

リボソーム DNA およびサブテロメアにおける
繰り返し配列維持に係る分裂酵母 Stn1 の機能

山本唯央

目次

目次	2
略語	4
要旨	5
第一章 序論	7
1-1 複製フォークの阻害と染色体構造	8
1-2 複製困難領域としての rDNA 領域	9
1-3 複製困難領域としてのテロメア・サブテロメア領域	10
1-4 テロメア結合タンパク質	12
1-5 染色体の環状化	13
1-6 CST 複合体	14
1-7 本研究の目的	15
第二章 材料と方法	17
2-1 酵母	18
2-2 試薬・酵素・アイソトープ等	19
2-3 大腸菌、分裂酵母の培地と操作	19
2-4 分裂酵母ゲノム DNA の調製	19
2-5 ChIP (Chromatin Immunoprecipitation) 法	20
2-6 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)	21
2-7 サザンハイブリダイゼーション	21
2-8 rDNA とサブテロメアの定量	22
2-9 Yeast two-hybrid assay	22
第三章 結果	23
3-1 <i>stn1</i> ⁺ 高温感受性株は HU に対し感受性を持つ	24

3-2	<i>stn1-1</i> はテロメア繰り返し配列およびサブテロメア配列の有無に関わらず HU 感受性を示す	24
3-3	<i>stn1-1</i> では rDNA への複製フォークの局在が減少する	28
3-4	<i>stn1-1</i> では rDNA リピートが不安定化する	30
3-5	<i>stn1-1</i> での rDNA リピートの不安定化は RFB 活性に由来する	31
3-6	<i>stn1-1</i> では Rad52 および γ H2A が rDNA 領域へ蓄積する	33
3-7	<i>stn1-1</i> では相同組換えが生存に必要である	37
3-8	<i>stn1-1</i> ではサブテロメアが不安定化し、 <i>swi1</i> Δ によりさらに不安定化する	
	37	
3-9	<i>stn1-1</i> のサブテロメアにおける不安定化および γ H2A の蓄積は Reb1 に依存する	39
3-10	環状化株の <i>stn1-1</i> においても γ H2A が rDNA に蓄積する	42
3-11	<i>stn1</i> Δ <i>trt1</i> Δ では三番染色体の構造が変化する	44
第四章	考察	47
4-1	複製フォークと Stn1	48
4-2	Reb1 のサブテロメアにおける機能	50
4-3	環状化株における Stn1 の機能	51
	参考文献	53
	謝辞	61

略語

bp; base pairs
BIR; break-induced replication
ChIP; chromatin immunoprecipitation
DIG; Digoxigenin
DNA; deoxyribonucleic acid
DSB; double strand break
EDTA; ethylenediaminetetraacetic acid
EtBr; ethidium bromide
HR; homologous recombination
HU; hydroxyurea
PFGE; pulsed-field gel electrophoresis
PCR; polymerase chain reaction
PMSF; phenylmethylsulfonyl fluoride
rDNA; ribosomal DNA
RFB; replication fork barrier
RNA; ribonucleic acid
SDS; sodium dodecylsulfate
S.E.M.; standard error of the mean
SSA; single-strand annealing
TBE; Tris-boric acid-EDTA
TE; Tris-EDTA
WT; wild type strain

要旨

真核生物の線状染色体末端には、テロメアと呼ばれるクロマチン構造体が存在する。テロメアには通常の塩基対対合をした二本鎖 DNA からなる領域と、数十～数百塩基にわたる最末端一本鎖 DNA からなる領域 (G テイル) が存在する。この G テイルに結合する因子として、ほ乳類において CST 複合体 (Ctc1-Stn1-Ten1) が同定されたが、分裂酵母においても Stn1-Ten1 が複合体を形成しテロメアの保護を行うことが知られている。加えて、分裂酵母 *stn1* 温度感受性株 *stn1-1* では、制限温度においてサブテロメアにおける複製が停止しテロメアが消失することから、Stn1 の新たな機能としてサブテロメアにおける複製への寄与が報告されていた (Takikawa M. *et al.*, *Nucl Acids Res.* 2017)。本研究ではサブテロメアと同様に複製が困難な領域として知られ、リピート構造を有する rDNA に着目し、分裂酵母 Stn1 の rDNA 領域における機能を検討した。

stn1-1 は、非制限温度下であっても複製阻害剤である Hydroxyurea (HU) に対し感受性を示した。テロメレース触媒サブユニット *trt1*⁺ を欠損し染色体が環状化してテロメア配列を失った株や、サブテロメア領域を欠失させた株においても、*stn1-1* の HU 感受性は見られたことから、*stn1-1* の HU 感受性はテロメア・サブテロメア以外の未同定のゲノム領域が関与することが示された。また、三番染色体の両端に存在する rDNA について、*stn1-1* では世代を経るにつれ、コピー数の増幅が観察された。さらに、*stn1-1* では rDNA 領域に相同組換え因子である Rad52 と、DNA 二重鎖切断マーカであるリン酸化ヒストン H2A (γ H2A) が蓄積していた。rDNA 上には RFB (Replication fork barrier) が複製フォークを停止させるが、RFB 機能に必要な *reb1*⁺ 遺伝子を欠損させ RFB 活性を不活化させると、*stn1-1* における rDNA のコピー数の増加や γ H2A の蓄積が抑制された。以上の結果より、*stn1-1* では rDNA 反復配列内部において RFB 依存的に DNA 損傷が蓄積しやすく、DNA 相同組換えが促進されることが明らかとなった。一方、*stn1-1* ではサブテロメアについても、 γ H2A の蓄積やコピー数の増幅が見られ、rDNA と同様に *reb1*⁺ 遺伝子を欠損させることで抑制された。したがって、Stn1 は rDNA とサブテロメアの双方の安定性維持に寄与し、そのどちらでも Reb1 が関与していることが示唆された。

Stn1 はテロメア結合因子であり、*stn1*⁺ を欠損させた株においては染色体が環状化することが知られている。染色体の環状化によってテロメア繰り返し配列を失った株においても、Stn1 が線状染色体の場合と同様の機能を果たすかどうかは不明である。環状化株である *trt1* Δ から *stn1*⁺ を欠損させた *trt1* Δ *stn1* Δ においては三番染色体の末端に存在する rDNA の構造が変化することが示された。以上から、Stn1 はテロメア結合因子であるが、

テロメア繰り返し配列を保持しない株においても rDNA の安定性維持に寄与していることが新たに示唆された。したがって、Stn1 はテロメア/サブテロメアと rDNA という両領域について共通して機能することが本研究により明らかとなった。

