

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

入江 裕之

## 目次

<b>要旨</b>	3
<b>略語表</b>	4
<b>第一章 序論</b>	5
1-1 がんは突然変異によって引き起こされる	6
1-2 大規模染色体再編 (GCR) のがん化への影響	6
1-3 GCR の発生機構	7
1-4 テロメア	9
1-5 シェルタリン複合体	12
1-6 本研究の目的	13
<b>第二章 材料と方法</b>	15
2-1 試薬・酵素等	16
2-2 大腸菌、分裂酵母株とその操作	16
2-3 GCR 頻度の測定	16
2-4 GCR の切断点の位置・配列の決定	17
2-5 部位特異的な二本鎖切断 (DSB) の誘導	19
2-6 クロマチン免疫沈降 (ChIP)	20
<b>第三章 結果</b>	27
3-1 GCR 頻度測定系の構築	28
3-2 GCR 頻度の測定と出芽酵母 GCR アッセイとの比較	29
3-3 Taz1、Rap1 は GCR を抑制する	32
3-4 Poz1、Stn1 の GCR 頻度への影響	33
3-5 NHEJ は <i>taz1</i> Δ株、 <i>rap1</i> Δ株での GCR 頻度の増加に必須ではない	34
3-6 テロメアヘテロクロマチンの消失は GCR 頻度を上昇させない	36
3-7 核膜内膜蛋白質は Taz1、Rap1 とは別経路で GCR を抑制する	37
3-8 テロメレーズの脱制御は <i>taz1</i> Δ株と <i>rap1</i> Δ株での GCR の増加に必須である	38
3-9 Taz1 はテロメア DNA 非存在下で GCR を抑制する	39
3-10 Rap1 の BRCT ドメインは GCR の抑制に重要である	42
3-11 Taz1、Rap1 は DSB 誘導時の生存を促進する	43
3-12 Taz1、Rap1 は DSB 誘導時の末端欠失を抑制する	45

3-13	<i>taz1</i> Δ株、 <i>rap1</i> Δ株では新規テロメア付加の切断点の分布が異なる	46
3-14	Taz1、Rap1 による GCR の抑制と DNA 損傷薬剤への耐性の関連	49
3-15	Taz1、Rap1 の DSB 誘導部位への局在	49
<b>第四章 考察</b>		<b>51</b>
4-1	テロメア因子 Taz1、Rap1 が非テロメア領域の GCR を抑制する機構	52
4-2	Taz1、Rap1 は DSB 修復を促進する	53
4-3	Rap1 の BRCT ドメインの DSB 修復・GCR 抑制における機能	53
<b>文献</b>		<b>55</b>
<b>謝辞</b>		<b>60</b>

## 略語表

5-FOA	5-fluoroorotic acid
ahTET	anhydrotetracyclin
BFB	breakage-fusion-bridge
BIR	break-induced replication
bp	base pairs
ChIP	chromatin immunoprecipitation
CMV	cytomegalovirus
DNA	deoxyribonucleic acid
DSB	double-strand break
DSE	double-strand end
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EMM	Edinburgh minimal medium
FF	5-FOA and FUdR
FUdR	5-fluoro-2'-deoxyuridine
GCR	gross chromosomal rearrangement
HDR	homology-directed repair
HR	homologous recombination
I-SceIcs	I-SceI cut site
kb	kilo base pairs
MMS	methyl methanesulfonate
NHEJ	non-homologous end-joining
NS	non-significant
PCR	polymerase chain reaction
qPCR	quantitative PCR
RNA	ribonucleic acid
SDS	sodium dodecylsulfate
TAE	tris-acetate-EDTA
TE	tris-EDTA
TK	thymidine kinase
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
YES	yeast extract with supplements

## 要旨

細胞が生存し、正常に増殖する上で、ゲノム DNA への突然変異の発生を抑制することは必要不可欠である。一方、がん細胞においては突然変異が頻繁にみられる。近年の次世代 DNA シーケンシング技術の発展により、がん細胞ゲノム DNA 構造の解析が大規模に行われるようになり、突然変異の中でも、転座、欠失、部分配列の増幅などの染色体の構造変化である大規模染色体再編 (GCR, gross chromosomal rearrangement) が、がんの発生および悪性化において重要な役割を果たすことが明らかになってきた。一方、線状染色体の末端テロメアでは、テロメア結合蛋白質複合体であるシェルタリンが染色体同士の末端融合の抑制とテロメア長の維持を行うことで染色体の安定性を担保している。そのため、シェルタリンは、そのテロメアにおける機能を介して GCR を抑制していると言える。その一方で、シェルタリンが非テロメア領域で直接的に GCR を抑制する機能を持つか否かは明らかではない。本研究では、シェルタリンの GCR への影響を明らかにするために、シェルタリンが保存されて存在する分裂酵母において GCR 頻度を測定できる系を樹立し、シェルタリンの変異株でその頻度を測定した。その結果、シェルタリン構成因子である Taz1 および Rap1 (それぞれ哺乳類の TRF1/2、RAP1 のホモログ) が欠損すると GCR 頻度が上昇し、染色体の末端欠失が蓄積することが明らかとなった。Rap1 のドメイン解析より、Rap1 はその二つのドメイン (BRCT ドメインおよび Poz1 結合部位) を用いて、互いに独立した経路を介して GCR を抑制することが明らかになった。このうち BRCT ドメインは、I-SceI エンドヌクリエースを用いた DSB の誘導実験から、正確な DSB 修復を促進することが示唆された。また、Poz1 結合部位については、Poz1 と相互作用を行うことで、DSB におけるテロメレース反応を制御し、そのことで新規テロメア付加の発生を抑制すると考えられた。このように、本研究は、シェルタリン構成因子 Taz1、Rap1 について、非テロメア領域における GCR を防ぐことでゲノムの安定性を保つという新規機能を明らかにした。

# 第一章

## 序論

### 1-1 がんは突然変異によって引き起こされる

がんは、日本人の死因の約 3 割を占める疾患である。がんは非常に多様な組織型を示し、発生する臓器、組織、症状、治療法も様々である。しかし、すべてのがんは共通して、突然変異と自然選択から成るダーウィン進化の過程によって発生する(Stratton et al. 2009)。細胞分裂過程の染色体複製における誤りや、外部からの変異原などによって、ゲノム DNA にはしばしば突然変異が生じる。多くの突然変異はその細胞の増殖能に影響を与えない変異であるが、増殖、分化、細胞死などを制御する遺伝子の機能が突然変異によって変化することで、その細胞の増殖能が高まることがある。このような突然変異をドライバー変異という。多くの突然変異は、ゲノム DNA の複製などの細胞分裂に伴う過程で発生するため、増殖能が高まった細胞は、新たな突然変異を獲得する機会が増え、さらにドライバー変異を獲得する可能性が高くなる。こうした正のフィードバックループによって細胞のがん化が進行する。このように、がんは、体細胞のゲノム DNA に生じた突然変異により発生し、進行していく。そのため、がんの進行を抑えるためには突然変異が発生する機構を理解することが重要である。

### 1-2 大規模染色体再編(GCR)のがん化への影響

DNA 突然変異には、点変異や数塩基の挿入・欠失といった小規模な塩基配列変化の他に、染色体の転座・欠失・部分配列の増幅などの大規模な染色体の構造変化が含まれる。染色体の大規模な構造変化は、大規模染色体再編 (GCR, gross chromosomal rearrangement) と呼ばれる。小規模な配列変化は、アミノ酸置換によるがん遺伝子の活性化や、フレームシフト変異によるがん抑制遺伝子の不活性化などを引き起こす。これに対して、GCR はがん抑制遺伝子の欠失や異なる遺伝子間の融合、プロモーター領域の転座によるがん遺伝子の活性化などを引き起こすことによって、がん化に貢献すると考えられている。固形腫瘍においては、長い間、GCR の発がんへの貢献は小さいと考えられていたが、近年、次世代シーケンシング技術のがんゲノム解析への応用も手伝って、発がんに関与する融合遺伝子が数多く発見された(Tomlins et al. 2005; Soda et al. 2007; Maher et al. 2009)。また、これまでのがん細胞で報告された変異の中から、原がん遺伝子に生じた突然変異を抽出すると、その大半が転座であった(Futreal et al. 2004)。

大部分のがんでは、遺伝情報が安定に保持されなくなる遺伝的不安定性が観察される。遺伝的不安定性を獲得したがん細胞は、突然変異頻度が増加することでドライバー変異を獲得しやすくなるために、がんの悪性化が進行しやすくなると考えられる。一般的にがんは、GCR や染色体数の変化の頻度が増加する性質 (染色体不安定性) を持つものと、特定の反復配列において点変異やフレームシフトの頻度が増加する性質 (マイクロサテライト

不安定性) を持つものの 2 種類に分けることができる(Lengauer et al. 1997)。マイクロサテライト不安定性については研究が進んでおり、ミスマッチ修復経路の遺伝子の変異によって不安定性が引き起こされることが明らかにされている(Fishel et al. 1993; Leach et al. 1993)。しかし、多くのがんが染色体不安定性を示すのにも関わらず、染色体不安定性の機構はよく理解されていない。

### 1-3 GCR の発生機構

GCR の発生機構を明らかにするためには、GCR の発生を評価する実験系が必要である。GCR は小規模な塩基配列変化と比較して低頻度でしか発生しないため、定量的な解析が困難であった。しかし、Kolodner らにより出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において GCR 頻度測定系が確立され、GCR に関する多くの知見が得られた。例えば、これまでの研究から、GCR は DNA 二本鎖切断 (DSB, double-strand break) により生じた DNA 二本鎖末端 (DSE, double-strand end) を基質として起こることが示唆されている(Chen and Kolodner 1999)。DSB は細胞外からの電離放射線、DNA 複製の失敗、テロメア (1-5 節に述べる) の短小化など様々な原因により引き起こされる。DSB によって生じた DSE は、初めに MRN 複合体により認識される。それに続いて様々な蛋白質がリクルートされることで、DNA 損傷応答が引き起こされる。具体的には、DNA 損傷チェックポイントの活性化による細胞周期の停止が引き起こされ、DSE がエキソヌクレアーゼによる切除を受けることで一本鎖 DNA が作られた後に、DSB 修復が行われる。一般的に、G2 期など姉妹染色分体が存在するときは、DSB で生じた 2 つの DSE が、姉妹染色分体間で相同組換え (HR, homologous recombination) を起こして、相同領域を鋳型とした DNA 合成が行われると考えられている (図 1-3A)。姉妹染色分体が存在しないときは、DSE 同士が直接結合する非同源末端結合 (NHEJ, non-homologous end-joining) が起こる (図 1-3B)。これらの機構が正常に機能する場合、すなわち DSB で生じた 2 つの DSE が、同じ相同配列を鋳型に DNA 合成を行う場合や、互いに NHEJ を起こす場合、GCR は発生しない。一方、これらの機構が誤った基質を対象として作用した場合、GCR が発生しうる。例えば、DSB や複製フォークの停止で生じた DSE (後述) の片側だけが、その DSE と偶然類似した配列との間で HR を起こすことがある。その部分から DNA 複製が進行する現象は break-induced replication (BIR) と呼ばれ、GCR のうち転座を引き起こす原因となる (図 1-3C)。また、後述するが、主にテロメアで機能するテロメラーゼが DSE で機能することで、DSE に新規にテロメア反復配列を付加する機構が存在する。この機構が完了すると DSE は対となる DSE 側の配列を欠失した状態で安定化してしまう (図 1-3D)。このように、DSB を元通りに修復して GCR を防ぐためには正しい修復経路が正しい基質に作用することが重要である。これまでの研究で、GCR を引き起こさない修復経路を阻害すると GCR 頻度が上昇するとともに、複数のそうした経路を阻害すると GCR 頻度の上昇が相乗的に大



きくることが明らかになっている(Myung et al. 2001)。そのため、同じ DSE という基質をめぐって GCR を引き起こさない修復経路と引き起こす修復経路が競合しており、誤った修復経路により DSB が修復されることで、GCR が起こるといふモデルが提案されている。

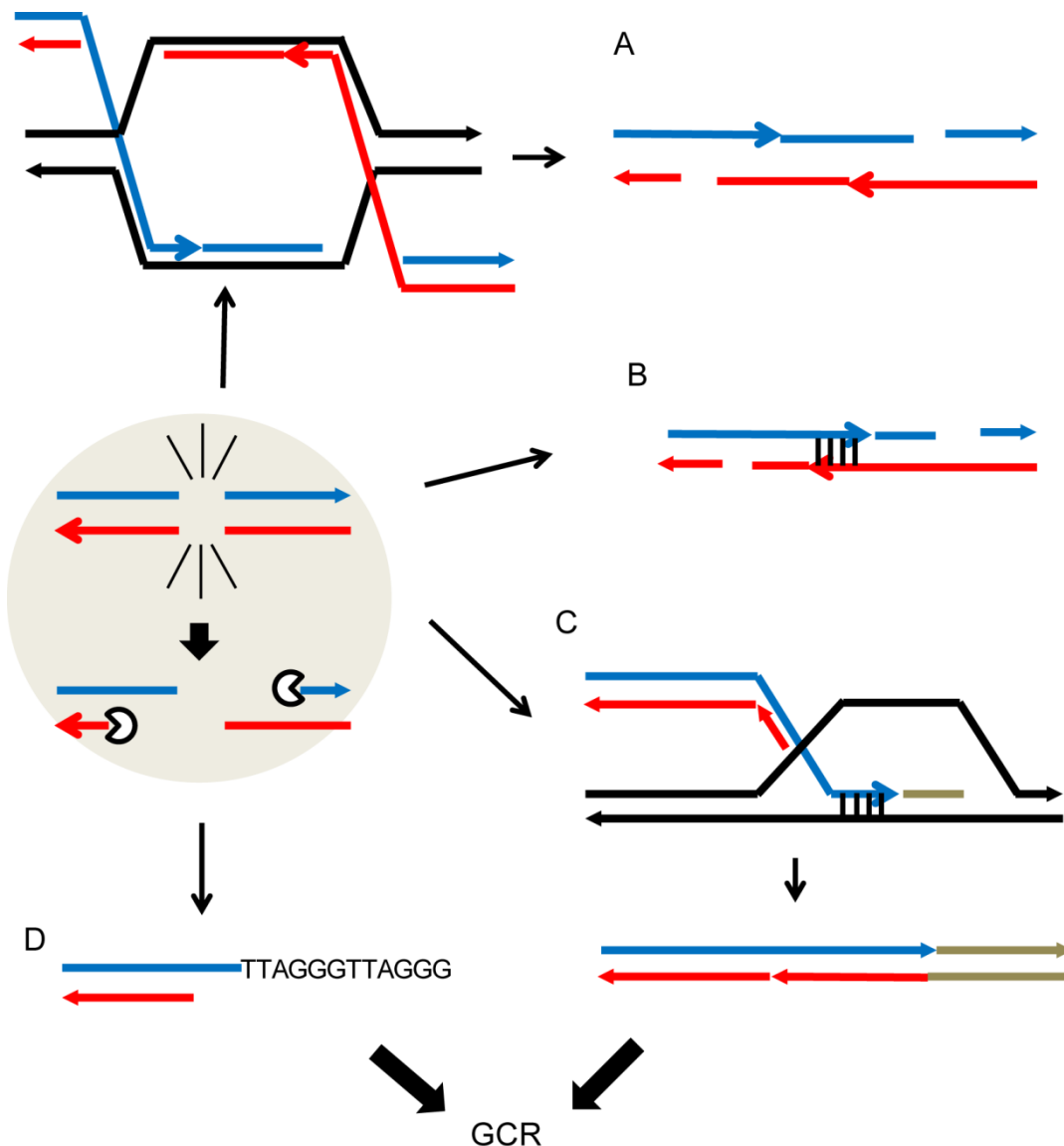


図 1-3 DSB の修復機構

DSB が発生すると、DNA の 3' 末端がエキソヌクレアーゼによる切除を受けた後、以下の機構で修復が行われる。赤色および青色の矢印は、DSB を受けた DNA の二本鎖を示す。

- (a) HR を利用した修復。双方の DSE が、姉妹染色体の相同配列を鋳型にして、後で DSE 同士が結合するための DNA を合成する。
- (b) NHEJ。DSE 同士がそのまま、あるいは露出した一本鎖同士の短い相同配列を利用して結合する。
- (c) BIR。片方の DSE が他の二本鎖 DNA (黒矢印) の相同部分と HR を起こし、複製フォークを形成して、染色体末端まで DNA 複製を行う。姉妹染色体分体以外を鋳型とした複製を行った場合、他

方の DSE の側にある配列は失われ、転座が起こる。

(d) 新規テロメア付加。DSE に対してテロメラーゼがテロメアを新規に合成する。他方の DSE の側にある配列は失われ、代わりにテロメア反復配列が付加される。

#### 1-4 テロメア

真核生物の線状染色体末端は、テロメアと呼ばれる DNA-蛋白質複合体を形成している。テロメア DNA 配列は、グアニンに富んだ反復配列から成る G 鎖とその相補鎖の C 鎖から構成されている。最末端には 50~500 ヌクレオチドの G 鎖が一本鎖 DNA として突出しており、G テイルと呼ばれる (図 1-4A)。こうしたテロメア DNA の反復配列に対して特異的に結合する因子が存在し、以下に記すように、テロメア DNA の保護と複製に重要な役割を果たす。1-3 に述べたように、テロメア DNA は構造的に DSB により生じた DSE と類似しており、実際に多くの DNA 損傷応答に必要な因子がリクルートされる。しかし、テロメア結合蛋白質は、これらの DNA 損傷応答関連因子の機能を抑制することで、DNA 損傷応答からテロメアを保護している。この保護を失うと、テロメアは DSB により生じた DSE と同様に、DSB 修復反応および細胞周期の停止を引き起こす。DSB 修復を受けた DSE は、1-3 節に述べたように GCR に変換されうる。また、セントロメアを持つ染色体同士が DSE の部分で融合すると、セントロメアは M 期に紡錘体からの微小管が結合する動原体となるため、2 つの動原体が細胞分裂の際に互いに反対側の紡錘体から引力を受けることで、融合染色体が物理的に切断される可能性がある。このとき生じた DSE は、再び他の染色体と融合して、次の染色体断裂のサイクルを引き起こす (図 1-4B)。この一連のサイクル (BFB サイクル, breakage-fusion-bridge サイクル) は、McClintock により発見されたものであり (McClintock 1941)、DSE から新たな DSB が引き起こされるサイクルである。

通常の DNA ポリメラーゼを用いた半保存的 DNA 複製において、DNA ポリメラーゼは DNA 合成の開始に RNA プライマーを必要とし、5' → 3' の方向にしか進行しない。このため、RNA プライマーが G 鎖の末端に合成されたとしても、RNA プライマーが除去され、5' 末端にギャップが生じてしまう。また、テロメアの C 鎖を鋳型として複製されたテロメアは、G テイルを失ってしまう (図 1-4C)。このため、細胞分裂を繰り返すごとにテロメアは短小化していく (Watson 1972)。短小化したテロメア DNA は、先に述べたテロメア因子が結合できなくなるため保護機能を失い、DSE として認識される。このテロメアの短小化を防ぐために、多くの真核生物およびヒトの幹細胞はテロメラーゼと呼ばれる逆転写酵素を発現している (Greider and Blackburn 1987)。テロメラーゼは内在する RNA 分子を鋳型として、テロメア DNA の G 鎖 3' 末端にテロメア反復配列を付加する。このため、テロメアは、このテロメラーゼをリクルートすることで短小化を防ぐことができる。テロメラーゼを欠損した出芽酵母では、GCR 頻度は上昇しないものの、野生型ではほとんど検出

されない染色体融合が有意な頻度で起こるようになる。このとき、テロメラーゼと同時に、チェックポイント機能やテロメアの保護機能を持つ蛋白質リン酸化酵素である *tell* を欠損すると、染色体融合の頻度とともに、転座や欠失の頻度が大きく上昇する (Chan and Blackburn 2003; Pennaneach and Kolodner 2004)。このことから、テロメラーゼが短小化して他のテロメア保護蛋白質の機能が弱まった際に、Tel1 が大部分のテロメアの保護を行っており、*tell* を欠損するとテロメアの脱保護によって起こる染色体融合が発端となって BFB サイクルが起こり、DSB を引き起こすために起こると考えられる。

