

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	入江裕之
論文題目	分裂酵母テロメア結合因子 Taz1、Rap1 による大規模染色体再編抑制機構		
(論文内容の要旨)			
<p>突然変異の中でも、染色体欠失・転座・増幅などの大きな染色体構造の変化を伴う変異は、あわせて大規模染色体再編 (GCR, gross chromosomal rearrangement) と呼ばれ、特に固形腫瘍の成立に重要な役割を果たしているが、その発生機構の理解は進んでいない。申請者は、分裂酵母 GCR に関わる遺伝子を明らかにする目的で、Kolodner 博士が出芽酵母において既に確立した GCR 頻度測定系を分裂酵母に応用し、どのような遺伝子が GCR を抑制し安定なゲノム情報の維持に関わっているのかを解析した。</p> <p>申請者は、まず、分裂酵母の 3 本の染色体のうち、第 1 番染色体右腕テロメアより約 150 kb 内側に <i>ura4</i> およびヘルペスウイルス由来 thymidine kinase (TK) の二つのネガティブ選択が可能なマーカー遺伝子を挿入した株を得た。<i>ura4</i> および TK 遺伝子をもつ細胞はそれぞれ 5-フルオロオロチン酸 (5-FOA) および 5-フルオロデオキシウリジン (FUdR) にそれぞれ感受性である。挿入部位よりも下流には生存に必要な遺伝子は存在しないため、5-FOA と FUdR 存在下で生存する細胞は、GCR により <i>ura4</i> および TK 遺伝子を失っていることが期待された。上記細胞株を用いて、5-FOA・FUdR 耐性株を取得し、それらが第 1 番染色体右腕の欠失、一部において第 1 番染色体右腕の転座をもつことを明らかにし、GCR 頻度が約 10^{-9}/細胞分裂であることを示した。このことから、上記株を Luria-Delbrück の fluctuation アッセイに供することにより、GCR 頻度の測定が分裂酵母においてはじめて可能になったと結論づけている。</p> <p>次に、申請者は、分裂酵母テロメア機能に必要なシェルタリン複合体構成因子 Taz1 および Rap1 をコードする遺伝子を欠失させると、GCR 頻度が数十倍に亢進することを示した。その分子機構として、野生株に比べて非常に長いテロメアをもつ <i>taz1</i> あるいは <i>rap1</i> 遺伝子欠損株テロメア DNA に GCR 抑制に必要な因子が過剰に結合した結果、テロメア以外の領域にその因子が相対的に少量しか存在しなかったことによる間接的な影響と、Taz1 あるいは Rap1 がこれまで知られていなかったテロメア以外のゲノム領域の GCR を抑制する機能をもつ直接的な影響の両者が考えられた。そこで、申請者は、テロメア配列をもたない環状染色体だけでゲノムを維持する株を分離し同様の GCR アッセイを行い、<i>taz1</i> あるいは <i>rap1</i> 欠損株は対照株に比べて有意に高い GCR 頻度をもつことを示した。このことは、Taz1 および Rap1 はテロメア以外のゲノム領域に直接的に作用して GCR を抑制する機能をもつことを支持するものと解釈された。申請者は上記マーカー遺伝子挿入部分に誘導性に DNA2 本鎖切断 (double strand break, DSB) をもたらしうる株を作成し、<i>rap1</i> のさまざまな欠失変異体を用いて DSB 誘導後の修復反応を検討した。その結果、Rap1 には N 末端に DSB 修復を促進する新たなドメインが存在し、これがシェルタリン因子 Poz1 との結合ドメインとあわせて GCR 抑制に貢献することを証明した。</p> <p>以上より、申請者は分裂酵母 GCR 頻度を測定する系をはじめて樹立し、テロメア因子 Taz1 と Rap1 が当該部分の GCR 発生を直接的に抑制する可能性を見出した。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

染色体転座や欠失などの大規模染色体再編(GCR)は、次世代シーケンサーを用いた「がんゲノム」プロジェクトによって特に固形がんにおいて多数発見され、そのあるものは転座の結果融合蛋白質を産生するなどによって正常細胞をがん化させる「ドライバー変異」の役割を果たしていることが知られている。しかし、GCRがどのような分子機構により生じるのかは明らかではない。

申請者は、遺伝学的な実験が容易であり、テロメア生物学がよく研究されている分裂酵母に注目して、出芽酵母において以前に Kolodner 博士によって報告された GCR 発生頻度を測定する実験系を分裂酵母に応用することに成功した。この系を用いてテロメア関連遺伝子の破壊株について検討したところ、テロメア機能に重要な役割を果たすシュルタリン複合体の構成因子 Taz1 および Rap1 の遺伝子破壊株で顕著な GCR 頻度の増加を観察した。次に、この増加がこれらテロメア蛋白質の非テロメア領域である GCR 発生部位に対する直接的な GCR 抑制作用に由来するのか、*taz1*, *rap1* 変異株で見られる異常テロメアを介した間接的な影響の結果であるのかを、テロメア配列をもたない環状染色体について GCR 頻度を測定するという極めて巧妙な方法で検討し、直接的な作用を支持する結果を得ている。さらに、このことを詳細に解析するために、DNA2 本鎖切断(DSB)を誘導する系を樹立し、Rap1 蛋白質が DSB 修復促進とテロメレース反応の抑制をそれぞれ異なる二つのドメインで行い、両者あわせてゲノムワイドな GCR を抑制しているという独創的な仮説を提唱している。これらの成果は、申請者のテロメア生物学に関する豊富な知識と、新しい系を樹立させるという科学的興味から生じた強い意志があっはじめて行いえた研究である。特に、分裂酵母テロメアは、ヒトなどの高等真核生物テロメアに機能構造が類似している一方、Kolodner 原法が開発された出芽酵母は類似していないことから、本研究で得られた成果は、ヒト GCR 発生機構の解明にも役立つ可能性のあるユニークな意義をもつものと言える。

以上のように、本論文は生命科学に関する高度で幅広い学識、染色体研究分野における優れた研究能力、そして生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見もしくは概念等が示されており、論理的かつ一貫性を持って記述されている。よって博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。更に、令和元年10月2日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。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日