第一章 序論

1-1 複製フォークの阻害と染色体構造

生物の遺伝情報であるゲノム DNA は正確に複製される必要があるため、複製フォークの進行が正しく制御されることは重要である。しかしながら、染色体上に生じる種々の構造によってしばしば複製フォークの進行が阻害される (図 1-1)。例えば、DNA 結合タンパク質と DNA との結合や、グアニン四重鎖構造など DNA がとる二次構造などが複製フォークの進行を阻害すると知られている (総説として Ishikawa, 2013)。複製を阻害するような構造を含む染色体領域は、複製困難領域 (Hard to replicate sites) として知られる。さらに複製フォークが崩壊した場合、DNA 二重鎖切断 (Double strand break, 以下 DSB) が引き起こされ、特に繰り返し配列ではコピー数の変動といった遺伝的不安定性がもたらされる (Zeman & Cimprich, 2014)。このため、複製困難領域での複製とゲノム安定性を維持する機構があらゆる生物で保存されていると考えられる。

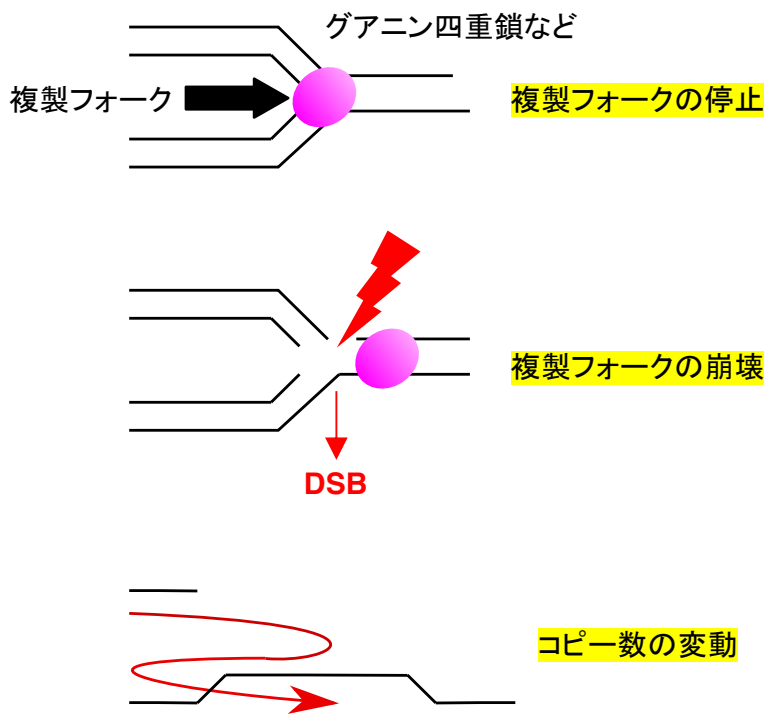


図 1-1. 複製フォークの進行が阻害された場合の模式図

停止した複製フォークが修復されない場合、複製フォークの崩壊が起き、DSB が生じる。リピート配列などの場合、DSB を修復する際に相同組換えが起き、コピー数の変動がしばしば起こる。

1-2 複製困難領域としての rDNA 領域

複製困難領域と知られる中でも、リボソーム RNA をコードするリボソーム DNA (以下 rDNA) においては、プログラムされた複製フォークの進行阻害が引き起こされることが知られている。真核生物の rDNA 領域は、多コピーの直列繰り返し配列となっている。一つのユニットには、複製開始点およびリボソーム RNA のコード領域が含まれる。非コード領域には Replication fork barrier (RFB) が存在し、複製フォークの進行を阻止することで、転写装置と複製フォークとの衝突を防ぐ (Brewer & Fangman, 1988; Sanchez, Kim, & Huberman, 1998)。出芽酵母における rDNA 領域では、Ter1/2 配列という特殊な配列に Fob1 が結合することで RFB を形成し、複製フォークの進行が阻害される (Kobayashi & Horiuchi, 1996)。分裂酵母においても rDNA の構造は保存されており、100~150 コピーが三番染色体の染色体両腕末端付近に存在する (図 1-1)。分裂酵母の rDNA ユニットにも RFB 活性は存在し、Ter1 配列に Sap1 が、Ter2/3 配列に Reb1 が結合することで、RFB 活性を持つことが知られている (Krings & Bastia, 2005; Sanchez-Gorostiaga, Lopez-Estrano, Krimer, Schwartzman, & Hernandez, 2004)。

rDNA のコピー数は変動しやすく、例えば、野生型出芽酵母から単一細胞由来のサブクローンを複数単離し培養した場合においても、サブクローン間でコピー数が異なる (Rustchenko, Curran, & Sherman, 1993)。また、出芽酵母 *FOBI* を欠損させた株においては、rDNA のコピー数が安定に維持されること、また、相同組換えに重要な因子である *rad52⁺* を欠損させた場合でも同様にコピー数の変動が生じないことから、rDNA コピー数の変動は RFB で生じた複製フォークの停止・崩壊によって DSB が生じ、引き続いて相同組換えが起こることが原因と考えられている (Kobayashi, Horiuchi, Tongaonkar, Vu, & Nomura, 2004)。出芽酵母においては rDNA コピー数が減少した細胞で、DNA 損傷を引き起こす薬剤に対し感受性が上昇することが知られている (Ide, Miyazaki, Maki, & Kobayashi, 2010)。また、ある種のがん化した細胞では rDNA のコピー数が減少していることが知られている (Udugama et al., 2018)。rDNA のコピー数が変動すると、rRNA の転写量が変わり、ゲノム全体の転写や DNA 損傷応答に影響を与える (Diesch, Hannan, & Sanij, 2014)。また、出芽酵母やカビの一種などにおいては、人為的にコピー数を増減させた株を作製し培養を続けると、本来のコピー数に収束することが知られている (Kobayashi, Nomura, & Horiuchi, 2001; Rodland & Russell, 1982)。このように、rDNA のコピー数は容易に変化してしまうため、コピー数を安定に保つような仕組みが生物に存在すると考えられる。