また、染色体 DNA を DNA ポリメラーゼで複製する際も、テロメア DNA は、大量に存在するグアニンが四重鎖構造をとる、あるいはテロメア結合蛋白質が DNA に結合することで複雑な構造をとると予測され、複製フォークが進行しにくいと考えられている。このため、ヒトおよび分裂酵母においては、テロメア二本鎖 DNA 結合蛋白質である TRF1 および Taz1 (1-5 節に述べる) がそれぞれ複製フォークの円滑な進行を促進している (Sfeir et al. 2009; Miller et al. 2006)。複製フォークの停止は DSE へと変換されることで GCR を引き起こすことが示唆されている (図 1-4D)。このように、テロメア結合蛋白質は GCR の抑制に関して重要な機能を果たしている。

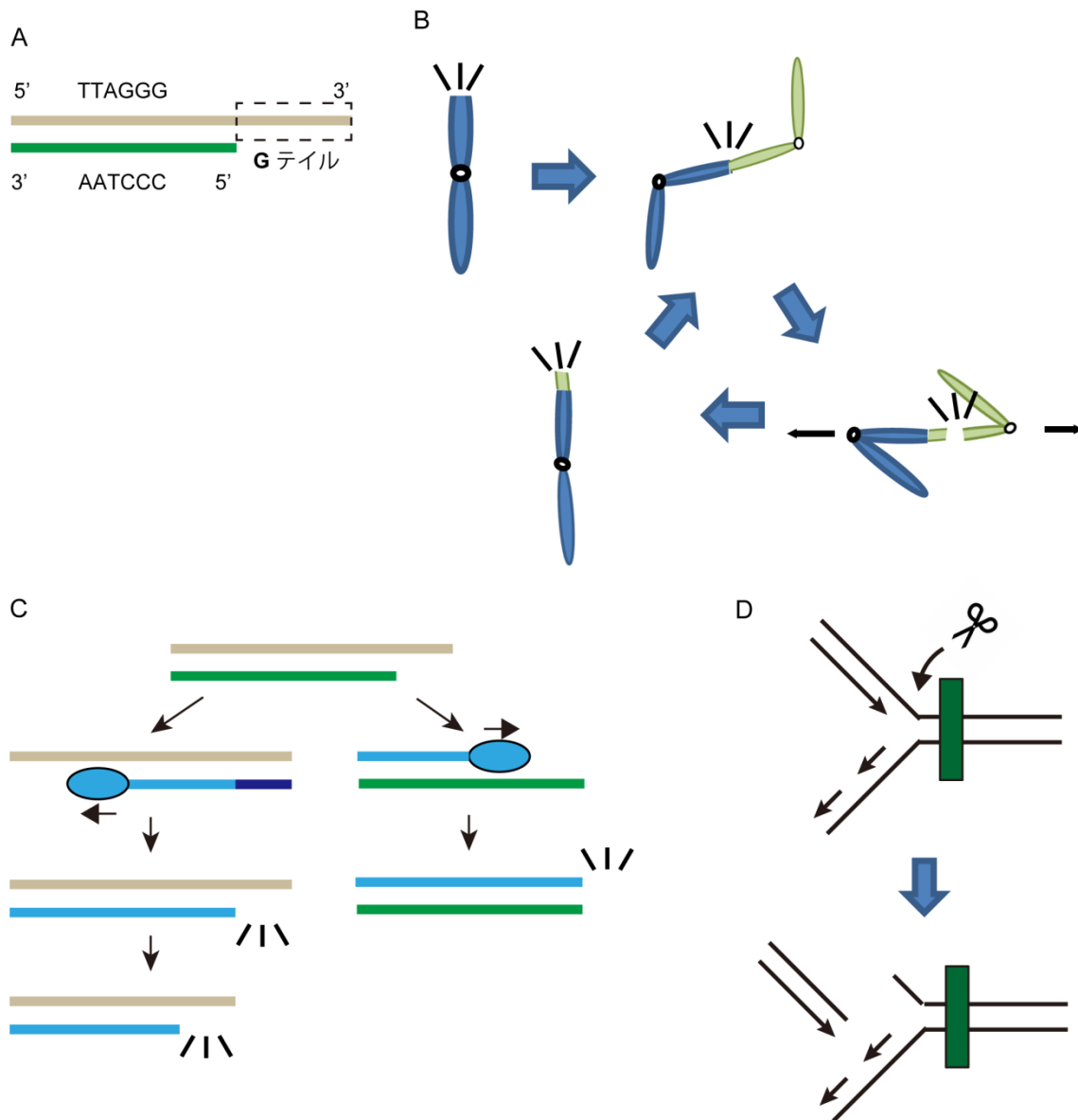


図 1-4

(A)テロメアDNAの構造を模式図で表す。G鎖を灰色の線、C鎖を緑色の線で表す。ヒト細胞ではG鎖はTTAGGG配列の繰り返し、C鎖はCCCTAA配列から構成される。(B)McClintockによって提唱されたBFBサイクルを、模式図で表す。DSBにより生じたDSEや、保護機能が失われたテロメアは、他のDSEと融合しうる(上)。融合染色体がセントロメアを2つ持っていた場合、細胞分裂時に逆向きに引力を受けて、切断される可能性がある(右下)。結果としてできた染色体は、一部を欠失するか、他の染色体の一部を獲得する(左下)。また、この染色体はDSEを持っているため、再び他の染色体と融合する(上)。(C)末端複製問題を模式図で表す。テロメアDNAのG鎖(灰)を鋳型として複製する場合、DNAポリマーゼ(水色の丸)はRNAプライマー(紫)を起点としてDNA合成を開始するため、5'末端に空白部分が生じる(左)。テロメアDNAのC鎖(緑)を鋳型として複製する場合、新しいG鎖はC鎖と同じ長さまでしか合成されず、Gテイルの部分は合成さ

れない。どちらのケースでも、DNA複製の度にテロメアDNAが短小化していくこととなる。(D)複製フォーク停止はDSEの原因となりうる。DNA複製において、複製フォークは進行方向(図では左から右)に障害物(赤色の四角形)があると進行を停止する。通常、障害物を処理してから複製が再開されるが、複製フォークに含まれる一本鎖DNAが、エンドヌクレアーゼ(鋏)によって切断されることで、DSEが生じることがある。

#### 1-5 シェルタリン複合体

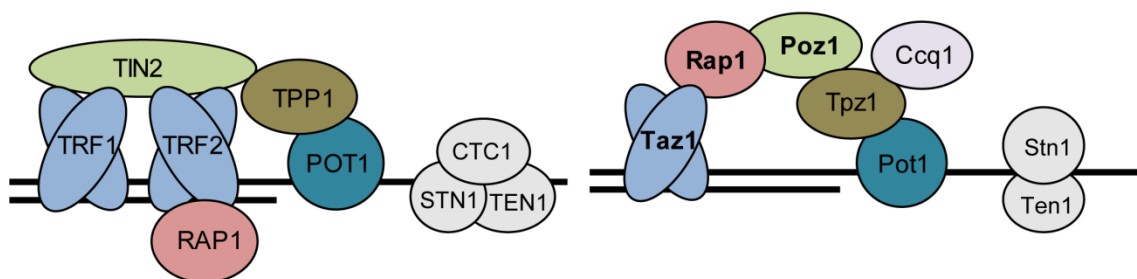
ヒトのテロメアに結合する因子群として、シェルタリン (shelterin) 複合体および CTC1-STN1-TEN1 (CST) 複合体が報告されている。CST複合体はテロメアDNA一本鎖に結合してテロメアの複製を促進することが知られている。分裂酵母でもホモログとして Stn1 と Ten1 が保存されているが、Ctc1 は同定されていない。一方、ヒトのシェルタリン複合体は、POT1、TPP1、TIN2、RAP1、TRF1 および TRF2 から成る 6 者複合体であり、TRF1 および TRF2 が二本鎖テロメアDNAと、POT1 が G テイル一本鎖DNAと結合し、その他の因子が TRF1、TRF2 および POT1 と結合することで、DNAの一本鎖部分と二本鎖部分が橋渡しされる形になっている(Palm and de Lange 2008)(図 1-5)。これに対し、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* のテロメアにも類似した複合体が存在する。分裂酵母のシェルタリン複合体は、Pot1、Tpz1、Ccq1、Poz1、Rap1 および Taz1 から成る 6 者複合体である。Pot1 および Taz1 が、それぞれ G テイルと二本鎖テロメアDNAに直接結合しており、Pot1-Tpz1-Poz1-Rap1-Taz1 という一連の蛋白質間相互作用によって、テロメアDNAの一本鎖部分と二本鎖部分が橋渡しされている(Miyoshi et al. 2008; Linger and Price 2009)。これらの因子は、テロメアの保護やテロメア複製の制御に関与している。このうち、Taz1、Rap1 および Poz1 は、テロメラーゼを負に制御することで、テロメア長の伸長を抑制している(Miyoshi et al. 2008; Chikashige and Hiraoka 2001; Kanoh and Ishikawa 2001; Ferreira and Cooper 2001)。*taz1Δ*株、*rap1Δ*株および *poz1Δ*株においてはテロメアの著しい伸長が観察されるが、その程度は異なる(Miyoshi et al. 2008)。このとき、*taz1Δ poz1Δ*株および *rap1Δ poz1Δ*株において、それぞれ *taz1Δ*株および *rap1Δ*株と同程度のテロメア長が観察されたことから、Poz1 は Taz1-Rap1 経路の下流で機能することが示された(Miyoshi et al. 2008)。また、Taz1 および Rap1 は、G1 期にテロメアにおける NHEJ を抑制することが報告されている(Ferreira and Cooper 2001; Miller et al. 2005)。さらに、*taz1Δ*株ではテロメアの最末端まで DNA 複製が完了していない、不完全な複製産物が蓄積する。このことから、Taz1 にはテロメアDNAにおいて複製フォーク進行の停止を防ぐ機能があることが示された。複製フォークの停止は DSE につながると考えられており、実際、*taz1Δ*株のテロメアには、DSE に結合して HR を引き起こす Rad52 および Rad51 が局在することが報告されている(Carneiro et al. 2010)。このように、細部は異なるものの、ヒトと分裂酵母のシェルタリン複合体は類似した構造を取っている。シェルタリン複合体は、

真核生物で広く保存されていると考えられるが、出芽酵母では発見されていないため、GCRとの関連はよく分かっていない。

A

ヒト

分裂酵母



B

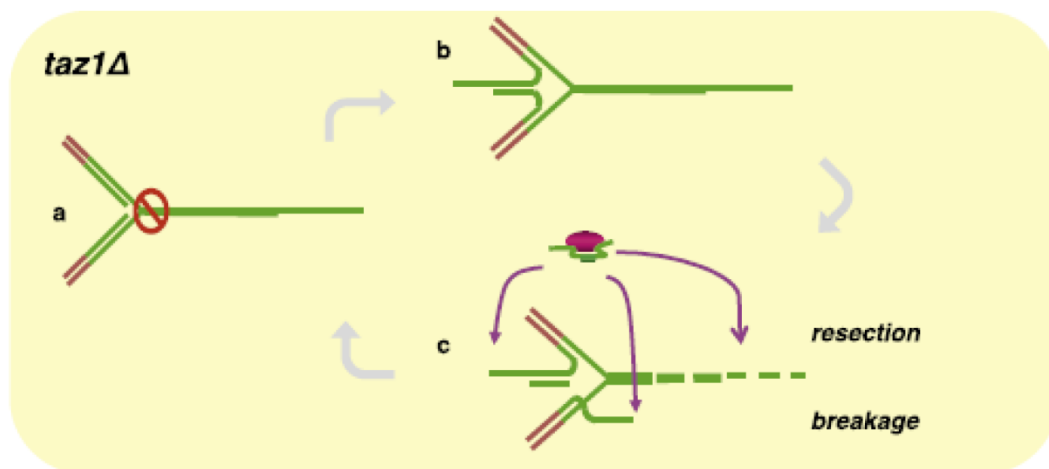


図 1-5

(A)ヒトおよび分裂酵母におけるシェルタリン複合体と CST 複合体の模式図を表す。(B) *taz1Δ*株で起こる異常な DNA 複製のモデル。(a) *taz1Δ*株ではテロメア DNA(緑)の複製が完了せず途中で停止する。(b)停止した複製フォークが逆転して進行し、新生鎖同士がアニーリングした結果、chicken foot と呼ばれる構造が生じる。(c) *taz1Δ*株ではテロメラーゼ活性の上昇も見られるため、chicken foot 形成や複製されていない DNA の切除(resection)、切断(breakage)の結果生じた DSE にテロメラーゼ(上)が作用し、伸長反応を起こす。その結果、複雑な構造の複製産物が発生する。(Dehé et al. 2012)より引用。

#### 1-6 本研究の目的

突然変異は、がんの発生や悪性化において重要な役割を果たしており、がん細胞は遺伝的不安定性によって悪性化を加速させると考えられている。近年、突然変異の中でも、GCR

ががん化に大きく貢献することが明らかになりつつある。しかし、先に述べたように GCR は小規模な配列変化と比較して発生頻度が非常に低く、がん細胞での GCR 頻度の測定は困難である。そこで、本研究では、増殖が速く遺伝子操作の容易なモデル生物であり、テロメアやセントロメアなどの染色体構造がヒトと類似している分裂酵母における GCR 頻度測定系を作製し、GCR の抑制機構および発生機構を解明することにした。これまでの研究から、シェルタリン複合体がテロメアにおいて機能することで、染色体の安定性に寄与していることが明らかになってきた。本研究では、分裂酵母のシェルタリン複合体について、各構成因子およびその機能による GCR の発生頻度への影響を定量的に解析することで、シェルタリン複合体による GCR 抑制機構を明らかにすることを目的とした。

## 第二章

### 材料と方法



## 2-1 試薬・酵素等

以下特に示さない限り、試薬類はナカライテスク社、酵素はタカラバイオ社または New England Biolabs 社、培地は Becton, Dickinson and Company の製品を用いた。本研究で用いたプライマーの配列は章末の表 2-1 に記した。

## 2-2 大腸菌、分裂酵母株とその操作

大腸菌培地の組成および基本的な操作は Sambrook らにならい(Sambrook et al. 1989)、培地には必要に応じて終濃度 100  $\mu\text{g/ml}$  のアンピシリンを加えて用いた。

本研究で使用した分裂酵母株を章末の表 2-2 に示した。分裂酵母の培地の組成、および基本的な操作は Alfa らにならった(Alfa et al. 1993)。YES 培地には、終濃度 200  $\mu\text{g/ml}$  のアデニン、終濃度 200  $\mu\text{g/ml}$  のロイシン、終濃度 200  $\mu\text{g/ml}$  のヒスチジンおよび終濃度 100  $\mu\text{g/ml}$  のウラシルを加えて用いた。

プラスミドへの点変異導入は QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent 社) または DpnI と PCR を用いて行った。本研究で使用したプラスミドは配列を確認してから用いた。

## 2-3 GCR 頻度の測定

GCR 頻度の測定は以前に報告された振盪試験を用いた出芽酵母での方法に一部修正を加えて行った(Putnam and Kolodner 2010)。YES 寒天培地上で 32°C で 1~2 日培養した酵母を新たな YES 寒天培地に移し、32°C で 2~3 日培養した。形成された単一のコロニー (以後、検体と呼ぶ) をメスによって寒天培地ごと切り取り、YES 液体培地に懸濁し、32°C で飽和密度に達するまで培養した。培養液のうち 10  $\mu\text{l}$  を取り、蒸留水を用いて 10 倍段階希釈を行い、 $10^5$  倍に希釈したもの 100  $\mu\text{l}$  を YES 寒天培地に播種した。同時に、培養液のうち 0.5~5 ml を取り 1 mg/ml の 5-フルオロオロチン酸 (5-FOA) および 20  $\mu\text{g/ml}$  の 5-フルオロデオキシウリジン (FUdR) を含む YES 寒天培地 (FF 培地) に播種した。直径 9 cm の培養皿を用い、播種する細胞数は培養皿 1 枚あたり  $10^8$  個を超えないようにした。どちらも 32°C で培養し、YES 培地については播種から 2 日後、FF 培地については 5 日後に形成されたコロニーの数を測定した。前者および後者のコロニー数と、検体の元々の培養液の液量と播種した培養液の液量を用いて、総細胞数  $N$  および 5-FOA 耐性かつ FUdR 耐性の細胞数  $r$  が計算される。ここで、 $m$  を新たに生じた GCR の数 (GCR を持つ細胞が分裂することにより増える数は含まない)、 $z$  を培養液の内 FF 培地に播種した液量の割合とすると、

$$m = (r / z - 0.693) / \ln(r / z + 0.367)$$

が成り立つため、 $m$  が求められる (Jones et al. 1994)。一つの株につき  $m$ 、 $N$  を最低 7 つの独立したコロニーで求め、 $m / N$  の中間値を 1 細胞分裂あたりの GCR 頻度として示した。検体数が偶数のときは、検体数を  $2L$  個としたとき、 $L$  番目に大きい  $m / N$  と、 $(L + 1)$  番目に大きい  $m / N$  の平均値を GCR 発生頻度とした。ただし、GCR 発生頻度が 0 になった株については、 $r = 0$  となったすべての検体について、 $r = 1$  として計算を繰り返し、求められた  $m/N$  の中央値を GCR 発生頻度の上限値とした。95%信頼区間については、

$$L = \text{floor}[(X + 1) / 2 - 0.9789 X], U = (X + 1) - L \quad (X, \text{検体数})$$

から  $U$  と  $L$  を求め、 $U$  番目および  $L$  番目に大きい  $P$  をそれぞれ上限値および下限値とした。GCR 頻度の統計学的有意差は Mann-Whitney test で判定した。

G1 期停止後の GCR 頻度の測定は、出芽酵母における DNA 損傷薬剤処理後の GCR 頻度の測定のプロトコルを応用して以下のように行った (Myung and Kolodner 2003)。細胞を YES 液体培地で対数増殖期まで培養した後、培養液を等分した。片方を塩化アンモニウム (窒素源) を含む EMM 液体培地、他方を塩化アンモニウムを含まない EMM 液体培地で 2 回洗浄した後、同じ培地で 24 時間培養した。培養した細胞は YES 液体培地で 1 回洗浄した後、YES 液体培地で一晚飽和状態まで培養した。一定数の細胞を YES 寒天培地および FF 寒天培地に播種し、発生したコロニー数を計測し、YES 寒天培地でのコロニー数に対する FF 寒天培地でのコロニー数の割合を GCR 頻度として計算した。なお、この G1 停止後に求めた GCR 頻度は 1 細胞分裂あたりのものではなく、他の実験での GCR 頻度とは比較できない。

#### 2-4 GCR の切断点の位置・配列の決定

GCR アッセイにおいて、FF 培地上に形成したコロニーからゲノム DNA を精製した後、以下の手順で GCR の切断点が存在する染色体上の位置の絞り込みを行った (図 2-4A)。生存株の 1 番染色体の *sec16* と *TK* の間の領域全域にわたって、PCR により約 800 bp を増幅するプライマーセットを設計した (PP1~28 の 28 組使用。「PP」の後の数字が小さいものほどセントロメア側に設計されている) (章末の表 2-1)。GCR によって除去された部分では増幅が起こらない。各々のプライマーの組は原則として約 200 bp ずつ重複しているため、PCR における DNA の増幅の有無から判断することで、切断点が存在する領域は約 600 bp に絞り込まれる。

