることがすでに明らかにされている。さらにrRNA遺伝子の増幅制御に関与する因子を探索する目的で出芽酵母の網羅的な遺伝子欠損株からrRNA遺伝子コピー数が不安定になる変異株のスクリーニングがなされ、多数の変異株が分離されている。その中で*tel1*遺伝子が見つかり、*tel1*遺伝子欠損によるrRNA遺伝子不安定化の分子機構を鶴之沢さんは遺伝学的な手法を用い研究を行った。

*tel1*遺伝子はDNAの末端に結合する因子でテロメアの維持、DSBの修復及びDNA損傷修復時に細胞周期を一時的に止めるチェックポイント因子として働く多機能な因子である。*tel1*変異体でFob1タンパク質依存的にrRNA遺伝子の増幅が起こることを確かめ、rRNA遺伝子内での複製停止に伴うDSBの修復時に*tel1*遺伝子が働いていることをまず明らかにした。最近、Tel1タンパク質はDSBに結合し、核膜孔にDSBを局在させることが報告されている。そこでrRNA遺伝子内でのDSBも同様に核膜孔への局在が起こるか否かを調べた。方法としては核膜孔に局在するタンパク質とrRNA遺伝子内のDSB領域の結合の有無を、クロマチン抗体沈殿法 (ChIP法)により定量的に分析した。核膜孔タンパク質に対する抗体を用いたChIPの結果、確かにrRNA遺伝子内のDSB領域が核膜孔タンパク質と共に検出された。DSB領域と核膜孔タンパク質の結合はFob1タンパク質依存的であり、核膜孔タンパク質としてNup84が関与していることも特定した。加えて核膜の内膜タンパク質であるMps3もDSB領域の核膜移行に関与していることを明らかにしている。他方、DNA修復に関与するクロマチンリモデリング因子であるINO80やArp5がDSB領域の核膜移行に必要であることも見出した。rRNA遺伝子は染色体凝縮因子であるコンデンシンに富む領域であることが知られている。コンデンシンをrRNA遺伝子ヘリクルートするためには、Tof2, Csm1, Lrs4が必要である。これらの因子もまたrRNA遺伝子内のDSB領域の核膜移行に関与していることを明らかにしている

DSBの修復のため、DSB領域が核膜へ移行し核膜に局在するという報告は人為的にDSBを起こさせたモデル系で研究されていたが、今回の鶴之沢さんの研究から細胞内で自発的に生じたDSBにおいてもDSBは核膜移行し核膜に局在することが明らかとなった。また、RNA遺伝子領域に多く局在するコンデンシンのrRNA遺伝子のコピー数安定維持に果たす新規の機能を示唆する結果も見出した。これらの研究成果はrRNA遺伝子のコピー数安定維持機構の理

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

解を深める学術上の優れた研究であることから鶴之沢さんの学位提出論文は博士号授与の要件を満たすと審査員全員一致で判断した。