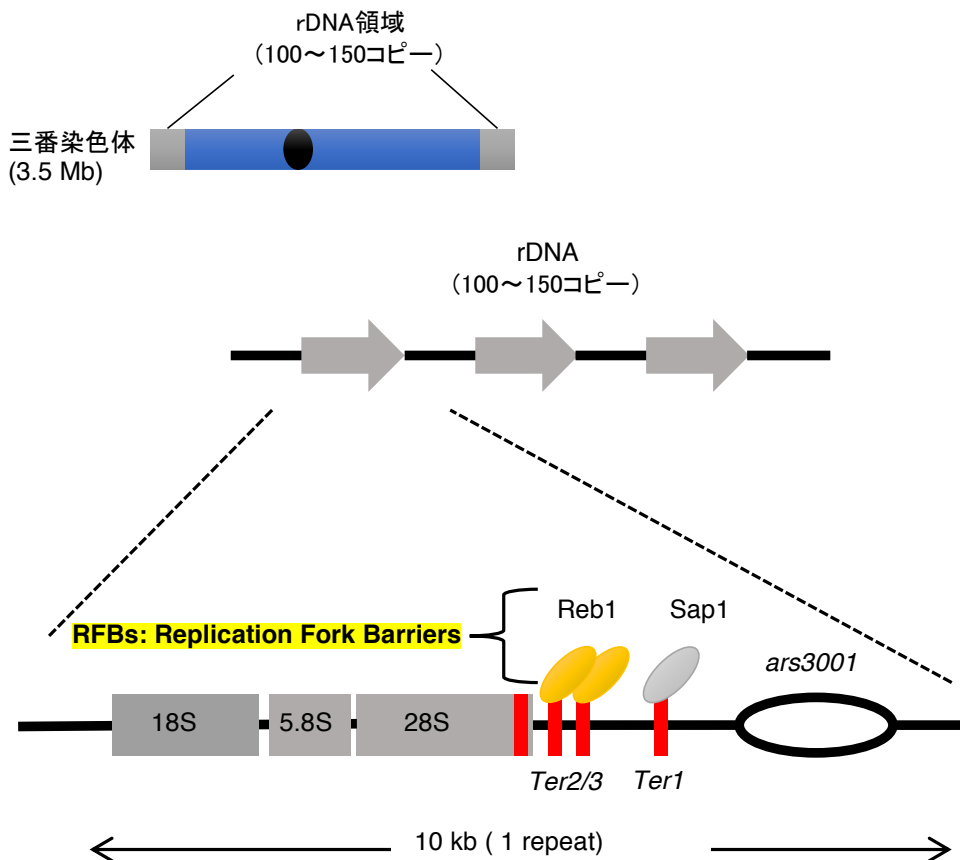


図 1-2 分裂酵母におけるリボソーム DNA の構造

分裂酵母においてリボソーム DNA は三番染色体両腕の末端に存在し、合わせて 100~150 コピーとされる。1 コピーあたり 10 kb 程度であり、rRNA をコードする領域 (18S, 5.8S, 28S)、Ter 配列と Reb1, Sap1 からなる RFB、複製開始点である *ars3001* が含まれる。

1-3 複製困難領域としてのテロメア・サブテロメア領域

rDNA 領域と同様に、繰り返し配列を持つ代表的な領域としてテロメアが知られる。テロメアは線状染色体末端に存在する特殊な領域であり、繰り返し配列とそれに結合する種々のテロメアタンパク質で構成されている。哺乳類のテロメア DNA は 5'-TTAGGG-3'の繰り返し配列からなるグアニンに富んだ G 鎖と、その相補鎖である C 鎖からなる。この繰り返し配列をテロメア繰り返し配列と呼ぶ。分裂酵母のテロメア繰り返し配列については哺乳類などと比べ規則的ではないものの、GGTTACA というコンセンサス配列を持つ (N. F. Sugawara, 1988)。TTAGGG の繰り返し配列は、逆転写酵素で

あるテロメレースによって、テロメア末端に付加される。空間的に隣接するテロメア配列に含まれるグアニンどうしはフーグスティーン (Hoogsteen) 結合を介して平面上で結合し、さらに4つのグアニンによって構成された平面が積み重なることにより、グアニン四重鎖構造を形成しうることが知られている (Sen & Gilbert, 1998)。グアニン四重鎖構造をほどくようなヘリケースなどの分子機構が欠損している場合、複製フォークが停止するため、グアニン四重鎖構造は複製フォークを阻害すると考えられる (Paeschke, Capra, & Zakian, 2011)。また、テロメアの二本鎖領域に結合する TRF1/2 タンパク質を過剰発現すると複製フォークの進行が阻害される (Ohki & Ishikawa, 2004)。以上のように、テロメア末端では種々の構造から、複製が困難な領域と考えられている。

一方、テロメア末端に隣接する領域をサブテロメア領域と呼ぶ。ヒトや分裂酵母のサブテロメア領域は、モザイク状に特定の配列が繰り返す構造を持つため、サブテロメア間やサブテロメア内での DNA 相同組換えが頻繁に起こることが確認されている (Linardopoulou et al., 2005; Oizumi et al., 2021)。分裂酵母において、テロメア末端から 100 kb 程度のサブテロメア領域は、2つの区画に分けられる (図 1-3A; Tashiro et al., 2016)。セントロメア側の 50 kb では、互いに共通の配列は持たないものの、knob と呼ばれる構造を持ち、ヒストン修飾によらずに極度に凝縮した構造をとる。一方、テロメア末端に隣接した領域は *SH* (subtelomeric homologous) 領域と呼ばれ、ヘテロクロマチン構造をとる。*SH* 領域は一番および二番染色体の両腕と、株によっては三番染色体の左腕に位置し、それぞれの *SH* 領域に存在する *SH* 配列は互いに高い相同性を示す (図 1-3B)。*SH* 配列の中でも末端に近い領域においては、繰り返し配列が多くモザイク状に存在し、DNA 相同組換えが起きやすい (Oizumi et al., 2021)。サブテロメアにおいても、原因となる構造は不明であるものの、複製フォークが停止することが観察されているため (Ivessa, Zhou, Schulz, Monson, & Zakian, 2002)、サブテロメアにおける DNA 相同組換えは複製フォークの修復が原因であると考えられている。

タンパク質として CST 複合体が存在する (図 1-4)。CST 複合体は、Ctc1 (出芽酵母においては Cdc13) -Stn1-Ten1 からなる一本鎖 DNA 結合能を持つ複合体であり、テロメアにおいては G テイルに結合する (Garvik, Carson, & Hartwell, 1995; Grandin, Damon, & Charbonneau, 2001; Grandin, Reed, & Charbonneau, 1997; Miyake et al., 2009)。分裂酵母においては、Cdc13/Ctc1 のホモログは未だ見つかっていないものの、Stn1-Ten1 複合体は保存されている (Martín, Du, Rozenzhak, & Russell, 2007)。

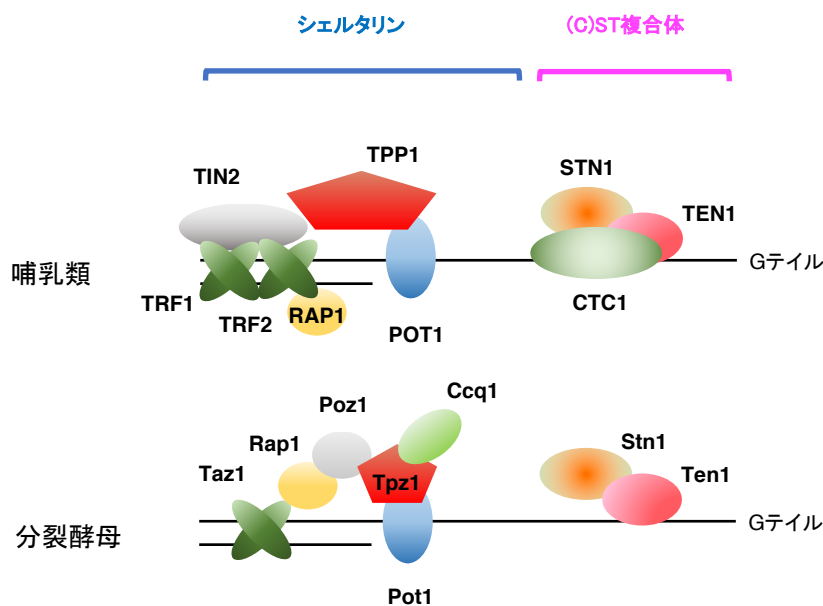


図 1-4 哺乳類および分裂酵母のシェルタリンおよび CST 複合体

シェルタリンは6つの因子からなる複合体であり、二本鎖と一本鎖テロメア DNA 領域を立体的に結び付ける構造をとる。CST 複合体は Cdc13/Ctc1-Stn1-Ten1 で構成され、G テイルに結合する。