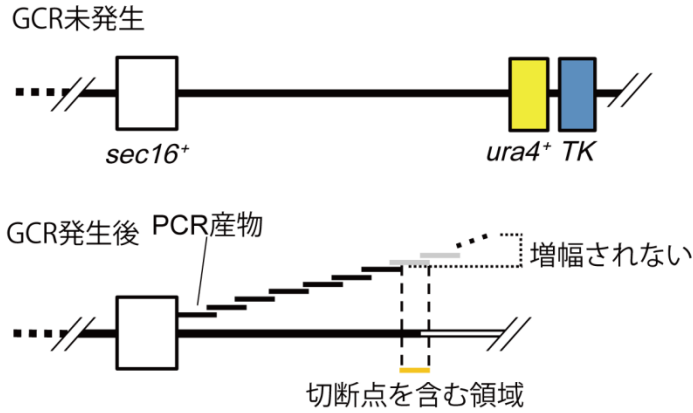
次に、新規テロメア付加が起こったかどうか調べるために、切断点が存在する領域よりもセントロメア側のプライマーと、テロメア配列を含むプライマー (M13R-T1 または M13R-19) を用いて PCR を行った (図 2-4B)。その際は iProof DNA polymerase (Bio-Rad) もしくは KOD FX Neo DNA polymerase (東洋紡) を用いて 98°C で 30 秒、【98°C で 10

秒、68°Cで20秒、72°Cで1分】を30サイクルの条件で行った。もしくはKOD One DNA polymerase（東洋紡）を用いて【98°Cで10秒、68°Cで5秒、72°Cで10秒】を30サイクルの条件で行った。増幅産物について、シーケンシングを行い切断点の配列を決定した。

増幅産物が見られなかったものについては、Ligation-mediated PCRを行なった(図2-4)。5 mlの細胞培養液を回収し、遠心して上清を除いた後、TE [pH 7.4] (10 mM Tris-HCl [pH 7.4]、1 mM EDTA [pH 7.4]) で洗浄し、沈殿に400 µlのSEバッファー(1 M ソルビトール、0.1 M EDTA [pH 7.4]、14 mM β-メルカプトエタノール) および、15 µlの10 mg/ml Zymolyase 100Tを加え、37°Cで30分インキュベートしてスフェロプラスト化を行った。その後、遠心して上清を除き、沈殿に400 µlのDNAバッファー(100 mM Tris-HCl [pH 7.4]、40 mM EDTA [pH 7.4]、0.4% SDS)を加えて65°Cで30分間処理した。この溶液に100 µlの4 M 酢酸カリウム溶液を加え、氷上に1時間置き、15,000 rpmで25分間遠心して上清を回収した。この上清に1.2 mlのエタノールを加えて15,000 rpmで15分間遠心してDNAを回収した。回収したDNAを300 µlのRNase溶液(TE [pH 8.0] + 33 ng/µl RNase)に懸濁し、37°Cで30分間インキュベートしてRNAを分解した後、フェノールクロロホルム処理およびエタノール沈殿によって精製し、TE [pH 8.0]に懸濁した。以後の基本的な操作は、GenomeWalker Universal Kit (Clontech)の説明書に従った。以下に、操作の概要および説明書との相違点を記す。上記の方法で調製した酵母DNA 0.25 µgを80 UのHinP1 I またはMsp I で処理した。2回のフェノールクロロホルム処理とエタノール沈殿を行ってDNAを精製し、10 µlのTE (10 mM Tris [pH 7.4]、0.1 mM EDTA [pH 7.4])に溶解した。このDNA溶液2 µlとリンカーDNA 3.8 µlにTaKaRa Ligation KitのI液11.6 µlとII液5.8 µlを加えて16°Cで一晩インキュベートした後、56.8 µlのTE (10 mM Tris [pH 7.4]、1 mM EDTA [pH 7.4])を加えることで、DNA断片とリンカーが結合したDNAライブラリを作成した。12.5 µMのAdaptor univ.およびHinP1I/MspIプライマー(表2-1)、50 mMのNaClを含む反応液を、サーマルサイクラーGeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems社)を用いて、97°Cまで加熱し、3時間かけて4°Cまで徐々に冷却することでアニーリングさせたものを、リンカーとして用いた。DNAライブラリを鋳型として、表2-1に示されたうち、適当なテロメア向きのプライマー1つとADP1プライマーを用いて、Advantage PCR Kitによる1次PCRを行った(3-7節参照)。続けて、PCR産物を鋳型として、1次PCRで用いたものよりテロメア側に設計されたテロメア向きのプライマーとADP2プライマーを用いて、2次PCRを行った。増幅産物について、シーケンス反応を行い、切断点の配列を決定した。増幅が見られないものについては、「不明」と分類した。

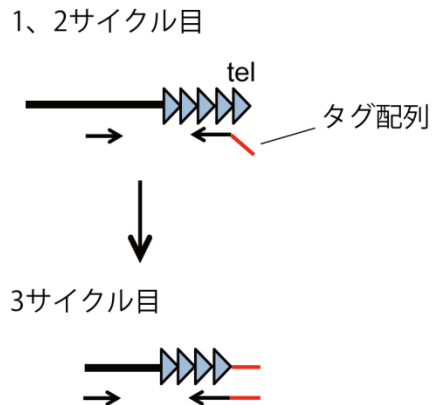
A

Sequential PCR



B

Stretch PCR



C

Ligation-mediated PCR

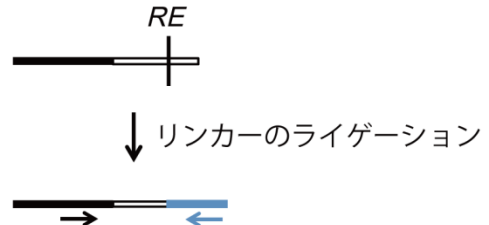


図 2-4

生存株における GCR の構造解析。詳細は本文参照。

### 2-5 部位特異的な二本鎖切断(DSB)の誘導

部位特異的な DSB の誘導は基本的に過去の報告にならって行ったが(Sunder et al. 2012)、以下のような改変を行った。テトラサイクリン誘導性の I-SceI 遺伝子の導入用のプラスミドはプラスミドに含まれる LEU2 遺伝子との相同組換えを利用して細胞の *leu1-32* 遺伝子座位に挿入した。I-SceI 切断部位の導入用のプラスミドには I-SceIcs の前後に *ura4+* 遺伝子

とハイグロマイシン耐性遺伝子を挿入した。このプラスミドは GCR アッセイで *ura4<sup>+</sup>-TK* カセットを挿入したのと同じ位置に挿入した。DSB は無水テトラサイクリン (ahTET、Sigma 社) を終濃度 3  $\mu$ M になるよう添加することで導入した。ahTET は極力遮光して用いた。

## 2-6 クロマチン免疫沈降(ChIP)

ChIP は過去のプロトコルに以下の改変を加えて実施した(Miyoshi et al. 2008)。細胞濃度は ahTET を加える時点で  $1.0 \times 10^7$  細胞/mL になるように調整し、所定の時間に一定の量の培養液を回収し、固定を行った。免疫沈降は抗 myc 抗体 (9B11、Cell Signaling 社) を Dynabeads M-280 Sheep anti-Mouse IgG (Invitrogen 社) に結合させたものを用いて行った。洗浄したビーズから、過去の報告にならって Chelex 100 Resin (Bio-Rad 社) を用いて DNA を精製し(Moser et al. 2014)、qPCR によって解析を行った。

表 2-1 本研究で使したプライマー

PP1F	ggatgtcatgagaaatagttgatggaag
PP1R	taaaatcatcaagtcacgtgaataaac
PP2F	caatgaattggtgagagagactgatg
PP2R	ggcatgggataagaagagaaataggataag
PP3F	ctttcctcgggatgagcgatagcataag
PP3R	gcgcttcctgctcttatccatccaac
PP4F	agacactcgtctccagatacccatgct
PP4R	agttgagattggaagtggccagagttg
PP5F	gacaaccgaaagttcgatttc
PP5R	gagacaaaacgttgacgatgtac
PP6F	catccactttgtccaatccacttacat
PP6R	gaagagtgcgcattgtgtcatcagcc
PP7F	gtctgctgataactcttcgctgctacaac
PP7R	catgcgccattgaagggtggatgtag
PP8F	tacagcgtcggttcctcaacaaatttc
PP8R	tgtgtgggatacagattggatag
PP9F	cagaatgttcctcaacagcttc
PP9R	gaatccactactatgataactattc
PP10F	gctcttaatcgttttgcttttgctttg
PP10R	aatgctccggtccttttcac
PP11F	ccaccaggttatcttacctccagggtatg
PP11R	tttggcttaaccattttcacag
PP12F	cctgggtaattccaccgaggattgtag
PP12R	actggcagcaagtcgtttac
PP13F	gtattgcaaattaccaccaggagaag
PP13R	cacttggagaacttgggtgc
PP14F	tcgaccataaccaatcttccaatttgg
PP14R	aaaagttcagtggaattgcatagac
PP15F	agcgttgctttcaaccgaaattgagg
PP15R	ggcaaattgatagtaaaactaacacaatgc
PP16F	cccatgcaaagtatactatgacaacaagc
PP16R	ctcgtttcaggctagatttcccttatg
PP17F	ttataattcgcaaatgattaaatttag
PP17R	ttcattatccattgatgtgctg
PP18F	aagccattaacgcgtccaatgtataacttg

PP18R	tttcaatcccctgttgcaaacttgaag
PP19F	ttgaattagacggttccatgcttcaac
PP19R	ccagctagaattttaatgatgtgaactcg
PP20F	aaataaggccctgcgttatacatagaagg
PP20R	cagttttacatgtacaagggaagtattcgg
PP21F	ctatctcttactttgcagaatttgggatcg
PP21R	ataagcattaaattgcaatctagac
PP22F	cctgaatcaaagttcccatgatttatagtc
PP22R	atcttctattcccttgaagagccaagc
PP23F	aatatggtgttccagtccatttatggc
PP23R	gaaggaattcccgttaagaaagtcagc
PP24F	cagaagattctttgatatcgatacctcctg
PP24R	catctggaaccggttagacttgcttaagag
PP25F	ctagaagatagtaaattccatgggcacatg
PP25R	gggttctttgtggcccattc
PP26F	agacgggaaaccaaatggcgacattgg
PP26R	tttcgtagtaattactaaactttgccgc
PP27F	ttcagccagtgtagtccccggcttagc
PP27R	catcttgcttatgatatgaagcatgtgatc
PP28F	ctggtgttatatacaaaaaccggttttgctg
PP28R	aaccctctcttcccttctatc
PP29F	aagcttagctacaaatcccac
PP29R	ccaacaattccttggcaatggg
PP30F	ccatcccagtttaactatgcttctgctg
PP30R	tcgctaccgcagtttacaatcacttc
PP31F	acgtggtctcttgccttttgctg
PP31R	aagcttgtgatattgacgaaac
M13R-T1	caggaaacagctatgacctgtaaccgtgtaaccgtaac
M13R-C19	caggaaacagctatgacctgtaaccccctgtaacc
Adaptor univ.	gtaatacgactcactatagggcacgcgtggtcgacggccccggctggt
BfaI	taaccagccc
HinPLI/MspI/TaqI	cgaccagccc
ADP1	gtaatacgactcactatagggc
ADP2	actatagggcacgcgtggt
ADPSEQ	gtcgacggccccggctggt
ade6F	ctgtcgccactgttgctatc

ade6R	tctccatagcagccaaaagg
1.5kbF	ccatcccagtttaactatgcttcgctg
1.5kbR	ccaacaattccttggcaatggg
3kbF	ttcagccagtgtagtgcccggttagc
3kbR	ttcgttagtaattactaaactttgccgc
5kbF	gacataaacggacaacattagc
5kbR	cgatgatggaaagtcaggag
13kbF	ttaatcgttttgccttttgccttg
13kbR	ggatctcgtatacgaagtagcggctcg
telF	ctatttctttattcaacttaccgcacttc
telR	attaattgggtaacggagtaacaatataga
I-sceIcsF	agagaagctggttgggaaggc
I-sceIcsR	cacgtgctgatcagatccga



表 2-2 本研究で使用した酵母株

JK317	<i>h<sup>-</sup> leu1-32 ura4-D18</i>
JK320	<i>h<sup>-</sup> leu1-32</i>
FY2317	<i>h<sup>+</sup> ade6-M210 hENT1-leu1 ura4-D18 his7-366::adh-TK-his7</i>
HI4083	<i>h<sup>-</sup> leu1-32 ura4-D18 Ch.1-5442737::CMV-TK/ura4<sup>+</sup></i>
HI4085	HI4083 <i>rad2::kanMX6</i>
HI4087	HI4083 <i>mre11::kanMX6</i>
HI4123	HI4083 <i>taz1::kanMX6</i>
HI4126	HI4083 <i>rap1::kanMX6</i>
HI4206	HI4083 <i>rap1::kanMX6 taz1::hphMX6</i>
HI4408	HI4083 <i>poz1::kanMX6</i>
HI4423	HI4083 <i>stn1-1::LEU2</i>
HI4421	HI4083 <i>tpz1-I501A,R505E-3Flag::LEU2</i>
HI4339	HI4083 <i>taz1::kanMX6 poz1::hphMX6</i>
HI4804	HI4083 <i>taz1::kanMX6 tpz1-I501A,R505E-3Flag::LEU2</i>
HI4796	HI4083 <i>rap1::kanMX6 poz1::hphMX6</i>
HI4809	HI4083 <i>rap1::kanMX6 tpz1-I501A,R505E-3Flag::natMX6</i>
HI4171	HI4083 <i>lig4::hphMX6</i>
HI4172	HI4083 <i>taz1::kanMX6 lig4::hphMX6</i>
HI4173	HI4083 <i>rap1::kanMX6 lig4::hphMX6</i>
HI4227	HI4083 <i>bqt4::hphMX6</i>
HI4841	HI4083 <i>bqt4::hphMX6 leu1<sup>+</sup>::GFP-bqt4-ΔN</i>
HI4842	HI4083 <i>bqt4::hphMX6 leu1<sup>+</sup>::rap1-GFP-bqt4-ΔN</i>
HI4249	HI4083 <i>bqt3::kanMX6</i>
HI4721	HI4083 <i>rap1<sup>213/378/422/456/513A</sup>::LEU2</i>
HI4332	HI4083 <i>lem2::kanMX6</i>
HI4333	HI4083 <i>man1::kanMX6</i>
HI4576	HI4083 <i>pku70::hphMX6</i>
HI4839	HI4083 <i>taz1::kanMX6 bqt4::hphMX6</i>
HI4126	HI4083 <i>rap1::kanMX6</i>
HI4840	HI4083 <i>rap1::kanMX6 bqt4::hphMX6</i>
HI4843	HI4083 <i>pof8::hphMX6</i>
HI4844	HI4083 <i>taz1::kanMX6 pof8::hphMX6</i>
HI4845	HI4083 <i>rap1::kanMX6 pof8::hphMX6</i>
HI4846	HI4083 <i>rad2::kanMX6 pof8::natMX6</i>
HI4260	HI4083 <i>trt1::kanMX6</i>

HI4831 HI4083 *trtI::kanMX6 pREP1-trt1+*  
 HI4852 HI4083 *trtI::kanMX6 tazI::natMX6*  
 HI4853 HI4083 *trtI::kanMX6 tazI::natMX6 pREP1-trt1+*  
 HI4854 HI4083 *tazI::natMX6 trtI::kanMX6*  
 HI4855 HI4083 *tazI::natMX6 trtI::kanMX6 pREP1-trt1+*  
 HI4856 HI4083 *trtI::kanMX6 tazI::natMX6 pozI::hphMX6*  
 HI4857 HI4083 *trtI::kanMX6 tazI::natMX6 pozI::hphMX6 pREP1-trt1+*  
 HI4858 HI4083 *rapI::natMX6 trtI::kanMX6*  
 HI4859 HI4083 *rapI::natMX6 trtI::kanMX6 pREP1-trt1+*  
 HI4817 HI4083 *rap1-WT::LEU2*  
 HI4818 HI4083 *rap1-Δ2-110::LEU2*  
 HI4820 HI4083 *rap1-Δ2-174::LEU2*  
 HI4821 HI4083 *rap1-Δ2-248::LEU2*  
 HI4822 HI4083 *rap1-Δ2-300::LEU2*  
 HI4823 HI4083 *rap1-Δ2-370::LEU2*  
 HI4824 HI4083 *rap1-Δ2-456::LEU2*  
 HI4825 HI4083 *rap1-Δ2-512::LEU2*  
 HI4849 HI4083 *rap1-Δ457-512::LEU2*  
 HI4826 HI4083 *rap1-Δ2-110, 457-512::LEU2*  
 HI4860 HI4083 *rap1-Δ2-110, 457-512::LEU2 pof8::hphMX6*  
 HI4860 HI4083 *rap1-Δ2-110, 457-512::LEU2 pof8::hphMX6*  
 HI4706 *h<sup>-</sup> ura4-D18 leu1-32::adh-TetR/CaMV35Sp-I-SceI/LEU2*  
*Ch.1-5442737::I-SceIcs/hphMX6/ura4<sup>+</sup>*  
 HI4719 HI4706 *tazI::kanMX6*  
 HI4850 HI4706 *rapI::kanMX6*  
 HI4861 HI4706 *pozI::kanMX6*  
 HI4862 HI4706 *tazI::kanMX6 pof8::natMX6*  
 HI4851 HI4706 *rap1-Δ2-110::natMX6*  
 HI4863 HI4706 *trtI::kanMX6*  
 HI4864 HI4706 *ccqI::kanMX6*  
 HI4866 HI4083 *pfh1-WT::LEU2*  
 HI4867 HI4083 *pfh1-mt\*::LEU2*  
 HI4577 HI4083 *clr4::hphMX6*  
 HI4561 HI4083 *swi6::hphMX6*  
 HI4578 HI4083 *tazI::kanMX6 clr4::hphMX6*  
 HI4579 HI4083 *tazI::kanMX6 swi6::hphMX6*

HI4868	HI4083 <i>rap1::kanMX6 clr4::hphMX6</i>
HI4869	HI4083 <i>rap1::kanMX6 swi6::hphMX6</i>
HI4870	HI4083 <i>poz1-W209A</i>
HI4871	HI4706 <i>taz1-13myc::kanMX6</i>
HI4872	HI4706 <i>rap1-13myc::kanMX6</i>
HI4873	HI4706 <i>rad11-13myc::kanMX6</i>
HI4874	HI4706 <i>taz1::natMX6 rad11-13myc::kanMX6</i>
HI4875	HI4083 <i>cds1::hphMX6</i>
HI4876	HI4083 <i>taz1::kanMX6 cds1::hphMX6</i>
HI4877	HI4083 <i>rap1::kanMX6 cds1::hphMX6</i>

## 第三章

### 結果

### 3-1 GCR 頻度測定系の構築

出芽酵母における先行研究を参考にして(Chen and Kolodner 1999)、GCR 頻度を測定できる分裂酵母株を作製した。分裂酵母細胞の一番染色体に *ura4<sup>+</sup>* 遺伝子と *TK* 遺伝子を含む DNA カセットを挿入した (図 3-1A)。*ura4<sup>+</sup>* 遺伝子を発現する細胞と *TK* 遺伝子を発現する細胞はそれぞれ 5-フルオロオロチン酸 (5-FOA) と 5-フルオロ-2'-デオキシウリジン (FUdR) に対して感受性を示すことが知られている。実際、この DNA カセットを一番染色体右腕のテロメアから約 150 kb の地点に挿入した細胞は、両薬剤に対して感受性を示した (図 3-1B)。この酵母株が両薬剤への耐性を獲得する機構として、*ura4<sup>+</sup>* と *TK* 双方にまたがる欠失が発生することと、機能喪失型の点変異が両遺伝子に独立して発生することの二つが考えられる。しかし、後者の点変異については、先行研究において全長約 1.8 kb の *ura4<sup>+</sup>* 遺伝子の機能喪失型の点変異は 1 細胞分裂あたり  $10^{-7}$  のオーダーでしか起こらないと概算されている(Fraser et al. 2003)。そのため、全長約 1 kb の *TK* 遺伝子の機能喪失型の点変異発生率を同じと見積もると、双方に機能喪失型の点変異が起こる可能性は 1 細胞分裂あたり  $10^{-14}$  と概算され、非常に頻度の低いイベントだと考えられる。そのため、出芽酵母における GCR アッセイと同様、私のアッセイで生じる生存株の大部分は、両方のマーカー遺伝子の欠失を伴う GCR によって引き起こされると考えられる。

