

氏名	し かつ み ほ 四 方 美 穂
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学位記番号	生 博 第 100 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	生 命 科 学 研 究 科 統 合 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	分 裂 酵 母 <i>tel2⁺</i> 遺 伝 子 の 機 能 解 析

論文調査委員 (主査) 教授 石川冬木 教授 西田栄介 教授 米原 伸

論 文 内 容 の 要 旨

DNA複製チェックポイントとは、DNA複製中のDNA損傷や複製の遅延に反応して、異常が解決するまで細胞周期を一時的に停止するシグナル伝達経路であり、染色体の安定性に寄与している。Tel2/Rad-5/Clk-2ファミリー蛋白質は、出芽酵母、線虫、ヒトにおける解析から、DNA複製チェックポイントをはじめとして、細胞増殖、テロメア維持、生物時計などの様々な細胞内現象に関与すると考えられている。しかしTel2ファミリー蛋白質が細胞内で機能する詳細な分子メカニズムは、これまで明らかにされていなかった。

申請者は分裂酵母ゲノムデータベース上で、*tel2⁺* 相同遺伝子を発見し、その機能解析を行った。分裂酵母 *tel2⁺* は細胞増殖に必須であり、その破壊株ではS期の進行に異常がみられた。染色体上の *tel2⁺* 遺伝子上流にチアミンにより抑制される *nmt81* プロモーターを挿入して細胞内の *tel2⁺* の発現を抑制すると、細胞の生存率と増殖速度は低下し、細胞形態の異常が観察された。この株は、テロメア長には変化を示さなかったが、DNA合成阻害剤であるヒドロキシウレア (HU) や、ピリミジンダイマーの形成を誘導しDNA複製を停止させるUV照射に対して感受性を示した。またこの感受性は、チェックポイントキナーゼ Chk1 の欠損により増大した。さらにTel2は、HUにより誘導される、もう一つのチェックポイントキナーゼ Cds1 による細胞周期の停止に必要であった。以上の結果からTel2はHUやUVによって誘導されるチェックポイント経路において、Chk1とは独立に、Cds1と同じ経路で機能していると考えられた。実際に、*tel2⁺* の発現を抑制した株では、DNA損傷及びHUに反応した、チェックポイントセンサーRad3によるChk1のリン酸化は正常におきていたが、HUに反応したRad3によるCds1の活性化は著しく抑制されていた。さらにこの株では、Rad3によるCds1の活性化に必要な、チェックポイントメディエーターMrc1のリン酸化が起きていなかった。これらの結果から、Tel2は複製阻害に反応したMrc1-Cds1の活性化を制御することにより、DNA複製チェックポイントに寄与していると考えられた。またTel2は複製フォークの保護を行うSwi1欠損株の生存に必須であり、*nmt81-tel2⁺swi1* 二重変異株では、DNA複製期で自発的なDNA損傷が生じていた。この現象は、*swi1 cds1* 二重破壊株ではみられなかったことから、Tel2のチェックポイントとは独立な機能によるものと思われた。以上の結果から、Tel2は、DNA複製チェックポイントに必要であり、また同時にDNA複製期においてチェックポイントとは独立にゲノム維持に関与すると考えられた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

染色体の安定性を守るためには、DNAの損傷からの保護、正確な複製と分裂、そしてこれらが協調的に起きることが必要である。これを守る仕組みの一つが、DNA複製中の異常に反応して異常が取り除かれるまで細胞周期を一時的に停止する、DNA複製チェックポイント機構である。また、この一時的な停止の間に、停止中の複製フォークを安定に保護しておくことは、複製の再開のために必要である。

本研究はDNA複製チェックポイントに関わる分裂酵母 *tel2⁺* について解析を行ったものである。Tel2ファミリー蛋白質

は、出芽酵母、線虫、ヒトにおける解析から、DNA複製チェックポイントをはじめとして、細胞増殖、染色体末端テロメアの維持、生物時計などの様々な細胞内現象に関与すると考えられていたが、その詳細な機能は明らかにされていなかった。申請者は分裂酵母の *tel2⁺* ホモログをデータベースより発見して分裂酵母 *tel2⁺* と名付け、その機能解析を行った。*tel2* 破壊株は致死であったため、申請者は染色体上の *tel2⁺* 遺伝子上流に *nmt81* プロモーターを挿入し、細胞内の *tel2⁺* 発現量を誘導的に抑制できる系を作成した。*tel2⁺* 発現抑制株を用いた解析から、分裂酵母 Tel2 がチェックポイントメディエーターである Mrc1 のリン酸化、及びチェックポイントエフェクター Cds1 の活性化を制御することにより、DNA複製チェックポイントに必要であることが明らかとなった。この結果は、Cds1 及びもう一つのチェックポイントエフェクターである Chk1 の欠損と *tel2⁺* 発現抑制との遺伝学的相互作用とも一致していた。また Tel2 は S 期において停止した複製フォークを安定に保護する Swi1 と協調して、染色体の安定化に寄与していた。この Tel2 の染色体安定化機能は Cds1 欠損株ではみられなかったことから、Tel2 は複製チェックポイント機能とは別に、S 期で染色体を保護する機能を持つと考えられた。

本研究は Tel2 ファミリー蛋白質の下流の因子を明らかにし、染色体安定化機能を持つことを示した初めての報告であり、正確に複製を行うメカニズムの解明をはじめとする、今後の研究の発展に寄与すると考えられる。

以上より本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。

また、平成19年1月25日論文公聴会を開催し、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。