1-5 染色体の環状化

哺乳類細胞などでは、シェルタリン因子の欠損によりテロメア末端が維持できない場合、異なる染色体の末端同士を介した末端融合が起きる。その結果、二動原体染色体が生じ、染色体の分配異常が引き起こされるため、細胞は生存することができない。しかし、分裂酵母においては、三本の染色体が自己環状化した染色体を持つ「環状化株」が生じることが知られている (Naito, Matsuura, & Ishikawa, 1998)。一本鎖 DNA 領域に結合するシェルタリン因子を欠損させた場合は、両腕の SH 配列に存在する相同配列を利用した SSA (single-strand annealing) により環状化する (Wang & Baumann, 2008)。SSA と

は、DSB 末端がエクソヌクレアーゼによって消化された結果生じる一本鎖 DNA 同士が、相同配列を介して対合する DNA 修復経路の一つである。同様に、一本鎖に結合する因子である *stn1*⁺あるいは *ten1*⁺を欠損させた場合にも、環状染色体が生じる (Martín et al., 2007)。また、テロメレースの触媒サブユニットである *trt1*⁺を欠損させ長期培養を行うと、テロメアが徐々に短小化し、その結果、環状化染色体を形成する (Nakamura, Cooper, & Cech, 1998)。Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)により染色体 DNA を分離することができるが、環状染色体をもつバクテリアにおける研究から、環状染色体 DNA は PFGE のウェルに停留し、泳動されないことが知られている (Dingwall, Shapiro, & Ely, 1990)。同様に、分裂酵母において発見された環状染色体 DNA は、制限酵素処理などの線状化をしない限り、PFGE において泳動されず解析が困難である。環状染色体を有する *trt1Δ* においても同様に、PFGE による分離が難しく、線状染色体で見られるようなシグナルは観察されない。しかし、放射線照射によって DSB をランダムに導入することで染色体 DNA を線状化すると、一番および二番染色体はウェルから泳動しシグナルが観察されるようになる。一方で、三番染色体についてはシグナルが見られないままである (Jain, Hebden, Nakamura, Miller, & Cooper, 2010)。このことから、*trt1Δ*の一番および二番染色体は環状化していることが明らかであるが、三番染色体は環状化していない可能性が残っている。三番染色体の末端には rDNA リピートが存在するため、rDNA を介した相同組換えなどで末端が維持されていると考えられているが、詳細な機構は明らかになっていない。

1-6 CST 複合体

テロメア末端の G 鎖はテロメレースによって伸長されるが、伸長された一本鎖 G 鎖 DNA と対合してテロメア二本鎖 DNA をつくる C 鎖については、ラギング鎖合成を担う DNA ポリメラーゼ α /プライメラーゼ複合体によって、C 鎖の埋め込み反応が引き起こされる (図 1-5)。CST 複合体は、STN1 と DNA ポリメラーゼ α との結合を介して、DNA ポリメラーゼ α /プライメラーゼ複合体をテロメアにリクルートし、C 鎖の埋め込み反応を促進する (Grossi, Puglisi, Dmitriev, Lopes, & Shore, 2004; Qi & Zakian, 2000)。加えて、分裂酵母の Stn1 はテロメア末端の複製だけでなく、サブテロメアの半保存的複製にも重要である (Matmati et al., 2018; Takikawa, Tarumoto, & Ishikawa, 2017)。本研究室の滝川雅大博士により取得された *stn1*⁺の高温感受性株の *stn1-1* 変異株では、制限温度で培養を続けると、サブテロメアにおける複製中間体が消失し、さらにはテロメア末端およびサブテロメアの一部も消失する (Takikawa et al., 2017)。 *stn1*⁺の異なる変異株、*stn1-226*に

においても同様の表現型が見られるが、DNA ポリメラーゼ α の触媒サブユニットである Pol1 を過剰発現することで、テロメア末端の消失が部分的に抑制されることから、Stn1 は DNA ポリメラーゼ α をリクルートすることでサブテロメアおよびテロメアでの複製フォークの進行を促進していると考えられる (Matmati et al., 2018)。

DNA ポリメラーゼ α はゲノム DNA 全般の複製に機能することから、CST 複合体もテロメア・サブテロメアに限らずゲノム全体の複製に必要な可能性がある。実際に、哺乳類の CST 複合体は、ゲノム上の GC に富んだ領域において停止した複製フォークの再開反応に機能することが示されている (Chastain et al., 2016; Stewart et al., 2012)。また、Ctc1 や Stn1 の点突然変異が原因とされるヒト遺伝病の一つにコートプラス (Coats plus) 症候群があるが、その患者で見られる *CTCI* 変異を導入した細胞では、複製阻害剤である Hydroxyurea (HU) 存在下で染色体の断片化が頻繁に見られた (Wang & Chai, 2018)。以上から、CST 複合体はゲノム上のとくに複製困難とされる領域で、複製を助ける役目を担うことが示唆されている。