このとき、両マーカー遺伝子よりもテロメア側には生存に必須な遺伝子は存在せず、セントロメア側にある必須遺伝子のうち最も近い *sec16<sup>+</sup>* を GCR によって失うと細胞は死んでしまうと考えられる。そのため、生存につながる GCR は、両マーカー遺伝子と、*sec16<sup>+</sup>* 遺伝子の間の 16.8 kb の領域で生じたものに限定されると考えられる。以後、本論文ではこの 16.8 kb の領域を”breakpoint region”と呼ぶ。この領域は他の染色体領域と明らかな相同性を持っていないため、配列相同性への依存性が低い GCR が検出されると予想される。

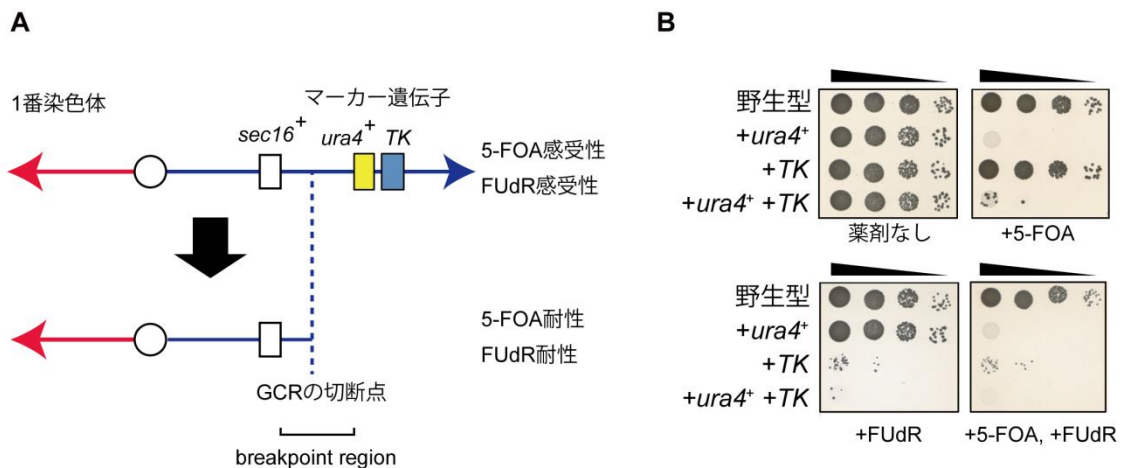


図 3-1

(A) GCR アッセイに用いる *ura4*-TK 株の模式図。5-FOA、FUdR への感受性をもたらす *ura4*<sup>+</sup>、TK 遺伝子を 1 番染色体の右腕に挿入した。*sec16*<sup>+</sup> は 1 番染色体の右腕で最も末端に近い必須遺伝子。赤色、青色の矢印はそれぞれ 1 番染色体の左腕、右腕を示しており、矢頭がテロメアに相当する。丸はセントロメアを示している。(B) *ura4*<sup>+</sup>、TK 遺伝子を持つ細胞の 5-FOA、FUdR への感受性。この実験での野生株は *ura4*<sup>+</sup>、TK 遺伝子を持っていない。細胞は左から右に向かって 10 倍ずつ希釈して記載の薬剤を含む YES 平板培地にスポットした。

### 3-2 GCR 頻度の測定と出芽酵母 GCR アッセイとの比較

GCR アッセイでは、5-FOA と FUdR を含む培地および含まない培地上でのコロニーの数をカウントし、その数から Luria と Delbrück が考案した fluctuation test によって GCR 頻度を概算した (2-3 参照) (Luria and Delbrück 1943)。野生株の場合、GCR 頻度は一細胞分裂あたり  $2.6 \times 10^{-9}$  であると概算された (図 3-2A)。実際、この頻度は点変異が二つのマーカー遺伝子に同時に起こると予想される確率 ( $10^{-14}$ ) よりはるかに高く、このシステムによって主に GCR が検出できていることが確かめられた。次に、5-FOA+FUdR 耐性のクローンを単離し、ゲノム DNA の配列を解読した (2-4 参照)。その結果から、GCR を欠失と転座という 2 種類に分類した (図 3-2B)。野生株では 15 クローンの内 12 クローンで欠失が観察された。欠失では、DSB によって薬剤選択カセットを含む染色体末端部が失われ、その後にテロメア反復配列が続いていた。新規テロメア付加によって DSB が修復されて、安定に保持されるようになったものだと考えられる (図 3-2C)。他の 2 クローンでは切断点は、マーカーカセットが挿入された 1 番染色体右腕とは反対側の 1 番染色体の左腕の配列に、図 3-2D に記すように同じテロメアに向かう方向で繋がっていた (図 3-2C)。こうした GCR は break-induced replication や DNA 組換えによって起こる可能性がある。実際、これらの生存株では融合点に 7、8 bp の相同配列が存在していた。GCR の切断点は breakpoint region に *sec16*<sup>+</sup> の近傍を除く領域に概ね一様に分布しており、ホットスポットとなる領域は存在しなかった (図 3-2E)。*sec16*<sup>+</sup> の近傍領域に切断点が存在しなかった原因として、テロメア近傍の遺伝子転写の抑制 (サイレンシング) の影響が考えられる。*sec16*<sup>+</sup> の近傍で欠失が発生し、新規にテロメアが形成された細胞は、必須遺伝子である *sec16*<sup>+</sup> の発現が抑制され、生存率が減少するために淘汰された可能性がある。15 株の生存株の内の 1 株では、マーカーカセットの欠失は確認されたが、breakpoint region の配列変化は解読できなかった。予想通り *ura4*<sup>+</sup> と TK の両方に点変異が起きたような生存株は得られなかったため、このアッセイによって特異的に GCR 頻度を測定できることが確かめられた。

ここで、今回測定した分裂酵母の GCR 頻度と過去に測定された出芽酵母の GCR 頻度の比較を行った (Myung et al. 2001)。分裂酵母野生株では GCR は 16.8 kb の breakpoint region 上で 1 細胞分裂あたり  $2.6 \times 10^{-9}$  の頻度で発生したのに対し、出芽酵母野生株では 19.2 kb の breakpoint region 上で 1 細胞分裂あたり  $2.27 \times 10^{-9}$  の頻度で発生した。

GCR がゲノム上で一様の頻度で起こるとすると、GCR 頻度は **breakpoint region** の長さと同比例する。この仮定に基づいて GCR 頻度を標準化すると、分裂酵母では 1 kb あたり約  $1.5 \times 10^{-9}$ 、出芽酵母では約  $1.2 \times 10^{-9}$  であった。このことから、分裂酵母は野生型において同じ長さの **breakpoint region** に換算すると同程度の頻度で GCR が発生することが明らかになった。また GCR の種類については、どちらの生物種も野生型では末端欠失が大部分で (分裂酵母 : 12/15、出芽酵母 : 5/6)、転座は比較的まれである (分裂酵母 : 2/15、出芽酵母 : 1/6) (Myung et al. 2001)。次に、出芽酵母の GCR アッセイで GCR の抑制に関わるものが明らかとなった機構が、分裂酵母でも同様に機能するかどうか調べた。5'末端のフラップ構造を基質とする FEN-1 エンドヌクレアーゼや DNA 修復に重要な多機能なヌクレアーゼである Mre11 を欠損した出芽酵母株は、それぞれ野生株の 914 倍、628 倍の GCR 頻度を示すことが報告されている (Chen and Kolodner 1999)。そこで、分裂酵母株でそれらのホモログを欠いた *rad2Δ* 株と *mre11Δ* 株の GCR 頻度を測定したところ、野生株の約 100 倍の増加が見られた (図 3-2A)。Pif1 は 5' → 3' 方向に DNA の二次構造を解消する DNA ヘリケースである。出芽酵母では Pif1 はテロメレースの鋳型 RNA とテロメア一本鎖 DNA のアニーリングを阻害することで、通常の特ロメアや DSB でテロメレースによるテロメアの伸長を抑制する (Boulé et al. 2005)。そこで、分裂酵母での *PIF1* ホモログ *pfh1* の変異による GCR への影響を調べた。*pfh1-mt\** は生存に必須なミトコンドリアでの機能を維持している一方で、核内での機能を欠く変異体である (Pinter et al. 2008)。*pfh1-mt\** 株は野生株の 32 倍の GCR 頻度を示した (図 3-2F)。これは出芽酵母の対応する変異株である *pif1-m2* 株と同様の結果であった (Myung et al. 2001)。分裂酵母と出芽酵母は 10 億年以上前に分岐したと考えられている。進化的に離れた 2 種の酵母が多くの類似の結果を示したことから、GCR 制御機構は進化的に保存されており、分裂酵母で GCR の機構を研究することは有意義であると考えられる。





### 3-3 Taz1、Rap1 は GCR を抑制する

野生株で検出された GCR の大部分が新規テロメア付加だったことから、私はテロメア因子が GCR の制御に関連しているのではないかと考えた。分裂酵母では Taz1 がテロメア二本鎖 DNA と Rap1 に直接結合することで、Rap1 をテロメアにリクルートしている (図 3-3A)。*taz1*Δ株と *rap1*Δ株で GCR 頻度の測定を行ったところ、野生型のそれぞれ 42 倍、33 倍という有意に高い頻度を示した (図 3-3B)。*taz1*Δ *rap1*Δ二重変異株では、単独変異株と同等の高い GCR 頻度を示した。また、*rap1-I655R* 変異株では Taz1-Rap1 の相互作用が弱まることで Rap1 のテロメアへのリクルートが消失することが知られているが(Chen et al. 2011)、この変異株も *taz1*Δ株や *rap1*Δ株と同様に高い GCR 頻度を示した。これらの結果から、Taz1 と Rap1 は同経路で GCR の抑制に機能しており、Taz1 が主に Rap1 との物理的相互作用によって GCR を抑制することが示唆された。次に、*taz1*Δ株や *rap1*Δ株についても GCR アッセイで単離した生存株から発生した GCR の種類を調べた。どちらの欠損株も、調べたすべての生存株で欠失が検出されたが、その割合は野生型と比較したとき統計学的有意差は見られなかった (図 3-3C、D)。

次に、野生株、*taz1*Δ株、*rap1*Δ株を 20°C で培養した際の GCR 頻度を測定した。*taz1*Δ株は、野生株や *rap1*Δ株とは異なり、20°C で培養するとおそらく染色体の絡まりによって細胞周期の進行が遅くなり、生存率が低下することが知られている (Miller and Cooper 2003)。*taz1*Δ株の 20°C での培養時の GCR 頻度は 32°C での培養時に比べて 10 倍以上増加した (図 3-3E)。このような GCR 頻度の 20°C での増加は野生株や *rap1*Δ株では見られなかった。今回調べた 3 株で GCR 頻度の上昇と低温感受性に相関が見られたことから、20°C では *taz1*Δ株は染色体のもつれが GCR 頻度の上昇の一因になっている可能性がある。

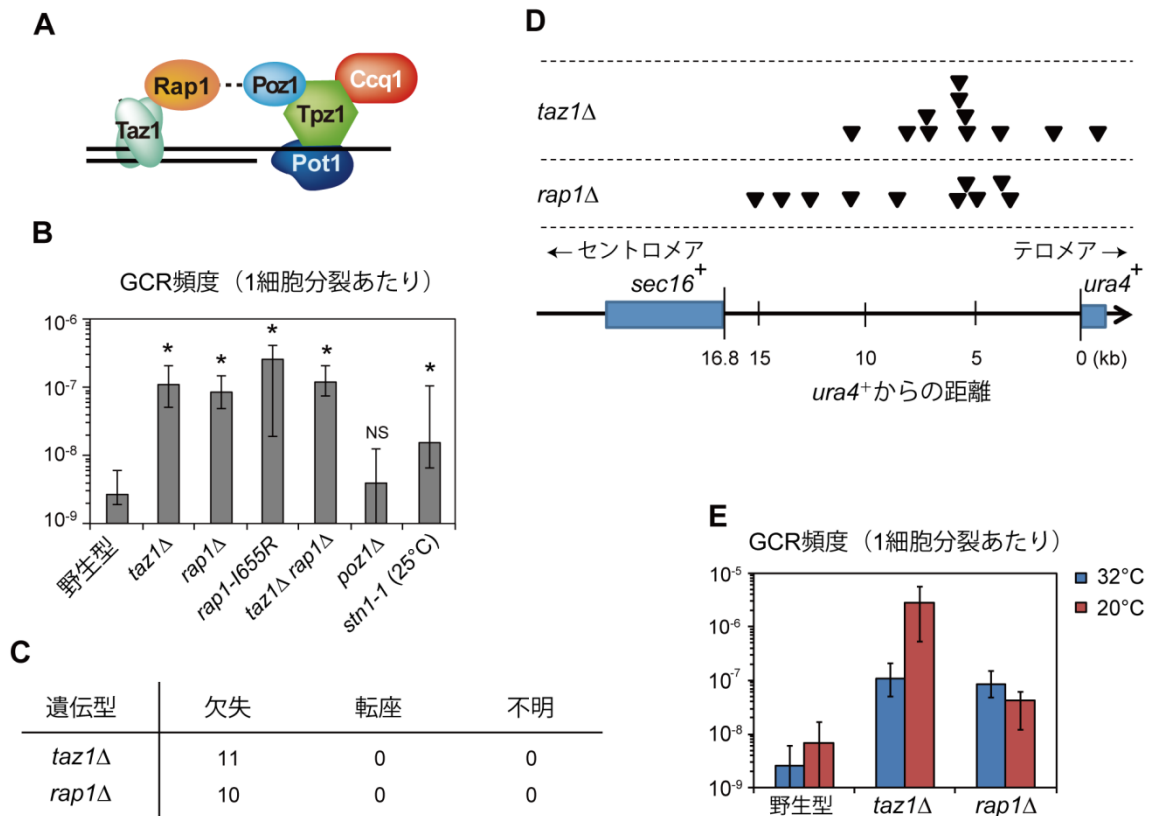


図 3-3

(A) 分裂酵母シェルタリン複合体およびの模式図。(B) テロメア結合因子の変異体の GCR 頻度。(C) *taz1Δ*株、*rap1Δ*株で発生した GCR の種類の内訳。(D) (C) に示した GCR (すべて欠失) の切断点の分布。(E) 32°C または 20°C で培養した野生株、*taz1Δ*株、*rap1Δ*株の GCR 頻度。

これ以降の図で、アスタリスク (\*) および NS はそれぞれ統計学的に有意差があること ( $P < 0.05$ ) および有意差がないこと ( $P > 0.05$ ) を示す。特に示さない限りアスタリスク、NS は野生型との比較結果である。また、特に断らない限り P 値は two-tailed Mann-Whitney 検定により求めた。

### 3-4 Poz1、Stn1 の GCR 頻度への影響

次に、Rap1 に結合するシェルタリン構成因子 Poz1 (図 3-3A 参照) の GCR 頻度への影響を調べた。*poz1<sup>+</sup>*を欠損すると、テロメアの過剰な伸長、テロメア遺伝子のサイレンシングの阻害など、*taz1Δ*株や *rap1Δ*株と類似の表現型が見られる。しかしながら、*poz1Δ*株では *taz1Δ*株や *rap1Δ*株と異なり GCR 頻度の上昇は見られなかった (図 3-3B)。興味深いことに、*taz1Δ*株や *rap1Δ*株において *poz1<sup>+</sup>*を欠損すると、上昇していた GCR 頻度の減少が見られた (図 3-4)。このことから、Poz1 は *taz1Δ*株や *rap1Δ*株において GCR の脱抑制を行っていると言える。さらに、Poz1 と結合するシェルタリン因子である Tpz1 について、

その結合を弱める *tpz1-I501A/R505E* 変異を *taz1Δ*株や *rap1Δ*株に導入すると(Jun et al. 2013)、同様に GCR 頻度の減少が見られた。そのため、Poz1 が Tpz1 によってリクルートされることが GCR の促進につながると考えられる。なお、*poz1+* 欠損の場合も *tpz1-I501A/R505E* 変異の場合も、*taz1Δ*株と比較して *rap1Δ*株の方が GCR 頻度の減少が大きくなった。この違いをもたらす要因として、Taz1 と Rap1 が一部異なる経路で GCR を抑制している可能性が考えられる。例えば、試験管内では Rap1 が Poz1、Tpz1 と段階を踏んで三量体を形成する(Kim et al. 2017)。はじめに Poz1-Tpz1 が二量体を形成することで Poz1 が構造変化を引き起こす。そのことで Poz1 の Rap1 結合ドメインが Rap1 との親和性を増加させることで、最終的に Rap1-Poz1-Tpz1 の三量体を形成すると言われている。そのため、通常は中間体の形のみで存在する Poz1-Tpz1 二量体が、*rap1Δ*株では安定して存在するという可能性が考えられる。*rap1Δ*株では野生株や *taz1Δ*株には存在しない Poz1-Tpz1 二量体が GCR を促進しており、そのことが *poz1+* を欠損した際の表現型の違いに繋がっているのかもしれない。いずれにせよ、これまでの結果から、Taz1、Rap1、Poz1 はテロメア長の制御や低温感受性と同様に(Moser et al. 2011; Miller et al. 2005)、GCR の抑制についても複雑な遺伝的相互作用を持つことが示唆された。

次に、シェルタリン因子に加えて、テロメア一本鎖 DNA に結合する Stn1 について調べた。Stn1 は生存に必須であるので、私が所属する研究室にて単離された温度感受性変異株 *stn1-1* 株を用いた(Takikawa et al. 2016)。*stn1-1* 株は準許容温度である 25°C においてわずかにテロメア長の増大が見られる。25°C で培養した際に GCR 頻度を測定すると、*stn1-1* 株は野生株の 6 倍程度の上昇が見られた (図 3-3B)。そのため、Stn1 も GCR の抑制に中程度に関与していると考えられる。

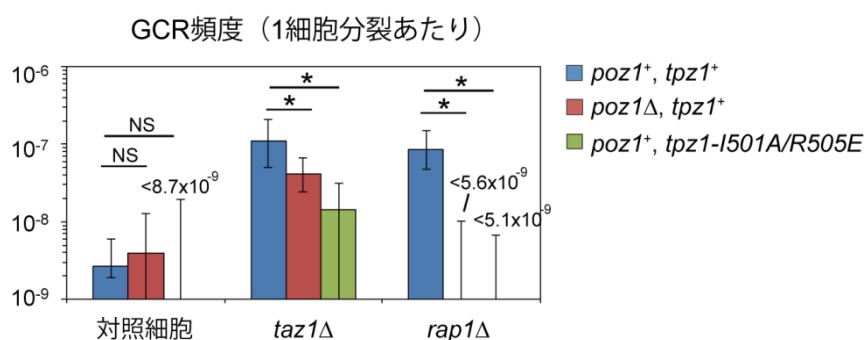


図 3-4

*poz1+* の欠損、*tpz1-I501A/R505E* の GCR 頻度への影響。

### 3-5 NHEJ は *taz1Δ*株、*rap1Δ*株での GCR 頻度の増加に必須ではない

Taz1 と Rap1 はさまざまな機能を持った因子であるので、そのうちどの機能が GCR の抑制と関連するのか調べることにした。*taz1Δ*株、*rap1Δ*株では見られるが *poz1Δ*株では見られない表現型として、G1 期に細胞を停止させるとテロメア同士が NHEJ により融合す