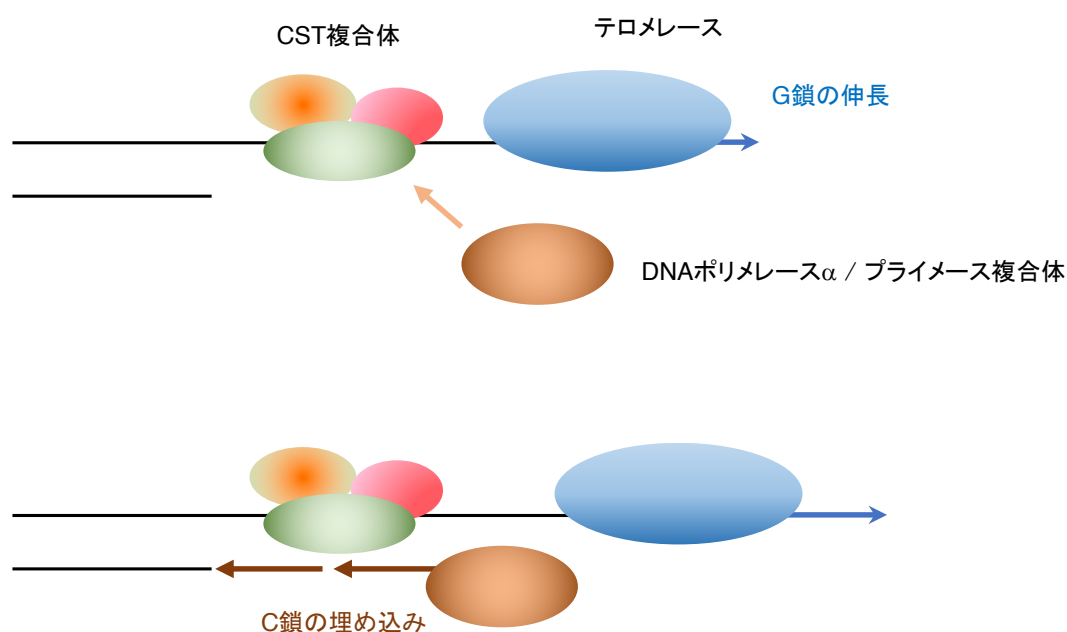


図 1-5 テロメア末端の複製

G 鎖の伸長は逆転写酵素であるテロメラーゼにより行われるが、C 鎖については CST 複合体によって呼び込まれた DNA ポリメラーゼ α 複合体による埋め込み反応で合成される。

1-7 本研究の目的

テロメア結合因子として同定された CST 複合体は、哺乳類と分裂酵母で保存された構造を持つため、その機能も保存されていることが予想される。しかしながら、分裂酵母 *Stn1-Ten1* 複合体がテロメアとサブテロメア以外のゲノム領域で機能するという報告はこれまでにない。また、前述のように、繰り返し配列 DNA からなる複製困難な領域はしばしば DNA 相同組換えを起こしやすく、rDNA などの多コピー存在する領域ではコピー数が増減する。CST 複合体がそのような領域での複製に寄与していることは明らかであるが、CST 複合体の機能欠損によってコピー数の変動や組換えの亢進といった表現型が出るかどうかは調べられていない。先行研究で単離された *stn1-1* 変異株では、制限温度下で培養したとき、サブテロメアに加え、rDNA での複製も部分的に損なわれることが示されている (Takikawa et al., 2017)。これらの結果をもとに、本研究では、分裂酵母 *Stn1* が rDNA やサブテロメアの安定性に寄与するかどうかを明らかにすることを目的とした。

また、分裂酵母では rDNA が三番染色体のテロメア末端に隣接するため、rDNA と一番および二番染色体のサブテロメアとは、テロメア末端からの距離という点において等しい。さらに、いずれの領域もリピート配列を含む複製困難領域とされているため、サブテロメアと rDNA での複製に共通する機構があることが予測されるが、これまで明らかになっていない。加えて、*trt1Δ*で見られるように、テロメア配列を失った株であっても、rDNA が染色体末端に存在することにより末端が保護されることが知られている (Jain et al., 2010)。このことから、rDNA にはテロメア配列は存在しないものの、テロメア結合因子が rDNA でも機能しうることが考えられる。したがって、分裂酵母 *Stn1* の rDNA への寄与を明らかにすることで、さらにサブテロメア・テロメアと rDNA との共通性についての示唆を得ることを目的とした。

第二章 材料と方法

2-1 酵母

本研究で用いた分裂酵母株とその遺伝型を以下に示す。

TN243	<i>h90 leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 trt1::LEU2</i>
JK317	<i>h- leu1-32 ura4-D18</i>
TM1520	<i>h+ leu1-32 ura4-D18 mus81::LEU2</i>
TM1523	<i>h+ leu1-32 ura4-D18 swi1::LEU2</i>
TM2241	<i>h- leu1-32 ura4-D18 pol1-12myc::ura4+</i>
TM2782	<i>h-? leu1-32 ura4-D18 rad51::HygR</i>
MT3982	<i>h- leu1-32 ura4-D18 stn1-1-3flag::ura4+</i>
MT4512	<i>h90 leu1-32 ura4-D18 stn1-1-3flag;;LEU2</i>
MT4515	<i>h- leu1-32 ura4-D18 Rad52-12myc::ura4+</i>
MT4516	<i>h- leu1-32 ura4-D18 stn1-1-3flag::LEU2 Rad52-12myc::ura4+</i>
MT4664	<i>h90 or h- leu1-32 ura4-D18 stn1-1-3flag::LEU2 pol1-12myc::ura4+</i>
IY4885	<i>h90 leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 trt1::LEU2 stn1-1-3flag::ura4+</i>
IY4886. 4897-8	<i>h- leu1-32 ura4-D18 stn1-1-3flag::ura4+ (#1-3. respectively)</i>
IY4887. 4896	<i>h- leu1-32 ura4-D18 stn1-1-3flag::ura4+ reb1::kanr (#1-2)</i>
IY4888	<i>h- leu1-32 ura4-D18 reb1::kanr</i>
IY4889. 4906	<i>h- leu1-32 ura4-D18 Stn1-3flag::ura4+ (#1-2)</i>
IY4890. 4899	<i>h-? leu1-32 ura4-D18 stn1-1-3flag::LEU2 rad51::HygR (#1-2)</i>
IY4891. 4900	<i>h- leu1-32 ura4-D18 stn1-1-3flag::ura4+ mus81::LEU2 (#1-2)</i>
IY4892. 4901	<i>h- leu1-32 ura4-D18 stn1-1-3flag::ura4+ swi1::LEU2 (#1-2)</i>
IY4893-4	<i>h90 leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 trt1::LEU2 stn1::Hygr (A. B)</i>
IY4895	<i>h- ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 his7-366 SH1L::ura4+ SH1R::his7+ SH2L::his7+ SH2R::his7+ SH3L::ura4+ trt1::kanr stn1::Hygr</i>
LN4918	<i>h- ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 his7-366 SH1L::ura4+ SH1R::his7+ SH2L::his7+ SH2R::his7+ SH3L::ura4+ stn1-1-3flag::LEU2</i>

以下、東京大学 加納研究室より供与	
JP1225	<i>h- ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 his7-366</i>
ST3479	<i>h- ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 his7-366 SH1L::ura4+</i> <i>SH1R::his7+</i> <i>SH2L::his7+ SH2R::his7+ SH3L::ura4+</i>
JP3697	<i>h- ade6-M216 leu1-32 ura4-D18 his7-366 SH1L::ura4+</i> <i>SH1R::his7+</i> <i>SH2L::his7+ SH2R::his7+ SH3L::ura4+ trt1::kanr</i>

2-2 試薬・酵素・アイソトープ等

本研究では記載のない限り、試薬類はナカライテスク社、酵素類はタカラバイオ社、培地類は BD 社、アイソトープはパーキンエルマー社の製品を用いた。

2-3 大腸菌、分裂酵母の培地と操作

大腸菌培地の組成、及び基本操作は Sambrook らにならった (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989)。培地には必要に応じてアンピシリン、カナマイシンを用いた。

分裂酵母培地の組成、及び基本操作は Alfa らにならった (Alfa, Fantes, Hyams, McLeod, & Warbrick, 1993)。培地には必要に応じて Hydroxyurea (SIGMA)を加えた。とくに記載のない限り、YES を使用した。長期に培養する場合、1日に1度継代した。

2-4 分裂酵母ゲノム DNA の調製

液体培養中で対数増殖期にある酵母を回収し、DNA 溶出バッファー (0.1 M Tris-HCl [pH8.0]、0.1 M NaCl、1 mM EDTA [pH 8.0]、1% SDS) に懸濁し、スクリュウキャップ付きチューブに移した。フェノールクロロホルム溶液を等量とガラスビーズ (SIGMA) を加え、ボルテックスミキサーにかけることで細胞を十分に破碎した。TE を適量加え遠心分離した後の上清に対して再度フェノールクロロホルム抽出を行い、続けてエタノール沈殿を行った。ペレットを RNase G.S (和光純薬工業) を含む TE バッファーに溶解し、37°C で RNase 処理をした後、フェノールクロロホルム処理およびエタノール沈殿に供した。TE バッファーもしくは純水に溶解した。

2-5 CHIP (Chromatin Immunoprecipitation) 法

液体培養中で対数増殖期にある酵母に、終濃度 1% のホルマリンを加え、室温で 25 分間固定した。その後、2.5 M のグリシンを全量の 1/10 加えて室温で 5 分間静置した。TBS バッファー (20 mM Tris-Cl pH 7.5, 150 mM NaCl) で 3 回洗浄した。lysis バッファー (50 mM HEPES-KOH [pH7.5], 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.1% sodium deoxycholate, 1 x Complete (Roche), 1 mM PMSF) を加えて懸濁し、ジルコニアビーズを加え、マルチビーズショッカー (安井器械) にて 2,700 rpm で 1 分処理、1 分冷却を 10 回繰り返した。処理後の破砕液を遠心しビーズを除去した後、超音波ホモジナイザー (BRANSON SONIFIER 250) にて Duty cycle 80%、Output control 1.5 によって 15 秒処理ののち遠心 (12,000 rpm, 1 分) を 5 回繰り返した。最後に 15 分遠心し、上清を全細胞抽出液とし、免疫沈降に供した。免疫沈降には Dynabeads protein G (Thermo Fisher) と抗 myc 9B11 抗体 (Cell Signaling)、抗 H2A (phosphor S12) (Abcam) をそれぞれ結合させたものを使用し、4°C で 6 時間以上反応させた。反応後のビーズを洗浄した後のサンプルは 1% SDS を含む TE バッファーで溶出した。溶出したサンプルを 65°C で一晩脱クロスリンクさせた後、Proteinase K (ナカライテスクを加え 37°C で 2 時間反応させた。フェノールクロロホルム抽出した後、RNase 処理をし、QIAquick PCR purification kit (QIAGEN) によって DNA を精製した。得られた DNA は StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) と Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher) を用いて定量した。使用したプライマーを以下に示す。

<i>rfp4</i>	5'-ACGCCGGTGAAATACCACTACCTT-3'
	5'-GAGGATCAGTTCGCGAAGAACTT-3'
<i>gal1</i>	5'-CGATGCTCTATGATTGTTGCTC-3'
	5'-CGCCGAAGATGATAGTCCTC-3'
<i>telomeres (-0.4kb)</i>	5'-ATTAATTGGGTAACGGAGTAACAATATAGA-3'
	5'-CTATTTCTTTATTCAACTTACCGCACTTC-3'
<i>ars3001</i>	5'-CATGTAGCTGAAGCCAGAGTGCAA-3'
	5'-TCTCTCCACCTTCCCATAACATGC-3'
<i>his1</i>	5'-CGAAGACGTGCTTCAGCGA-3'
	5'-TGTCCACCTCGGAATCACTG-3'
<i>subtelo</i>	5'-GACTACAGCCACAAGCTA-3'
	5'-CATTATGACTTCCAATCCCT-3'

28S	5'-AAGGCGAGAAAAGACATCGG-3'
	5'-AAGTCGGCAAATGGATCCG-3'
non-ori	5'-TACGCGACGAACCTTGCATAT-3'
	5'-TTATCAGACCATGGAGCCCATT-3'

2-6 Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)

アガロースプラグ中で染色体DNAを調製する方法は (Miyoshi, Kanoh, & Ishikawa, 2009) に従った。DNAを含むアガロースプラグはMバッファーあるいはCutSmart®バッファーでインキュベートした後にSfiI (TOYOBOあるいはNEB) によって50°C一晩切断した。NotI (TOYOBO)の場合は、Hバッファーでインキュベートした後に37°Cで4時間切断した。切断後のDNAはCHEF-DR-III PFGE apparatus (BioRad) を用いて分離した。アガロースゲルにはSEAKEM Gold (LONZA) を使用し、バッファーは 0.5x TBEを使用した。泳動の条件は以下の通りである ; electrode angle 120°; voltage gradient 6.8 V/cm; initiating switching time 40秒; final switching time 80秒; 泳動時間 15時間; 温度 10°C

泳動後のDNAはAmersham Hybond-XLナイロンメンブレン (GE Healthcare)にアルカリ条件下 (0.4 M NaOH、1 M NaCl) で転写した。転写後のメンブレンはサザンハイブリダイゼーションに供した。

2-7 サザンハイブリダイゼーション

2-4 の手順で酵母から回収したゲノム DNA を、制限酵素 ApaI (Takara) によって 37°C で一晩処理した。切断後の DNA はエタノール沈殿によって精製し、1%アガロースゲルを用いて 0.5x TBE バッファー中で泳動した。泳動後の DNA は Amersham Hybond-XL ナイロンメンブレン (GE Healthcare)にアルカリ条件下 (0.4 M NaOH、1 M NaCl) で転写した。転写後のメンブレンは、2 x SSC (300 mM NaCl、30 mM クエン酸三ナトリウム二水和物) を用いて中和させた後、UV Stratalinker (ストラタジーン) を用いて固定した。テロメア末端を検出する場合 (図 3-2) には、C31 probe: 5'-TGTAACCGTACCCCTGTAACCCCTGTAACC -3'を[γ -³²P]-ATP によって標識したものをプローブとした。TAS 配列を検出する場合 (図 3-10, 3-11) には、pNSU70 プラスミドから ApaI-EcoRI を切り出した断片を[α -³²P]-dCTP によって標識したものをプローブ