ることが知られている(Ferreira and Cooper 2001; Fujita et al. 2012b)。そのため、*taz1Δ*株、*rap1Δ*株では G1 停止状態ではなくてもある程度 NHEJ によるテロメア融合が起こっており、そのことで二動原体染色体が形成されることで DSB が起こり、GCR が引き起こされることが考えられる。そこで、*taz1Δ*株、*rap1Δ*株で NHEJ が GCR 頻度の上昇に必要なものであるか調べるために、NHEJ に必須な因子である DNA ライゲース IV をコードする *lig4* 遺伝子の欠損株を作製した。*taz1Δ*株、*rap1Δ*株で *lig4* 遺伝子を欠損すると G1 停止時のテロメア融合が抑制されることが知られている(Ferreira and Cooper 2001; Miller et al. 2005)。一方、これらの *taz1Δ lig4Δ*、*rap1Δ lig4Δ* 二重変異株では *taz1Δ*株、*rap1Δ*株で増加した GCR 頻度の減少が見られなかったことから、この GCR 頻度の増加に NHEJ は必須でないことが示唆された (図 3-5A)。

これまでの実験では分裂酵母は栄養増殖条件で培養を行った。栄養増殖条件では、分裂酵母の G1 期は非常に短い、NHEJ は分裂酵母では G1 期のみでしか活性を持たない。そのため、*taz1Δ*株、*rap1Δ*株で GCR の増加に NHEJ が必要なかった原因として、G1 期にある細胞の割合が少なかったことが考えられる。そこで私は、細胞の G1 期停止を促すような窒素源飢餓条件下で、GCR 頻度を測定することにした。まず、YES 培地で栄養増殖を行っている細胞を分割して、窒素源として硫酸アンモニウムを含む EMM 培地で培養を行うグループ (N-) と、窒素源を含まない EMM 培地で培養を行うグループ (N+) に分けた。どちらも 24 時間培養を行った後に、YES 培地で一晚培養を行い、その後 5-FOA と FUdR を含む培地および含まない培地に細胞を播種して GCR 頻度を測定した。その結果、*taz1Δ*株(N-)は統計学的有意差はないものの、*taz1Δ*株(N+)の 2 倍の GCR 頻度を示した(図 3-5B)。この GCR 頻度の上昇傾向は *lig4* の欠損によって弱まった。このことから、テロメア同士の NHEJ は GCR を引き起こしうるものの、栄養増殖条件の *taz1Δ*株では G1 期が短いために GCR 頻度の上昇に貢献しないものと考えられる。

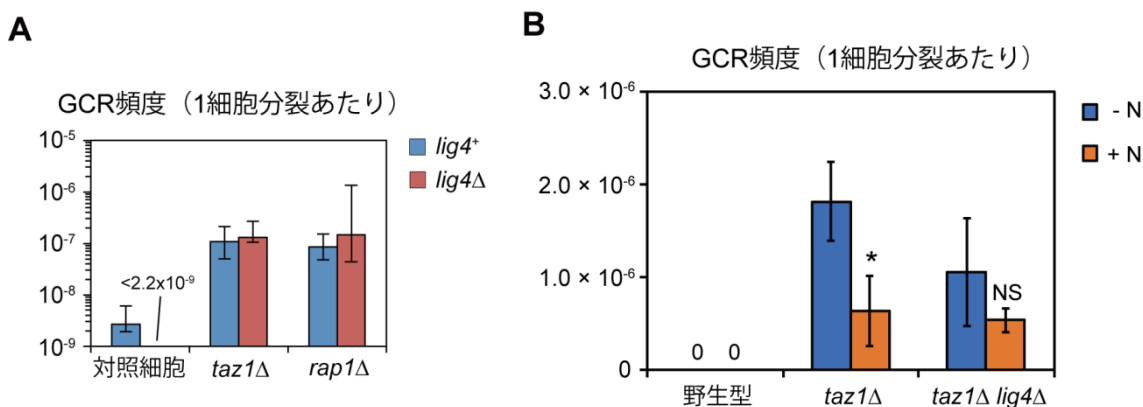


図 3-5

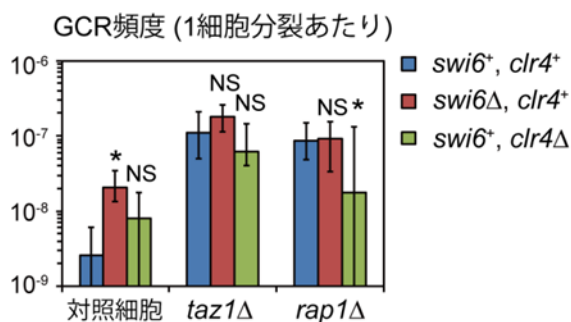
(A) NHEJ に必須な因子である Lig4 の GCR 頻度への影響。(B) G1 期誘導時の NHEJ の GCR 頻度への影響。窒素源を含まない培地で細胞を培養することで G1 期を誘導した(2-3 参照)。この実験では GCR 頻度を他の実験とは異なる方法で求めており、ここで示した GCR 頻度は 1 細胞分裂

あたりのものではない。野生株では FF プレートで一つもコロニーが発生しなかった。アスタリスク、NS は-N との比較結果である。

### 3-6 テロメアヘテロクロマチンの消失は GCR 頻度を上昇させない

Taz1、Rap1 はテロメアやその周辺領域のサブテロメアでのヘテロクロマチンの形成に必須の因子である (Kanoh et al. 2005)。近年、ヘテロクロマチンはセントロメア領域の反復配列の組換えにより生じる GCR を抑制することが示された (Okita et al. 2019)。そのため、本研究での実験系においても GCR の抑制にヘテロクロマチンが影響するかどうか調べるために、ヘテロクロマチン形成の必須因子である *clr4*<sup>+</sup> 遺伝子および *swi6*<sup>+</sup> 遺伝子の欠損株を作製した。メチル基転移酵素である Clr4 がヒストン H3 の 9 番目のリジンをメチル化し、そこに Swi6 がリクルートされることでヘテロクロマチンが形成される。*clr4*<sup>+</sup> 遺伝子の欠損では GCR 頻度への影響が見られなかったが、*swi6*<sup>+</sup> 遺伝子を欠損させると、GCR 頻度の有意であるが弱い上昇が見られた (図 3-6A)。その一方、*rap1* $\Delta$  株で *clr4*<sup>+</sup> 遺伝子を欠損させると GCR 頻度の有意な減少が見られた。以上のことから、Clr4、Swi6 が GCR 頻度の制御を行う可能性がある。ただし、野生株では *clr4*<sup>+</sup> の欠損では影響は見られず、*rap1* $\Delta$  株では *swi6*<sup>+</sup> の欠損では影響は見られなかったため Clr4、Swi6 は互いに独立してヘテロクロマチン非依存的に GCR の制御を行うと考えられるが、その機構は不明である。次に、テロメアでのヘテロクロマチンの GCR への影響をより特異的に調べるために、*poz1-W209A* 変異を導入した。Poz1 は Taz1、Rap1 と同様にテロメアのヘテロクロマチンに必須であり、*poz1-W209A* 変異は Poz1 のヘテロクロマチン制御機能を特異的に弱めることが報告されている (Tadeo et al. 2013)。しかし、*poz1-W209A* 株や *poz1* $\Delta$  株では GCR 頻度の上昇が見られなかった (図 3-3B、3-6B)。このことから、テロメアヘテロクロマチンの消失は GCR 頻度の上昇を引き起こさないため、*taz1* $\Delta$  株や *rap1* $\Delta$  株での GCR 頻度の上昇はテロメアヘテロクロマチンの消失によらないと考えられる。

**A**



**B**

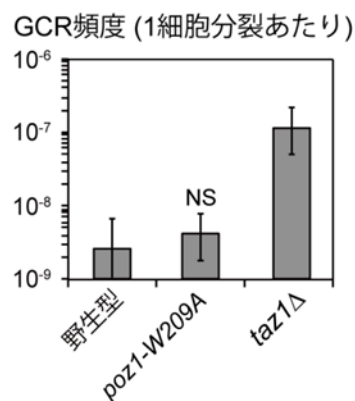


図 3-6

(A)ヘテロクロマチンに必須な因子である Swi6、Clr4、(B)テロメアでのヘテロクロマチン形成能が弱まる Poz1 変異の GCR 頻度への影響。

### 3-7 核膜内膜蛋白質は Taz1、Rap1 とは別経路で GCR を抑制する

栄養増殖期の分裂酵母では、Taz1、Rap1 は Rap1 と核膜内膜蛋白質 Bqt4 の結合を介してテロメアを核膜内膜に係留する(Chikashige et al. 2009; Fujita et al. 2012a)。そのため、テロメアの核膜内膜への係留が核内の染色体配置に影響することで GCR の抑制へとつながる可能性が考えられる。そこで、*bqt4<sup>#</sup>*遺伝子の欠失を行ったところ、GCR 頻度の中程度の増加が見られた(図 3-7A)。また、Bqt4 の安定化を行う Bqt3 を欠失させたところ(Chikashige et al. 2009)、同様に GCR 頻度の増加が確認された。Ku70/80 複合体、および核膜内膜蛋白質である Lem2 と Man1 についても、テロメアの核膜への係留を促進することが報告されていたため、欠損株を作製した(Gonzalez et al. 2012; Tanaka et al. 2012)。その結果、*pku70Δ*株と *lem2Δ*株では GCR 頻度が中程度に増加していた(図 3-7A)。*man1Δ*株では GCR 頻度の変化は見られなかったが、これは Man1 がテロメアの核膜への係留に関して部分的な役割しか持っていないことを反映しているかもしれない。これらの結果から、テロメアの核膜への係留が GCR の抑制を促進する可能性が考えられた。

Bqt4 は C 末端の膜貫通領域を介して核膜内膜に局在する一方、N 末端側の領域が Rap1 との結合に必要となる(図 3-7B)(Chikashige et al. 2009)。*bqt4Δ*株ではテロメアは核膜から解離するが、N 末端側の領域を欠いた Bqt4 と Rap1 の融合蛋白質 Rap1-GFP-Bqt4ΔN を発現させると、核膜への係留が再現される(Chikashige et al. 2009)。そこで同様の細胞株で GCR アッセイを行ったが、*bqt4Δ*株に *bqt4* プロモーターから Rap1-GFP-Bqt4ΔN を発現させても、テロメアの核膜への係留を引き起こさない GFP-Bqt4ΔN を発現させた場合と比べてわずかな GCR 頻度の減少しか起こらなかった(図 3-7A)。加えて、Rap1-Bqt4 の結合を弱める *rap1-5E*変異(S213E、T378E、S422E、S456E、S513E から成る)を野生株に導入したところ(Fujita et al. 2012a)、GCR 頻度の上昇は見られなかった。さらに、*taz1Δ*株や *rap1Δ*株において *bqt4<sup>#</sup>*を欠失させたところ、有意な GCR 頻度の増加が見られた(図 3-7C)。これらの結果から、Rap1-Bqt4 の結合は GCR の制御には重要ではなく、Bqt4 が Taz1、Rap1 に依存しない経路を介して GCR を抑制することが示された(図 3-7D)。このことは、別の視点から見ると、Taz1、Rap1 が Bqt4 非依存的に GCR を抑制するということを表している。

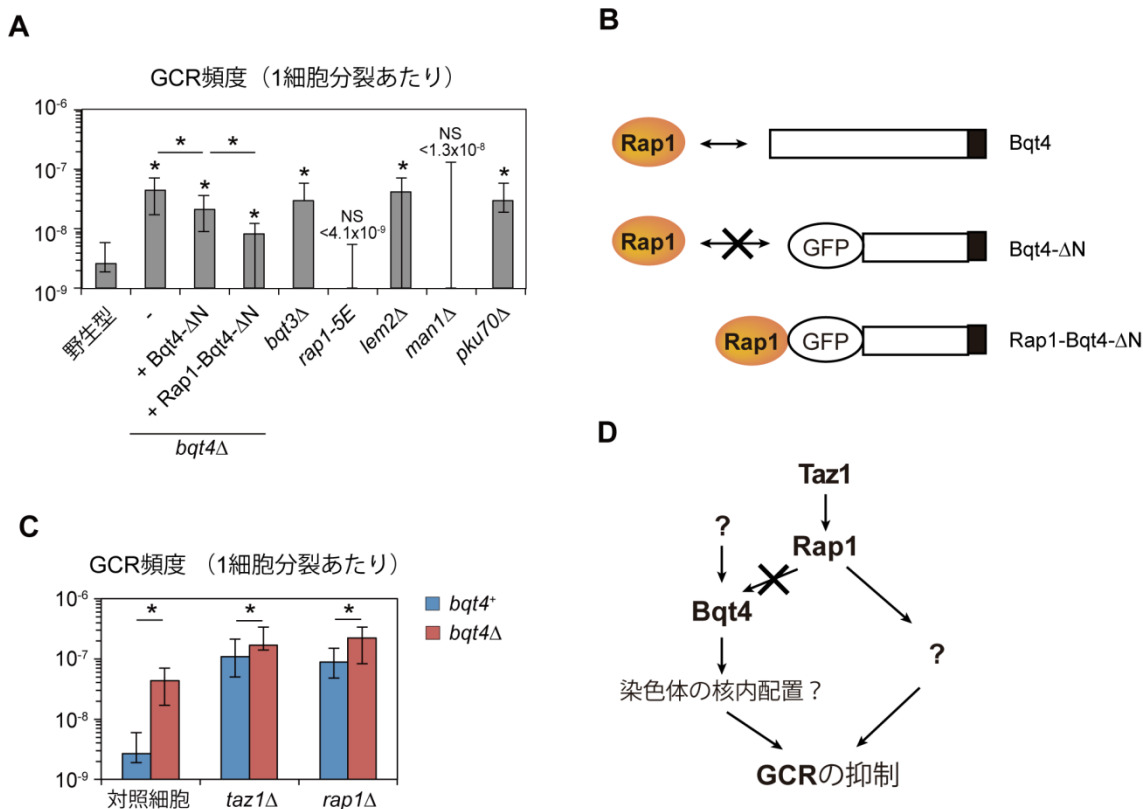


図 3-7

(A)テロメアの核膜への係留が弱まる変異の GCR 頻度への影響。(B)Bqt4 は N 末端側の領域で Rap1 と結合し、C 末端の領域(黒四角)で核膜内膜に局在する。Rap1-Bqt4 の相互作用の重要性を調べるために、Rap1 と結合できない Bqt4-ΔN および Rap1 との結合を強制的に再現した Rap1-Bqt4-ΔN。そこで、なお、本研究で発現させた Bqt4-ΔN、Rap1-Bqt4-ΔN は先行研究と同様に GFP を融合させたものを用いている(Chikashige et al. 2009)。(C) *bqt4*<sup>+</sup>欠損と *taz1*<sup>+</sup>欠損、*rap1*<sup>+</sup>欠損の GCR 頻度に関する遺伝学的相互作用。(D)Bqt4 は Taz1、Rap1 と別経路で GCR を抑制する。

### 3-8 テロメーヌの脱制御は *taz1*Δ株と *rap1*Δ株での GCR の増加に必須である

Taz1 と Rap1 はテロメーヌを負に制御することでテロメアの DNA 鎖長を制御しており、*taz1*Δ株と *rap1*Δ株ではテロメーヌの脱制御によりテロメア DNA が著しく伸長する(Nakamura 1998; Miller et al. 2006)。*taz1*Δ株と *rap1*Δ株では調べたすべての GCR が新規テロメア付加によるものだったことから、*taz1*Δ株と *rap1*Δ株では DSB に働くテロメーヌについても脱制御が起き、新規テロメア付加が増加することで GCR が増加する、という仮説を検討することとした。テロメーヌ触媒サブユニットをコードする *trt1*<sup>+</sup>をはじめとしたテロメーヌ活性に必須な遺伝子を欠失すると、染色体の環状化が起きる(Naito et al. 1998; Nakamura 1998)。このとき、環状染色体で GCR によりマーカー遺伝子が失われる

ためには、線状染色体の場合と異なり、DSBがマーカー遺伝子の前後の2か所に発生する必要がある。このため、線状染色体を持つ株と環状染色体を持つ株でGCR頻度を単純に比較することはできない。そこで、テロメレースのGCR頻度への寄与を調べるために *pof8<sup>+</sup>* 遺伝子を欠損させることにした。Pof8はテロメレースRNAの成熟に関与しており、野生株、*taz1Δ*株、*rap1Δ*株で *pof8<sup>+</sup>* を欠損するとテロメアの短小化が起きるが、*trt1<sup>+</sup>* の欠損とは異なり顕著な染色体環状化は見られない(Páez-Moscoso et al. 2018; Mennie et al. 2018; Liu et al. 2010; Collopy et al. 2018)。そこで *taz1Δ pof8Δ* 株および *rap1Δ pof8Δ* 株を作製したところ、*taz1Δ* 株、*rap1Δ* 株よりも低く、野生株と同等のGCR頻度を示した(図3-8)。この結果から、*taz1Δ* 株、*rap1Δ* 株でのGCRの増加にはテロメレース活性が不可欠であることが示唆された。一方、*rad2Δ pof8Δ* 株は *rad2Δ* 株と野生株の中間程度であったため、Taz1とRap1はテロメレース依存的なGCRを特異的に抑制していると考えられる。

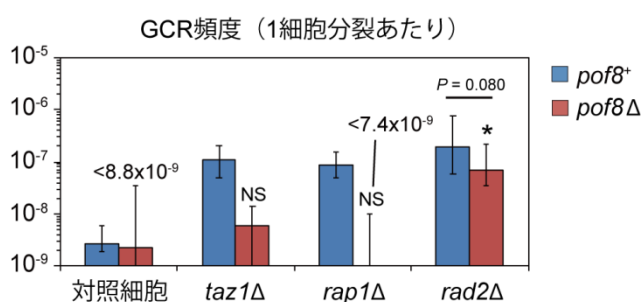


図 3-8

*pof8* 欠損によるテロメレース活性の低下の GCR 頻度への影響。

### 3-9 Taz1 はテロメア DNA 非存在下で GCR を抑制する

テロメレース活性が *taz1Δ* 株、*rap1Δ* 株において GCR を促進する機構として、大きく分けて2つの仮説が考えられる。ひとつは *taz1Δ* 株、*rap1Δ* 株において脱制御されたテロメレースが切断点での新規テロメア付加を直接促進するという仮説である。もうひとつは、脱制御されたテロメレースによって元々のテロメアが伸長し、そのことが間接的に非テロメア領域のGCRに影響するという仮説である。どちらが正しいかを調べるために、Trt1の有無でGCR頻度を比較することにした。ただ、前述したように *trt1Δ* 株は環状染色体を形成するため、線状染色体を持つ *trt1<sup>+</sup>* の株と単純にGCR頻度を比較することができない。そこで、環状染色体を形成した *trt1Δ* 株において、後から Trt1 発現プラスミドを導入した株としなかった株でGCR頻度を比較した。ただし、*trt1Δ taz1Δ* 株については染色体環状化が起こるかどうかは遺伝子の欠損の順序によって決定される。*trt1<sup>+</sup>* を先に欠損して *taz1<sup>+</sup>* を後に欠損した株は環状染色体を持つが(本研究では *trt1Δ taz1Δ* と記す)、*taz1<sup>+</sup>* を先に欠損した場合は *trt1<sup>+</sup>* を欠損しても線状染色体が保たれる(*taz1Δ trt1Δ* と記す)(Nakamura 1998)。本研究で使用した *trt1Δ* 株については、*taz1Δ trt1Δ* 株を除いて Trt1 発現プラスミドの導入