とした。rDNA を検出する場合 (図 3-6, 3-7) には、pTN94 プラスミドから HindIII-KpnI、ScaI によって切り出した断片を $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ によって標識したものをプローブとした。また、図 3-13 では、TM693: ATGTAGCTGAAGCCAGAGTG, TM694: TGAATTTTCGTCCATTTTCGGTG を用いて PCR により増幅した産物を DIG によって標識したものをプローブとした。I, L, M および C 断片の検出には (Miyoshi et al., 2008) に記載のプローブを使用した。 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ を標識する際に Random Primed DNA labeling kit (Roche)、DIG を用いた標識には DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche) をそれぞれ使用した。反応後は洗浄の後にイメージングプレート (FUJIFILM) に一晩露光させ、FLA7000 システム (FUJIFILM) を用いてシグナルを検出した。

2-8 rDNA とサブテロメアの定量

2-4 の手順で酵母から回収したゲノム DNA を用いて、StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) と Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher) によって定量した。使用したプライマーを以下に示す。

<i>rDNA</i>	5'-AAGGCGAGAAAAGACATCGG-3'
	5'-AAGTCGGCAAATGGATCCG-3'
<i>ade6</i>	5'-TTAAGCTGAGCTGCCAAGGT-3'
	5'-GGCTGCCTCTACCATCATTC-3'
<i>subtelo (-20 kb)</i>	5'-TCTCGTCACATCGTTTTTGC-3'
	5'-TCAGGGTTCCATTCTCGTTC-3'

2-9 Yeast two-hybrid assay

出芽酵母 Y190 株 (*MATa ura3-52 his3-D200 lys2-801 ade2-101 trp1-901 leu2-3, 112gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL-HIS3 URA3::GAL-lacZ cyh'*) を親株として用いた。Taz1 をコードする配列は pGBKT7 (Gal4 DNA binding domain vector) (Clontech) に、Reb1 (K54 to stop codon) をコードする配列は pGAD-GH にそれぞれクローニングした。 β -gal 法は Clontech のマニュアルに従った。

第三章 結果

3-1 *stn1* 高温感受性株は HU に対し感受性を持つ

序論で述べたように、本研究室の滝川雅大博士により、Stn1 の高温感受性株 *stn1-1* が取得された (Takikawa et al., 2017)。同論文において、*stn1-1* の場合、制限温度である 36°C で 12 時間以上培養すると、テロメア繰り返し配列が消失することが確認されている。また、このとき、二次元ゲル電気泳動により、*stn1-1* ではサブテロメアにおける複製中間体が消失することが示されており、複製が適切に進行しないことにより、テロメアが消失したと予想される。以上の結果より、Stn1 がテロメアおよびサブテロメアでの複製に重要であることが示唆されている。

今回、新たに *stn1-1* の複製を阻害する薬剤として Hydroxyurea (HU) への感受性を調べたところ、非制限温度下であっても HU に対し感受性を示した (図 3-1)。HU はリボヌクレオチド還元酵素を阻害することで細胞内の dNTP を枯渇させる薬剤である。このことから、*stn1-1* は非制限温度下であっても複製に異常があることが示唆される。また、同様に、*stn1-1* と異なるアミノ酸変異を含む変異株 *stn1-226* においても、HU に対し感受性を示すことが知られている (Matmati et al., 2018)。

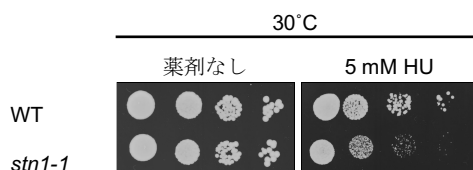


図 3-1 *stn1-1* は HU に対して感受性を示す

表記の株で 10 倍希釈系列を作製し、それぞれのプレートにスポットし、3 日間培養した。いずれも YES プレートを使用した。

3-2 *stn1-1* はテロメア繰り返し配列およびサブテロメア配列の有無に関わらず HU 感受性を示す

これまでの研究により、分裂酵母 Stn1 はテロメア末端に局在することが知られている (Martín et al., 2007)。テロメア以外のゲノム領域においても Stn1 が複製に必要なかどうかを検討するため、テロメア繰り返し配列を持たない環状化株を用いることとした。分裂酵母においては、テロメレーズの触媒サブユニットをコードする *trt1+* を欠損させることでテロメア繰り返し配列が失われテロメアクロマチンの染色体末端保護機能不全の結果、染色体が自己環状化することが知られている (図 3-2A; Nakamura et al., 1998)。環状染色体を持つ *trt1Δ* (図 3-2B) に対し、*stn1+* を *stn1-1-Flag* により置換した。まず、

テロメア繰り返し配列を持たないことを確認するため、分裂酵母テロメア繰り返し配列を検出するオリゴヌクレオチドプローブ (tgtaaccgtaccctgtaacccctgtaacc) (以下、テロメアプローブと呼ぶ) を用いたサザンハイブリダイゼーションを行なった。*stn1⁺ trt1Δ* および *stn1-1-Flag trt1Δ* ではテロメアシグナルが検出されなかったため、これらの株はテロメア DNA を持たないものと考えられた (図 3-2B)。また、Pulsed-field gel electrophoresis (以下 PFGE) では、一番および二番染色体の腕部最末端を認識するプローブ (L, I, M, C) を使用した (図 3-2B)。線状染色体を有する株 (WT, *stn1-1-Flag*) では、L, I, M, C のバンドが検出されたが、*stn1⁺ trt1Δ* および *stn1-1-Flag trt1Δ* では、L, I, M のバンドは検出されず、I+L として予想される分子量のバンドが検出された。以上から、本実験で用いた *stn1⁺ trt1Δ* と *stn1-1 trt1Δ* が環状染色体を持つことが確かめられた (図 3-2B)。次に、環状染色体をもつ *trt1Δ* と、上記のように *trt1Δ* を親株にして作成された環状染色体をもつ *stn1-1-Flag trt1Δ* の HU 感受性の強さを比較検討した。環状染色体を持つ *trt1Δ* では、複製フォークの進行を阻害する薬剤である MMS (methyl methanesulfonate) に対し感受性を示すことが知られている (Jain et al., 2010)。したがって、環状染色体を持つ *trt1Δ* では複製を阻害する薬剤である HU に対して感受性を示すことは期待されていた。しかし、*stn1-1 trt1Δ* では *trt1Δ* と比較してさらに強い感受性を示した (図 3-2C)。これらの二株はテロメア繰り返し配列を持たないため、この結果は、*stn1-1* はテロメア繰り返し配列非依存的に HU に対する感受性をもたらすことが明らかとなった。