の有無に関わらず 1、2 番染色体の環状化を維持していた (図 3-9A)。 *taz1Δ trt1Δ*株は 1、2 番染色体について線状の形態を維持していた。

環状染色体を持つ細胞を GCR アッセイに供する場合、GCR として検出されるためには、環状染色体上の選択カセットの両側で二つの独立した DSB が発生して選択カセットが失われ、その上で染色体が修復されて細胞が生き残る、というような複雑な変化が必要となり、検出される GCR 頻度は低くなると考えられる。実際、Trt1 発現プラスミドを導入しなかった *trt1Δ*株、*trt1Δ taz1Δ*株、*trt1Δ rap1Δ*株では GCR 頻度は検出限界以下であった (図 3-9B)。また、*trt1Δ*株、*trt1Δ rap1Δ*株では Trt1 発現プラスミドを導入しても GCR 頻度の増加は見られなかった。その一方で、*trt1Δ taz1Δ*株では Trt1 発現プラスミドの導入によって GCR 頻度が有意に増加した。環状染色体はすべてのテロメア DNA を失うため (Sadaie et al. 2003)、環状染色体を用いた実験では Taz1 はテロメア DNA に結合していないと考えられる。Trt1 を発現させたときに *trt1Δ taz1Δ*株の GCR 頻度が *trt1Δ*株よりも高かったことから、Taz1 はテロメア DNA への結合を介さずに GCR を抑制しうることが示唆された。一方、*trt1Δ rap1Δ*株では Trt1 を発現させた際に GCR 頻度の上昇が見られなかったことから、Rap1 は上記のテロメア DNA 非依存的な GCR の抑制には必要ない可能性が高い。このことから、Taz1 が Rap1 非依存的な環状染色体での GCR を防ぐ機能を持っていることが示唆された。*trt1Δ taz1Δ poz1Δ*の場合は Trt1 発現プラスミドを導入しても GCR 頻度の上昇は見られなかったことから、これらの Taz1 の機能は Poz1 により促進されると考えられる。

一方、線状染色体を維持する *taz1Δ trt1Δ*株は *taz1Δ*株よりも低い GCR 頻度を示し、Trt1 発現プラスミドの導入によって GCR 頻度の上昇がみられた。これらのことから、*taz1Δ*株における GCR 頻度の上昇がテロメレースに依存していることが示された。その一方で、*taz1Δ trt1Δ*株の GCR 頻度は野生型や *taz1Δ pof8Δ*よりも高かった。*taz1Δ trt1Δ*株ではテロメアがテロメレースにより伸長するのではなく、テロメア同士がテロメア配列間で組換えを起こし、BIR によって複製することで維持されていると考えられている。*taz1Δ trt1Δ*株では高い組換え活性を持っていることが予想されるため、組換えを起点として GCR が発生しやすくなっている可能性がある。

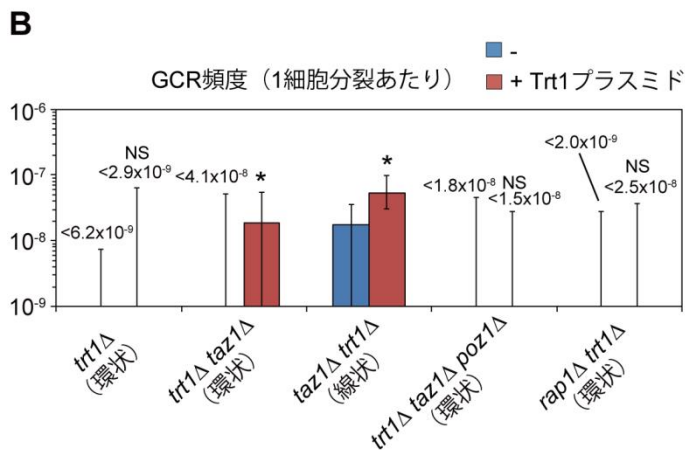
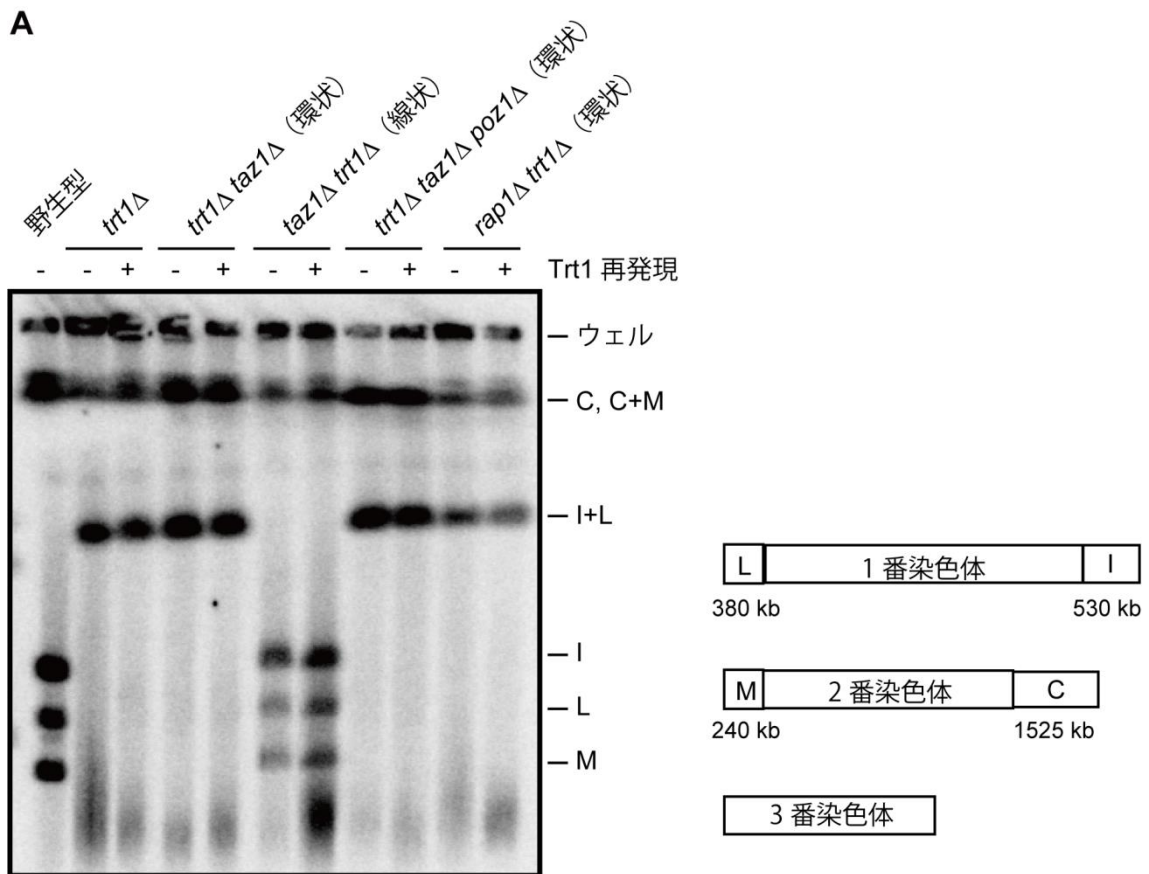


図 3-9 環状染色体条件下での Taz1、Rap1 の GCR 頻度への影響

(A) *trt1Δ*株は Trt1 再発現後も 1、2 番染色体の環状化を維持している。NotI で切断したゲノム DNA をパルスフィールドゲル電気泳動およびサザンブロッティングで解析した。サザンブロッティングでは 1、2 番染色体の両末端の断片 C、I、L、M を 4 種類のプローブを混合したもので検出した。Trt1 再発現は pREP1-*trt1+*プラスミド(Trt1 プラスミド)の導入によって行った。例えば 1 番染色体が自己環状化した場合、I 断片と L 断片は融合しているため、I と L のバンドは消失し、I+L のバン

ドが出現する。3-9 の条件では細胞は常に YES 培地で培養しているため、Trt1 プラスミドで Trt1 の発現を調節する *nmt1* プロモーターは中程度の活性を持っていると考えられる。環状:環状染色体、線状:線状染色体(本文参照)。(B)(A)で解析した細胞株の GCR 頻度。

### 3-10 Rap1 の BRCT ドメインは GCR の抑制に重要である

Rap1 による GCR 抑制機構をより詳細に調べるために、以前の研究で報告された、Rap1 を N 末端から順に欠失させた一連の変異株 *rap1-A~G* を使用した(Fujita et al. 2012b) (図 3-10A, B)。その中で、*rap1-G* のみで GCR 頻度の上昇が見られた (図 3-10C)。*rap1-G* のみが Poz1 結合部位 (Rap1 の 457~512 番目のアミノ酸) を欠失していたため(Fujita et al. 2012b)、Rap1-Poz1 の結合が GCR の抑制に必要なだという仮説が考えられた。しかし、Poz1 結合部位のみを欠損した *rap1ΔP* では GCR 頻度の上昇は見られなかった。そこで、Poz1 結合部位に加えて他の部位も重要なのではないかという仮説を立て、より詳細に調べたところ、Rap1 の Poz1 結合部位と同時に N 末端に存在する BRCT ドメインを欠失した変異株 *rap1-ΔΔP* では GCR 頻度が上昇し、*rap1Δ* 株と同程度になることが分かった。また、*rap1-ΔΔP* 株の GCR の種類は 10 検体中 9 検体が末端欠失だった (図 3-10D)。加えて、*rap1-ΔΔP* 株の GCR 頻度の上昇は *pof8\** の欠損によって抑制された (図 3-10C)。このように、*rap1-ΔΔP* 変異が GCR 制御に関して *rap1Δ* 株の表現型を再現していることから、BRCT ドメインと Poz1 結合部位が冗長的に GCR を抑制することが示された。ここで、BRCT ドメインのみを欠く *rap1-A* 株ではテロメア伸長が見られないことから(Fujita et al. 2012b)、BRCT ドメインはテロメアでのテロメラーゼ制御は行っておらず、Poz1 結合部位がテロメアおよびテロメア外の DSB でテロメラーゼの抑制を介して GCR を抑制していると考えられる。そこで、BRCT ドメインは一般的な DNA 修復を促進しており、BRCT ドメインを欠失した場合は、修復できなかった DNA 損傷に対してテロメラーゼが新規テロメア付加を行うという状態になるのではないかと考えた。

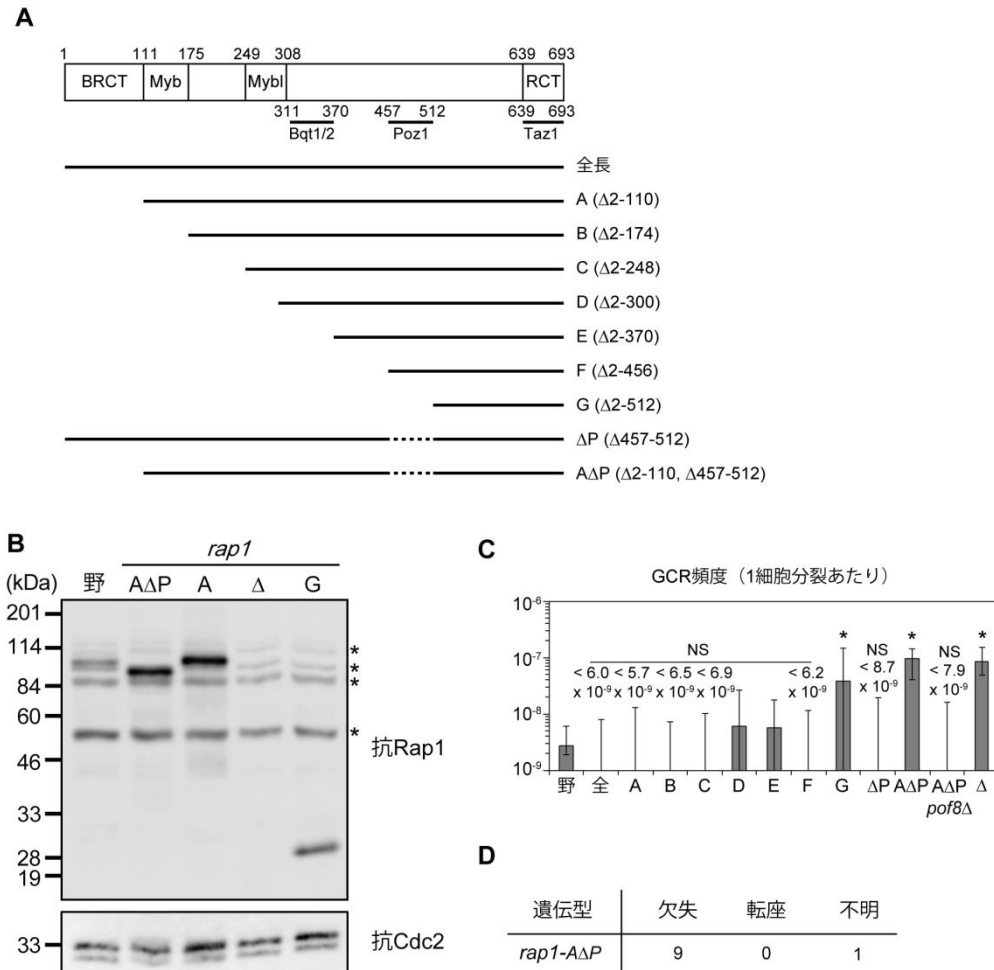


図 3-10 GCR 抑制に關与する Rap1 ドメインの同定

(A) 使用した Rap1 変異の模式図。(B) Rap1 の発現。全細胞抽出液を抗 Rap1 抗体および抗 PSTAIR 抗体(抗 Cdc2 抗体)を用いてイムノブロットで解析した。アスタリスクは非特異的検出だと考えられる。(C) Rap1 変異株の GCR 頻度。Rap1 はゲノムに挿入した単独の *rap1* プロモーターから発現した。野:野生株、全:全長。アスタリスクと NS はすべて野生株との比較結果。(D) *rap1-AΔP* 株で同定された GCR の種類の内訳。

### 3-11 Taz1、Rap1 は DSB 誘導時の生存を促進し、末端欠失を抑制する

GCR は異常な DSB 修復により起こると考えられるため、Taz1、Rap1 のテロメレース非依存的な GCR 抑制機構とは、DSB 修復の制御であるという仮説を立てた。この仮説を検証するために、DSB を部位特異的に誘導する実験系を構築した (図 3-11A)。この系では、テトラサイクリン誘導プロモーターによりエンドヌクレアーゼ I-SceI の発現が制御されている。I-SceI はアンヒドロテトラサイクリン (ahTET) が培地に添加されたときのみ発現

し、ゲノム DNA に挿入された I-SceI 切断部位 (I-SceIcs) に DSB を誘導する。この実験系は Kurt Runge 博士が構築した。私は Kurt Runge 博士のご協力の元、I-SceI 切断部位を GCR アッセイの細胞株でマーカーカセットが挿入されたのと同じ位置 (1 番染色体右腕のテロメアから約 150 kb の位置) に挿入した株を作製した。ahTET を添加した 2 時間後の細胞のゲノム DNA について I-SceIcs を挟むプライマーセットを用いて定量 PCR を行ったところ、野生株、*taz1Δ*株、*rap1Δ*株、*poz1Δ*株では DNA 増幅量が ahTET を添加する前の 40~50% になっていた (図 3-11B)。このことから、これらの株では同等の効率で DSB が誘導されていることが確認された。この系を用いて、細胞が DSB を修復する効率を調べた。

まず、DSB を一時的に誘導した際の細胞の生存率を比較した。ahTET を含む培地で 2 時間培養して一時的に DSB を誘導した後、ahTET を含まない培地に一定数細胞を播種し、その後コロニー数を測定することで細胞の生存率を求めた。この場合、DSB が存在する状態では細胞は細胞周期を停止し、増殖できない。しかし、細胞は HR 等により DSB を修復することで増殖を再開することが可能になる。新規テロメア付加などによる不正確な DSB 修復が起きることによっても細胞が生存しうると考えられるが、野生株、*taz1Δ*株、*rap1Δ*株より 10 コロニーずつからゲノム DNA を抽出して解析したところ、どのコロニーにも I-SceIcs の消失・変異は見られなかった。また、DSB が誘導されなかった場合も細胞は生存できるが、前述した通り DSB の誘導率は少なくとも 4 種類の株では同等だった。野生株で DSB を一時的に誘導したところ、DSB 非誘導時と比較した際の生存率は 62% に減少した (図 3-11D)。一方、*taz1Δ*株、*rap1Δ*株では生存率はそれぞれ 37%、32% となり、減少が大きかった。このことから、Taz1、Rap1 が DSB 修復を促進することが明らかになった。さらに、*taz1Δ poz1Δ*株の生存率は *taz1Δ*株と同等であったことから、Taz1 はテロメレースの制御と異なる経路で DSB 修復を行うと考えられる。ここで、Rap1 の BRCT ドメインを欠く *rap1-A* 株も野生株と比較して有意ではないものの生存率の減少を示したことから、Rap1 の BRCT ドメインは DSB 修復において重要な役割を果たしていると考えられる (図 3-11E)。

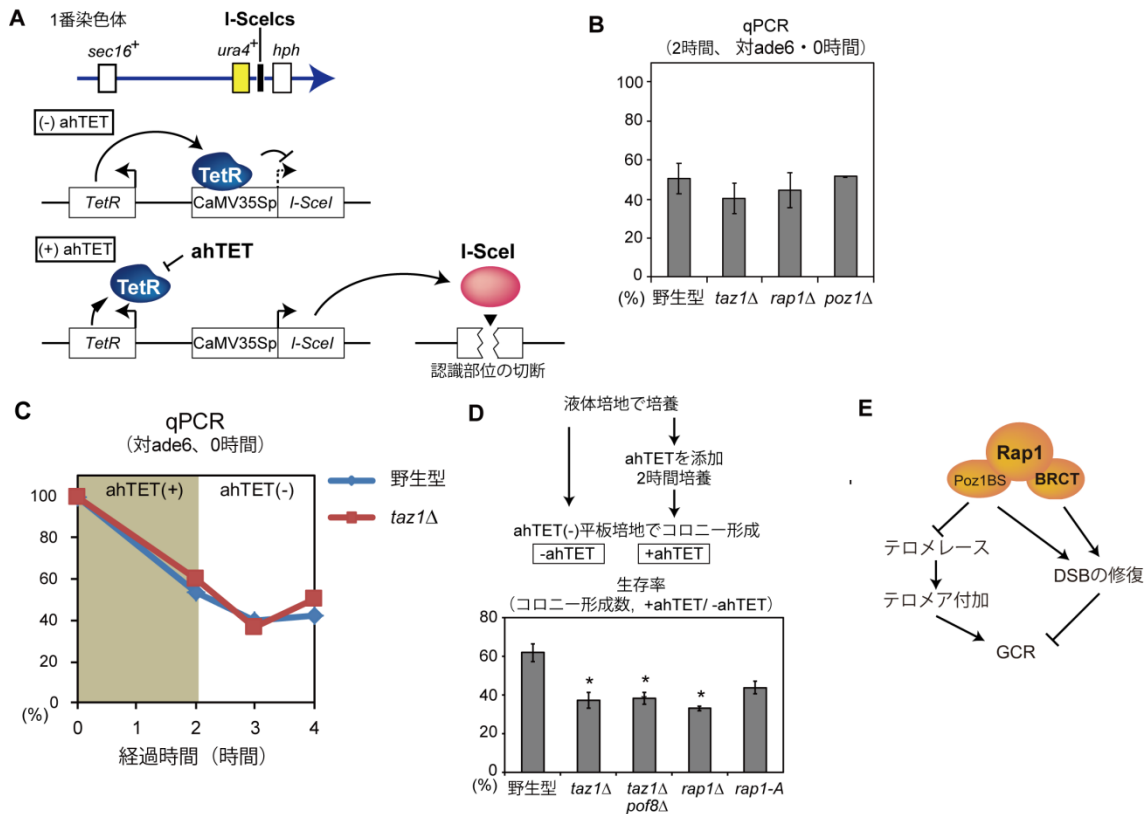


図 3-11 Taz1、Rap1 の I-SceI 誘導性 DSB の修復への影響

(A) 部位特異的 DSB 誘導系の模式図。I-SceI エンドヌクレアーゼをコードする遺伝子を含むカセットをゲノム DNA に挿入した。I-SceI 遺伝子は、改変型 CaMV 35S プロモーターの下流に配置されている。同じカセットに恒常的に発現する Tet リプレッサー (TetR) 遺伝子が含まれており、TetR は改変型 CaMV 35S プロモーターの活性を抑制するため、I-SceI の発現は低く抑えられる。一方、TetR を抑制する無水テトラサイクリン (ahTET) を培養液に加えると、I-SceI の発現が誘導され、I-SceI 切断部位 (I-SceIcs) が切断される。本研究では I-SceIcs は GCR 頻度測定系での *ura4*-TK と同じ位置に挿入したため、同位置に DSB が誘導される。(B) I-SceIcs での DSB 誘導効率。ahTET を添加して記載の時間後に I-SceIcs をまたぐプライマーセットを用いて qPCR をすることで、切断された DNA の割合を測定した。(C) (B) の条件で、ahTET 添加の 2 時間後に ahTET を培地から取り除いた場合の DSB 誘導効率。(D) 2 時間の ahTET 処理後の生存率。P 値は two-tailed Student's t-test によって求めた。(E) Rap1 による DSB 修復、GCR 抑制のモデル。

### 3-12 Taz1、Rap1 は DSB 誘導時の末端欠失を抑制する

*taz1Δ* 株、*rap1Δ* 株で GCR 頻度が上昇する機構について、*taz1Δ* 株、*rap1Δ* 株で DSB 修復機能が減弱したことで、発生した DSB が GCR へと変換されやすくなるという仮説が考えられる。この仮説を検証するために、I-SceI により誘導された DSB が GCR に変換される頻度を測定した。この実験では、細胞を ahTET が含まれる平板培地に播種して培養し、

発生するコロニー数を測定した。この条件では、細胞は常に I-SceI を発現しているため、I-SceIcs に DSB が誘導され続ける。先ほどの実験とは異なり、正確に DSB が修復されても、修復された I-SceIcs に再び DSB が誘導されてしまうため、生存にはつながらない。その一方で、DSB が修復される際に GCR や点変異、挿入・欠失等が発生して I-SceIcs の正確な配列が失われた場合、それ以上 I-SceI による切断が起きなくなるため、細胞は生存し、コロニーを形成することができる。そのため、この実験での生存率は不正確な DSB 修復の活性を反映すると考えられる。野生株では、生存率はわずかに 0.58% であり、不正確な DSB 修復は稀にしか起こらないことが推察された (図 3-12)。生存したコロニーを単離してゲノム DNA を解析したところ、解析できたすべてのコロニーにおいて、I-SceIcs は新規テロメア付加によって失われていた。 *trt1Δ* 株、 *ccq1Δ* 株では生存率が野生株よりも減少したため、テロメアでのテロメア伸長と同様に、新規テロメア付加には Trt1 や Ccq1 が必要であることが予想された。次に、 *taz1Δ* 株、 *rap1Δ* 株で測定を行ったところ、両株は野生株よりも高い生存率を示した。野生株と同様に、生存株のゲノム DNA を解析したところ、野生株と同様に解析できたすべての生存株で I-SceIcs が新規テロメア付加によって失われていたことから、 *taz1Δ* 株、 *rap1Δ* 株では新規テロメア付加の頻度が上昇したことが示唆された。そのため、Taz1、Rap1 は DSB 修復を促進するとともに、新規テロメア付加という誤った DSB 修復機構を抑制することが明らかになった。また、 *rap1-A* 株および *poz1Δ* 株では生存率の上昇は見られなかった。そのため、Rap1 の BRCT ドメインおよび Rap1-Poz1 間の結合は単独では新規テロメア付加の抑制には必要ではなく、GCR の制御と同様に、両者が冗長的に新規テロメア付加の抑制を行っていることが予想される。

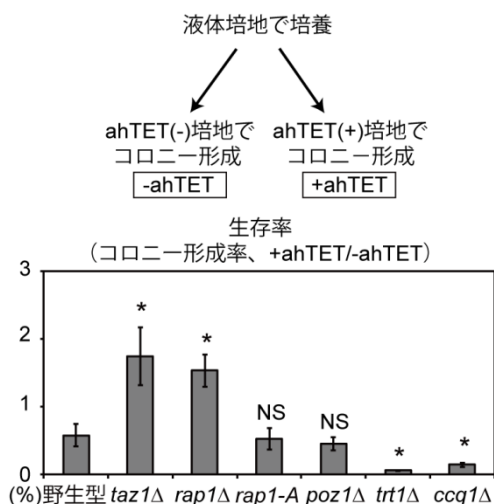


図 3-12 Taz1、Rap1 による DSB 誘導性 GCR の発生率への影響

図 3-11(A) の細胞について、ahTET を含まない平板培地、ahTET を含む平板培地に播種してコロニー形成率を比較した。P 値は two-tailed Student's t-test によって求めた。

### 3-13 *taz1Δ* 株、*rap1Δ* 株では新規テロメア付加の切断点の分布が異なる

次に、先の実験で解析した生存株の新規テロメア付加について、テロメア配列が付加された部位の分布に着目した。野生株では解析した 9 クローンすべてで I-SceIcs の直近(1~10 bp) にテロメア配列が付加されていた (図 3-13)。一方、*taz1Δ*株、*rap1Δ*株ではそれぞれ 9 クローン中 5 クローン、7 クローン中 2 クローンでそれよりもセントロメア側 (>10 bp) にテロメア配列が付加されていた。*taz1Δ*株由来の 1 クローン、*rap1Δ*株由来の 1 クローンでは~400 bp セントロメア側の領域、*taz1Δ*株由来の 4 クローン、*rap1Δ*株由来の 1 クローンでは 9~13 kb セントロメア側の領域に分布が見られた。そのため、*taz1Δ*株、*rap1Δ*株では新規テロメア付加が起こる前に DSB が大規模な DNA 末端消化を受けている可能性が考えられた。そこで、クロマチン免疫沈降によって DNA 一本鎖に結合する RPA のサブユニットである Rad11 の局在を調べた。Rad11 は野生株でも *taz1Δ*株でも、ahTET 添加の 2 時間後には I-SceIcs から 1.5 kb 離れた部位に局在が見られ、4 時間後には 5、13 kb 離れた部位にまで局在が広がっていた。以上の結果から、一部の DSB は野生株と *taz1Δ*株において非常に長い一本鎖切除を受けるが、*taz1Δ*株では何らかの機構でそうした切除された部分での新規テロメア付加が起きやすくなっていると考えられる。*rap1Δ*株では先の実験での生存率自体は高くなかったが、新規テロメア付加の切断点の分布自体は *taz1Δ*株、*rap1Δ*株と類似していたため、切断点の分布の変化は Rap1 の BRCT ドメインによると考えられる。



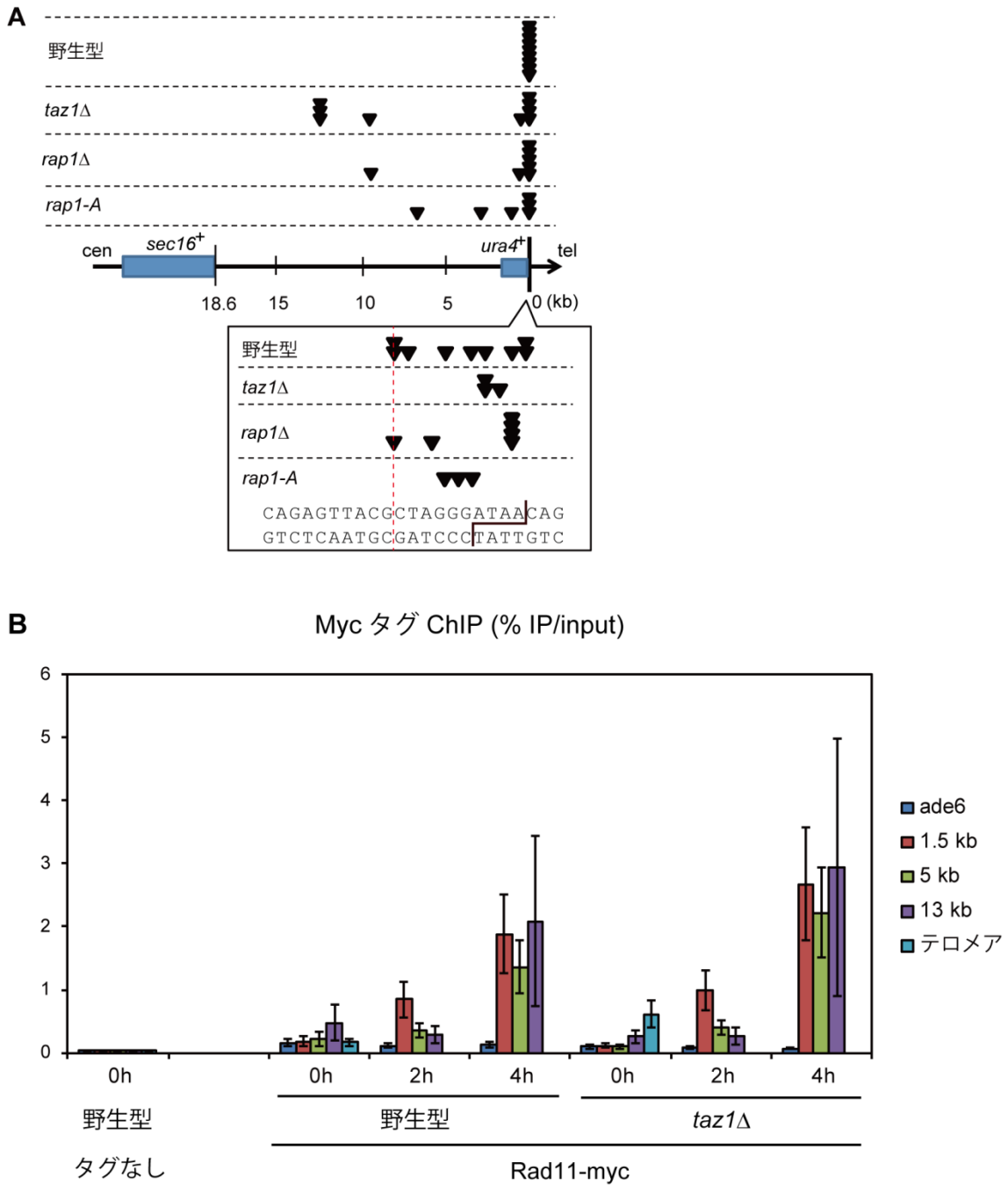


図 3-13 *Taz1*、*Rap1* による DNA 切除への影響

(A) 図 3-13 に示す実験で得られた生存細胞について、GCR(すべて欠失)の切断点を同定し、その分布をプロットした。赤い点線は *I-SceIcs* から 10 bp の部分を示す(本文参照)。(B) *Rad11* の *I-SceIcs* 付近への局在。*Rad11-myc* を発現させた上で、ahTET 添加前後で細胞を回収し、抗 myc 抗体を用いたクロマチン免疫沈降(ChIP)によって *Rad11-myc* の局在を調べた。。“~kb”は *I-SceIcs* から~kb セントロメア側に離れた部分に設計したプライマーセットを指す。“テロメア”はテロメアから約 300 bp セントロメア側に離れた部分に設計したプライマーセットを指す。*ade6* 座位は陰性対照として用いた。

### 3-14 Taz1、Rap1 による GCR の抑制と DNA 損傷薬剤への耐性の関連

以前の研究において、*taz1Δ*株が DNA 損傷薬剤であるメチルメタンсульフォネート (MMS) やブレオマイシンに対して感受性を示すことから、Taz1 が DSB 修復に関与することが報告されていた (Miller and Cooper 2003)。この感受性は *cds1+* を同時に欠損することで増強された。私は、この研究で報告された Taz1 の DSB 修復が、本研究で明らかにした Taz1、Rap1 の DSB の修復、GCR の抑制と同じ経路で起こるのか調べることにした。そこで、*taz1Δ*株と *rap1Δ*株において DNA 損傷薬剤感受性と、本研究で観察された GCR 頻度の増加に相関が見られるかどうか調べた。まず、以前の研究から *taz1Δ*株とは異なり、*rap1Δ*株は MMS 感受性を示さないことが報告されていた。また、我々は *rap1Δ*株のブレオマイシン感受性が野生株と同等かそれ以下であることを明らかにした (図 3-14A)。これらの結果は、*taz1Δ*株と *rap1Δ*株は同程度の野生型よりも高い GCR 頻度を示したのとは対照的である。次に、*taz1Δ cds1Δ*株が *taz1Δ*株よりも高い MMS 感受性を示したのに対し (Miller and Cooper 2003)、*taz1Δ cds1Δ*株と *rap1Δ cds1Δ*株を作製して GCR 頻度を測定したところ、*taz1Δ*株や *rap1Δ*株と比較して GCR 頻度の上昇は見られなかった (図 3-14B)。このように、先行研究と本研究の間では相関しない部分が多く、現時点では関連があるかどうかは明らかでない。

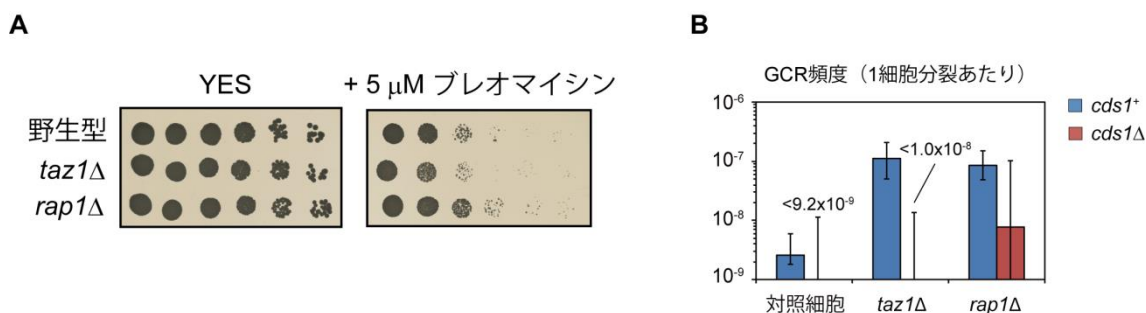


図 3-14 Taz1、Rap1 による GCR の抑制と DNA 損傷薬剤への耐性の関連

(A) 図 3-1(B)と同様に、ブレオマイシンへの感受性を調べた。(B) *cds1+*欠損による *taz1Δ*株や *rap1Δ*株の GCR 頻度への影響。

### 3-15 Taz1、Rap1 の DSB 誘導部位への局在

最後に、Taz1、Rap1 が DSB に物理的に相互作用するかどうかを ChIP によって調べた。Taz1、Rap1 のどちらも、テロメアには局在が見られたのに対し、I-SceIcs から 1.5 kb および 5 kb 離れた部位には局在が見られなかった (図 3-15)。Taz1、Rap1 が DSB 修復に機能する機構として、Taz1、Rap1 は DSB に一過的に短い時間だけリクルートされる可能性がある。あるいは、Taz1、Rap1 は DSB 修復に間接的に関与する可能性がある。

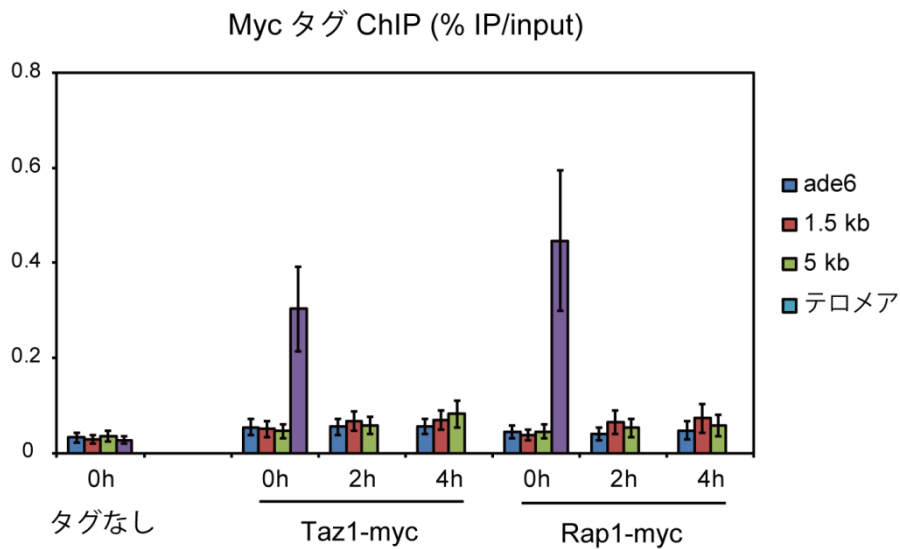


図 3-15 Taz1、Rap1 の DSB への局在

Taz1-myc または Rap1-myc を発現させた上で、ahTET 添加前後で細胞を回収し、抗 myc 抗体を用いたクロマチン免疫沈降(ChIP)によって両蛋白質の局在を調べた。“~kb”は I-SceIcs から~kb セントロメア側に離れた部分に設計したプライマーセットを指す。“テロメア”はテロメアから約 300 bp セントロメア側に離れた部分に設計したプライマーセットを指す。ade6 座位は陰性対照として用いた。

## 第四章

### 考察

本研究はシェルタリン構成因子 **Taz1**、**Rap1** がテロメア以外の領域においてもゲノムの安定化を行うことを明らかにした。**Taz1**、**Rap1** を欠損することで自発的な GCR、特に新規テロメア付加を伴う染色体末端欠損が増加した。その場合の GCR の上昇にはテロメレーズの脱制御が必須であることが示唆された。その一方で、テロメレーズの脱制御に必要な **Rap1-Poz1** の結合のみを阻害しただけでは GCR の増加は起こらなかった。そこで、特に **Rap1** について注目して **Rap1-Poz1** の結合の阻害と **Rap1** の BRCT ドメインの欠損を同時に行ったところ、GCR が増加した。これらの結果から、**Rap1** が 2 つの独立した経路を用いて冗長的に GCR を抑制することが明らかになった。一つは BRCT ドメインによる経路、もう一つは **Rap1-Poz1** 相互作用を通じてテロメレーズのリクルートを抑制する経路である。

#### 4-1 テロメア因子 **Taz1**、**Rap1** が非テロメア領域の GCR を抑制する機構

**Taz1**、**Rap1** はどのようにテロメアから約 150 kb 離れた breakpoint region で GCR を抑制するのだろうか。**Taz1** はテロメア外でもテロメア様配列にリクルートされることが知られていたものの(Tazumi et al. 2012)、本研究の GCR アッセイでの breakpoint region にはテロメア DNA モチーフは含まれておらず、以前に報告されたゲノムワイド ChIP 解析でも本研究でいう breakpoint region に相当する領域において **Taz1** の局在は検出されなかった(Tazumi et al. 2012)。また、別の研究では 3C 法を用いて染色体の三次元配置が調べられたが、breakpoint region はテロメアと近接していなかった(Tanizawa et al. 2010; Mizuguchi et al. 2015)。考えられる仮説としては、*taz1*Δ株や *rap1*Δ株で見られる高頻度の GCR は、これらの遺伝子機能欠損から生じるテロメア異常から間接的にもたらされる、というものがある。例えば、*taz1*Δ株や *rap1*Δ株で見られる伸長したテロメアや、*taz1*Δ株で見られるギャップを含むテロメアは通常よりも DSB 修復因子をリクルートすることで隔離してしまい(Moser et al. 2009; Dehé et al. 2012)、非テロメア領域で起こった DSB 修復の効率が損なわれてしまう、という仮説が考えられる。しかし、この仮説と整合性が取れない結果として、本研究では **Taz1** については環状染色体でテロメア DNA が不在の状態でも GCR の抑制機能を保っていることが示された。他の仮説として、**Taz1**、**Rap1** がテロメア DNA 配列に依存しない形で直接 DSB にリクルートされるというモデルが考えられる。本研究での ChIP 解析では **Taz1**、**Rap1** の局在は検出されなかったが、**Taz1**、**Rap1** の局在が量的に少ない可能性や、ヒト TRF2 のように DSB に短時間だけ局在する可能性が考えられる(Huda et al. 2012; McKerlie et al. 2013; Huda et al. 2009)。また、出芽酵母では核膜蛋白質の Mps3 が未修復の DSB に結合して DSB を核膜付近にリクルートすることが知られているが(Schober et al. 2009)、DSB が核膜付近にリクルートされることで DSB とテロメアが近接し、**Taz1**、**Rap1** が機能する可能性がある。

#### 4-2 Taz1、Rap1 は DSB 修復を促進する

本研究では Taz1、Rap1 が一時的に DSB を誘導した後の生存率を向上させたことから、両者が DSB 修復に関与することが示唆された。興味深いことに、DSB を恒常的に誘導した実験では、*taz1Δ*株、*rap1Δ*株での GCR の切断点が元の DSB の場所よりも 10 kb 以上離れた部位にあるケースが見られた。こうした巨大な欠失が起こる原因として、①DSB の過剰な切除、もしくは②相同組換え活性の低下という二つの可能性が考えられる。①については、Taz1、Rap1 がテロメアでは過剰な切除を抑制することが知られていることから (Tomita et al. 2003)、テロメア外でも同様の機能を持つことが考えられる。出芽酵母では DSB で 5' 鎖の切除が生じた数時間後、3' 鎖も分解されるという報告があり (Zierhut and Diffley 2008)、5'鎖が過剰な切除を受けた DSB ではその相補鎖も失われる可能性がある。そうして生じた新たな DSB 部位に新規テロメア付加が起こることで、元の DSB から離れた部位まで欠失が起こることになる。②については、ヒト TRF1 が非テロメア領域での DSB で相同組換え修復を促進していることから (McKerlie et al. 2013)、Taz1 も同様の機能を持つ可能性がある。その場合、*taz1Δ*株、*rap1Δ*株での DSB 修復効率の減少は HDR 効率の減少により説明できる。また、恒常的に DSB を誘導した際の新規テロメア付加の増加は、HDR 効率の減少により修復が遅れた DSB に、脱制御されたテロメレーズが作用することで起こる可能性がある。さらに、HDR 効率の減少により DSB 修復が遅れた場合、それが原因で過度の切除が起こり、前述のように巨大な欠失につながるかもしれない。本研究と類似した結果として、出芽酵母で新規テロメア付加が活性化する *pif1* 変異株の報告がある。野生株では HO エンドヌクレアーゼにより DSB を誘導した際に DSB 付近に新規テロメア付加の切断点が集中するのに対し、*pif1* 変異株では切断点が DSB から離れた部位にも分散した (Schulz and Zakian 1994)。最近、Pif1 は HDR を促進することが示されたことから (Jimeno et al. 2018)、このケースについても HDR の効率低下により説明できる。

#### 4-3 Rap1 の BRCT ドメインの DSB 修復・GCR 抑制における機能

出芽酵母や哺乳類細胞を用いた以前の研究では、テロメア結合蛋白質による GCR の抑制は染色体融合や新規テロメア付加を抑制することによってのみ起こると考えられていた。しかし、本研究の Rap1 の BRCT ドメインに関する結果から、シェルタリン複合体の構成因子がこれまで知られていなかった機構によりゲノム不安定性を抑制する可能性が示された。本研究ではこれまで機能不明であった Rap1 の BRCT ドメインが、Poz1 結合部位と冗長的に GCR を抑制することが分かった。*rap1Δ*株での GCR 頻度の上昇には DNA リガーゼ IV が不要であることから、BRCT ドメインによる抑制機構が染色体融合によるとは考えにくい。また、BRCT ドメインを欠く *rap1-A* 株のテロメア長は正常であり (Fujita et al. 2012b)、BRCT ドメインはテロメレーズの制御にも関与していない可能性が高い。

現時点では BRCT ドメインが GCR を抑制する詳細な分子機構は不明だが、一時的に DSB を誘導した際に生存率が減少することから、DSB 修復に関与するものとみられる。Rap1 は生物種を越えて N 末端に BRCT ドメインを持っている。しかし、出芽酵母 Rap1 の BRCT ドメインの変異が転写活性に影響するという報告を除き (Miyake et al. 2000)、その機能はほとんどわかっていない。哺乳類 Rap1 の BRCT ドメインがゲノム不安定性や DSB 修復に関与するか、というのも興味深い問題である。今後、分裂酵母や他生物のシェルタリン構成因子について精査することで、詳細な GCR の抑制機構が明らかになることが期待される。

## 文献

- Alfa C, Fantes P, Hyams J, Warbrik E. 1993. Experiments with fission yeast: A laboratory course manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Boulé JB, Vega LR, Zakian VA. 2005. The yeast Pif1p helicase removes telomerase from telomeric DNA. *Nature* **438**: 57–61.
- Carneiro T, Khair L, Reis CC, Borges V, Moser BA, Nakamura TM, Ferreira M. 2010. Telomeres avoid end detection by severing the checkpoint signal transduction pathway. *Nature* **467**: 228–232.
- Chan SW, Blackburn EH. 2003. Telomerase and ATM / Tel1p Protect Telomeres from Nonhomologous End Joining. **11**: 1379–1387.
- Chen C, Kolodner RD. 1999. Gross chromosomal rearrangements in *Saccharomyces cerevisiae* replication and recombination defective mutants. *Nat Genet* **23**: 81–85.
- Chen Y, Rai R, Zhou Z-R, Kanoh J, Ribeyre C, Yang Y, Zheng H, Damay P, Wang F, Tsujii H, et al. 2011. A conserved motif within RAP1 has diversified roles in telomere protection and regulation in different organisms. *Nat Struct Mol Biol* **18**: 213–221.
- Chikashige Y, Hiraoka Y. 2001. Telomere binding of the Rap1 protein is required for meiosis in fission yeast. *Curr Biol* **11**: 1618–1623.
- Chikashige Y, Yamane M, Okamasa K, Tsutsumi C, Kojidani T, Sato M, Haraguchi T, Hiraoka Y. 2009. Membrane proteins Bqt3 and -4 anchor telomeres to the nuclear envelope to ensure chromosomal bouquet formation. *J Cell Biol* **187**: 413–427.
- Collopy LC, Ware TL, Goncalves T, Kongsstovu S, Yang Q, Amelina H, Pinder C, Alenazi A, Moiseeva V, Pearson SR, et al. 2018. LARP7 family proteins have conserved function in telomerase assembly. *Nat Commun* **9**: 1–8.
- Dehé PM, Rog O, Ferreira MG, Greenwood J, Cooper JP. 2012. Taz1 Enforces Cell-Cycle Regulation of Telomere Synthesis. *Mol Cell* **46**: 797–808.
- Ferreira MG, Cooper JP. 2001. The fission yeast Taz1 protein protects chromosomes from Ku-dependent end-to-end fusions. *Mol Cell* **7**: 55–63.
- Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. 1993. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* **75**: 1027–1038.
- Fraser JLA, Neill E, Davey S. 2003. Fission yeast Uve1 and Apn2 function in distinct oxidative damage repair pathways in vivo. *DNA Repair (Amst)* **2**: 1253–1267.
- Fujita I, Nishihara Y, Tanaka M, Tsujii H, Chikashige Y, Watanabe Y, Saito M, Ishikawa F, Hiraoka Y, Kanoh J. 2012a. Telomere-nuclear envelope dissociation promoted by rap1 phosphorylation ensures faithful chromosome segregation. *Curr Biol* **22**: 1932–1937.



- Fujita I, Tanaka M, Kanoh J. 2012b. Identification of the Functional Domains of the Telomere Protein Rap1 in *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One* **7**: e49151.
- Futreal P, Coin L, Marshall L, Down T, Hubbard T, Wooster T, Rahman N, Stratton M. 2004. A census of human cancer genes. *Nat Rev Cancer* **4**: 177–183.
- Gonzalez Y, Saito A, Sazer S. 2012. Fission yeast Lem2 and Man1 perform fundamental functions of the animal cell nuclear lamina. *Nucleus* **3**: 60–76.
- Greider CW, Blackburn EH. 1987. The telomere terminal transferase of tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* **51**: 887–898.
- Huda N, Abe S, Gu L, Mendonca MS, Mohanty S, Gilley D. 2012. Recruitment of TRF2 to laser-induced DNA damage sites. *Free Radic Biol Med* **53**: 1192–1197.
- Huda N, Tanaka H, Mendonca MS, Gilley D. 2009. DNA damage-induced phosphorylation of TRF2 is required for the fast pathway of DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* **29**: 3597–3604.
- Jimeno S, Camarillo R, Mejías-Navarro F, Fernández-Ávila MJ, Soria-Bretones I, Prados-Carvajal R, Huertas P. 2018. The Helicase PIF1 Facilitates Resection over Sequences Prone to Forming G4 Structures. *Cell Rep* **24**: 3262–3273.e4.
- Jones ME, Thomas SM, Rogers A. 1994. Luria-Delbrück fluctuation experiments: design and analysis. *Genetics* **136**: 1209–1216.
- Jun HI, Liu J, Jeong H, Kim JK, Qiao F. 2013. Tpz1 controls a telomerase-nonextendible telomeric state and coordinates switching to an extendible state via Ccq1. *Genes Dev* **27**: 1917–1931.
- Kanoh J, Ishikawa F. 2001. spRap1 and spRif1, recruited to telomeres by Taz1, are essential for telomere function in fission yeast. *Curr Biol* **11**: 1624–1630.
- Kanoh J, Sadaie M, Urano T, Ishikawa F. 2005. Telomere binding protein Taz1 establishes Swi6 heterochromatin independently of RNAi at telomeres. *Curr Biol* **15**: 1808–1819.
- Kim JK, Liu J, Hu X, Yu C, Roskamp K, Sankaran B, Huang L, Komives EA, Qiao F. 2017. Structural Basis for Shelterin Bridge Assembly. *Mol Cell* **68**: 698–713.
- Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomäki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nyström-Lahti M. 1993. Mutations of a *mutS* homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* **75**: 1215–1225.
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 1997. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* **386**: 623–627.
- Linger BR, Price CM. 2009. Conservation of Telomere protein complexes: Shuffling through Evolution. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **44**: 434–446.
- Liu N-N, Han TX, Du L-L, Zhou J-Q. 2010. A genome-wide screen for *Schizosaccharomyces pombe* deletion mutants that affect telomere length. *Cell Res* **20**: 963–965.

- Luria SE, Delbrück M. 1943. Mutations of Bacteria from Virus Sensitivity to Virus Resistance. *Genetics* **28**: 491-511.
- Maher C a, Palanisamy N, Brenner JC, Cao X, Kalyana-Sundaram S, Luo S, Khrebtukova I, Barrette TR, Grasso C, Yu J, et al. 2009. Chimeric transcript discovery by paired-end transcriptome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 12353–12358.
- McClintock B. 1941. The Stability of Broken Ends of Chromosomes in *Zea Mays*. *Genetics* **26**: 234–282.
- McKerlie M, Walker JR, Mitchell TRH, Wilson FR, Zhu XD. 2013. Phosphorylated (pT371)TRF1 is recruited to sites of DNA damage to facilitate homologous recombination and checkpoint activation. *Nucleic Acids Res* **41**: 10268–10282.
- Mennie AK, Moser BA, Nakamura TM. 2018. LARP7-like protein Pof8 regulates telomerase assembly and poly(A)<sup>+</sup>TERRA expression in fission yeast. *Nat Commun* **9**: 586.
- Miller KM, Cooper JP. 2003. The telomere protein Taz1 is required to prevent and repair genomic DNA breaks. *Mol Cell* **11**: 303–313.
- Miller KM, Ferreira MG, Cooper JP. 2005. Taz1, Rap1 and Rif1 act both interdependently and independently to maintain telomeres. *EMBO J* **24**: 3128–3135.
- Miller KM, Rog O, Cooper JP. 2006. Semi-conservative DNA replication through telomeres requires Taz1. *Nature* **440**: 824–828.
- Miyake T, Hu YF, Yu DS, Li R. 2000. A functional comparison of BRCA1 C-terminal domains in transcription activation and chromatin remodeling. *J Biol Chem* **275**: 40169–40173.
- Miyoshi T, Kanoh J, Saito M, Ishikawa F. 2008. Fission Yeast Pot1-Tpp1 Protects Telomeres and Regulates Telomere Length. *Science* **320**: 1341–1344.
- Mizuguchi T, Barrowman J, Grewal SIS. 2015. Chromosome domain architecture and dynamic organization of the fission yeast genome. *FEBS Lett* **589**: 2975–2986.
- Moser BA, Chang Y-T, Kosti J, Nakamura TM. 2011. Tel1<sup>ATM</sup> and Rad3<sup>ATR</sup> kinases promote Ccq1-Est1 interaction to maintain telomeres in fission yeast. *Nat Struct Mol Biol* **18**: 1408–1413.
- Moser BA, Chang YT, Nakamura TM. 2014. Telomere regulation during the cell cycle in fission yeast. *Methods Mol Biol* **1170**: 411–424.
- Moser BA, Subramanian L, Khair L, Chang YT, Nakamura TM. 2009. Fission yeast Tel1<sup>ATM</sup> and Rad3<sup>ATR</sup> promote telomere protection and telomerase recruitment. *PLoS Genet* **5**: 1–11.
- Myung K, Chen C, Kolodner RD. 2001. Multiple pathways cooperate in the suppression of genome instability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **411**: 1073–1076.
- Myung K, Kolodner RD. 2003. Induction of genome instability by DNA damage in

- Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)* **2**: 243–258.
- Naito T, Matsuura A, Ishikawa F. 1998. Circular chromosome formation in a fission yeast mutant defective in two ATM homologues. *Nat Genet* **20**: 203–206.
- Nakamura TM. 1998. Two Modes of Survival of Fission Yeast Without Telomerase. *Science* **282**: 493–496.
- Okita AK, Zafar F, Su J, Weerasekara D, Kajitani T, Takahashi TS, Kimura H, Murakami Y, Masukata H, Nakagawa T. 2019. Heterochromatin suppresses gross chromosomal rearrangements at centromeres by repressing Tfs1/TFIIS-dependent transcription. *Commun Biol* **2**: 17.
- Páez-Moscoso DJ, Pan L, Sigauke RF, Schroeder MR, Tang W, Baumann P. 2018. Pof8 is a La-related protein and a constitutive component of telomerase in fission yeast. *Nat Commun* **9**: 1–11.
- Palm W, de Lange T. 2008. How Shelterin Protects Mammalian Telomeres. *Annu Rev Genet* **42**: 301–334.
- Pennaneach V, Kolodner RD. 2004. Recombination and the Tel1 and Mec1 checkpoints differentially effect genome rearrangements driven by telomere dysfunction in yeast. *Nat Genet* **36**: 612–617.
- Pinter SF, Aubert SD, Zakian VA. 2008. The Schizosaccharomyces pombe Pfh1p DNA Helicase Is Essential for the Maintenance of Nuclear and Mitochondrial DNA. *Mol Cell Biol* **28**: 6594–6608.
- Putnam CD, Kolodner RD. 2010. Determination of gross chromosomal rearrangement rates. *Cold Spring Harb Protoc* **9**.
- Sadaie M, Naito T, Ishikawa F. 2003. Stable inheritance of telomere chromatin structure and function in the absence of telomeric repeats. *Genes Dev* **17**: 2271–2282.
- Sambrook J, Fritsch F, Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schober H, Ferreira H, Kalck V, Gehlen LR, Gasser SM. 2009. Yeast telomerase and the SUN domain protein Mps3 anchor telomeres and repress subtelomeric recombination. *Genes Dev* **23**: 928–938.
- Schulz VP, Zakian VA. 1994. The Saccharomyces PIF1 DNA helicase inhibits telomere elongation and de novo telomere formation. *Cell* **76**: 145–155.
- Sfeir A, Kosiyatrakul ST, Hockemeyer D, MacRae SL, Karlseder J, Schildkraut CL, de Lange T. 2009. Mammalian Telomeres Resemble Fragile Sites and Require TRF1 for Efficient Replication. *Cell* **138**: 90–103.
- Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Kurashina K, Hatanaka H, et al. 2007. Identification of the transforming

- EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* **448**: 561–566.
- Stratton MR, Campbell PJ, Andrew F P. 2009. The cancer genome. *Nature* **458**: 719–724.
- Sunder S, Greeson-Lott NT, Runge KW, Sanders SL. 2012. A new method to efficiently induce a site-specific double-strand break in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **29**: 275–291.
- Tadeo X, Wang J, Kallgren SP, Liu J, Reddy BD, Qiao F, Jia S. 2013. Elimination of shelterin components bypasses RNAi for pericentric heterochromatin assembly. *Genes Dev* **27**: 2489–2499.
- Takikawa M, Tarumoto Y, Ishikawa F. 2016. Fission yeast Stn1 is crucial for semi-conservative replication at telomeres and subtelomeres. *Nucleic Acids Res* **45**: 1255–1269.
- Tanaka A, Tanizawa H, Sriswasdi S, Iwasaki O, Chatterjee AG, Speicher DW, Levin HL, Noguchi E, Noma KI. 2012. Epigenetic Regulation of Condensin-Mediated Genome Organization during the Cell Cycle and upon DNA Damage through Histone H3 Lysine 56 Acetylation. *Mol Cell* **48**: 532–546.
- Tanizawa H, Iwasaki O, Tanaka A, Capizzi JR, Wickramasinghe P, Lee M, Fu Z, Noma KI. 2010. Mapping of long-range associations throughout the fission yeast genome reveals global genome organization linked to transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res* **38**: 8164–8177.
- Tazumi A, Fukuura M, Nakato R, Kishimoto A, Takenaka T, Ogawa S, Song JH, Takahashi TS, Nakagawa T, Shirahige K, et al. 2012. Telomere-binding protein Taz1 controls global replication timing through its localization near late replication origins in fission yeast. *Genes Dev* **26**: 2050–2062.
- Tomita K, Matsuura A, Caspari T, Carr AM, Akamatsu Y, Iwasaki H, Mizuno K, Ohta K, Uritani M, Ushimaru T, et al. 2003. Competition between the Rad50 Complex and the Ku Heterodimer Reveals a Role for Exo1 in Processing Double-Strand Break. *Mol Cell Biol* **23**: 5186–5197.
- Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun X-W, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R, et al. 2005. Recurrent Fusion of *TMPRSS2* and ETS Transcription Factor Genes in Prostate Cancer. *Science* **310**: 644–648.
- Watson JD. 1972. Origin of Concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* **239**: 197–201.
- Zierhut C, Diffley JFX. 2008. Break dosage, cell cycle stage and DNA replication influence DNA double strand break response. *EMBO J* **27**: 1875–1885.

## 謝辞

本研究の機会を与えてくださり、本研究を進めるにあたり、的確な助言によって研究の適切な方向性を示してくださるとともに、お忙しい中辛抱強く私の研究指導を続けてくださった指導教員の石川冬木教授に心より感謝いたします。

酵母株をご供与くださったSusan Forsburg博士、平岡泰博士、Matthew Whitby博士に感謝いたします。DSB誘導実験を立ち上げる際に援助して下さったKurt Runge博士に感謝いたします。研究についていつも気を配ってくださり、私の初歩的な質問にも丁寧にお答えいただいた樽本雄介博士に感謝いたします。実験技術を一から教えてくださるとともに、相談に乗ってくださり、激励して下さいました田代三喜博士に感謝いたします。研究室を離れた後、多くの実験を一手に引き受けてくださった山本唯央氏に感謝いたします。また、研究室における煩雑な事務処理を引き受けてくださった秘書の白淵愛依子氏、山崎恵莉子氏、片山安希子氏、前川文氏、福村姿子氏、林奈緒美氏、津田貴子氏、平田陽子氏に、共通試薬等の研究補助を行ってくださった田村美樹氏、渡邊雄三氏にお礼申し上げます。そして、研究内容の議論から日常的な研究室生活までいつもサポートしてくださり、楽しく過ごせる環境を提供して下さった石川研究室の皆様に謹んでお礼申し上げます。最後に、これまでの学生生活の間、辛抱強く経済的援助を続けてくれると共に、優しく見守ってくれた父母に、心から感謝します。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Hiroyuki Irie, Io Yamamoto, Yusuke Tarumoto, Sanki Tashiro, Kurt W. Runge, and Fuyuki Ishikawa

Telomere-binding proteins Taz1 and Rap1 regulate DSB repair and suppress gross chromosomal rearrangements in fission yeast

PLOS Genetics, 15, e1008335, 2019