次に、*stn1⁺* を *trt1Δ* から欠損させて、新たに *stn1Δ trt1Δ* を作成することを試みた。本来 *stn1⁺* は必須遺伝子であるが、それを欠失させると環状染色体を有する株がサバイバーとして出現することが知られている (Martín et al., 2007)。親株の *trt1Δ* として環状染色体を有している株を使用したため (Sadaie, Naito, & Ishikawa, 2003)、*stn1Δ trt1Δ* は生存可能であると期待され、実際に取得された。PFGE により、*stn1Δ trt1Δ* が環状染色体を有することを確かめた (図 3-2B)。HU への感受性を調べたところ、*stn1-1 trt1Δ* の場合と同様に、*stn1Δ trt1Δ* は *trt1Δ* よりも強い感受性を示した (図 3-2C)。したがって、この結果からも、Stn1 がテロメア繰り返し配列以外で機能することが示唆される。

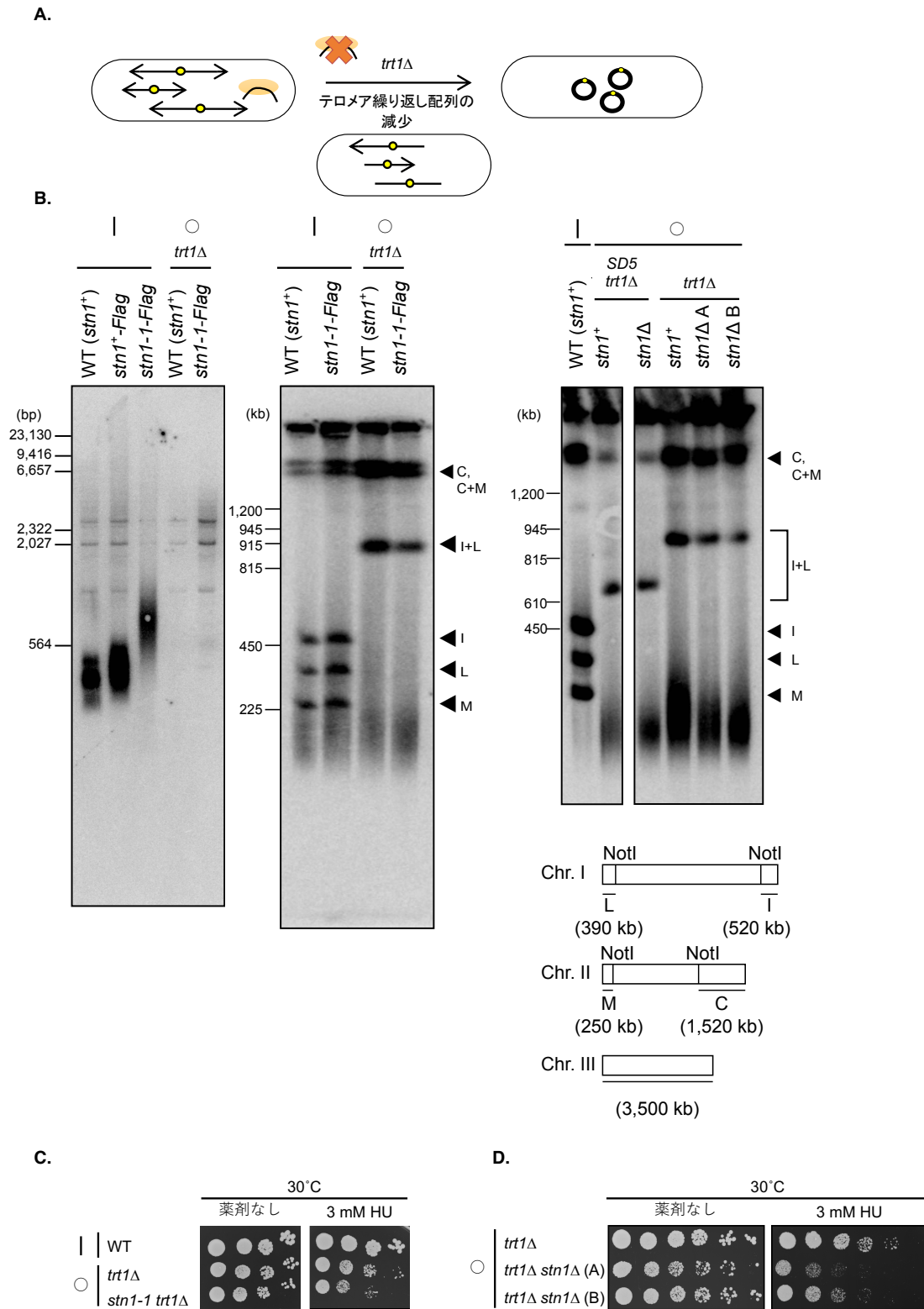


図 3-2 *stn1-1* はテロメア繰り返し配列の有無に関わらず HU 感受性を示す

A. *trt1Δ*による染色体環状化の模式図。B. (左) テロメアプローブを用いたサザンハイブリダ

イゼーションを行なった。表記の株を 25°C で液体培養し回収した。得られたゲノム DNA を *Apal* によって切断した。(中央および右) 表記の株を用いて PFGE を行なった。表記の株を 25°C で液体培養し回収した。得られたゲノム DNA を *NotI* によって切断した。プローブは模式図にある通り、L, I, M, C の断片を使用した。以上のプローブは $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ で標識した。C.表記の株で 10 倍の希釈系列を作製し、それぞれのプレートにスポットした。D.表記の株で 5 倍の希釈系列を作製し、それぞれのプレートにスポットした。A と B は独立なクローンを示す。| は線状染色体を有する株、○は環状化株を有する株を示す。

先行研究により、*Stn1* はテロメア末端だけでなく、テロメア末端に隣接するサブテロメア領域における複製に必要であることが知られている (Matmati et al., 2018; Takikawa et al., 2017)。*trt1Δ*においてはテロメア繰り返し配列が欠失し、サブテロメアの一部も失われているが、株により残存するサブテロメアの長さが異なる。本研究で使用した *trt1Δ* においては、テロメア繰り返し配列との境界から 10 kb 程度のサブテロメア配列は失っているが、よりセントロメア側のサブテロメア配列は残存している (Sadaie et al., 2003)。したがって、*stn1Δ trt1Δ*や *stn1-1 trt1Δ*で見られた、HU に対する強い感受性がサブテロメアに由来する可能性がある。そこで、これらの二株における *trt1Δ*よりも強い HU 感受性が、*stn1+*の機能異常がサブテロメアにおいてもたらした複製阻害によるものなのかどうかを検討することとした。東京大学・加納研究室から供与いただいた *SD5* 株では、一番・二番染色体の両腕に位置する 40~60 kb 程度の *SH* 領域 (*SH1R*, *SH1L*, *SH2R*, *SH2L*) および三番染色体の左腕に位置する 15 kb 程度の *SH* 領域 (*SH3L*)が栄養要求性マーカーによって置換されている (序論・図 1-3; Tashiro, Nishihara, Kugou, Ohta, & Kanoh, 2017)。*SD5* 株は野生型株と比べ、HU に対し感受性は見られなかった (図 3-3)。次に、*SD5 stn1-1* を作成したところ、同様に、*SD5* 株では見られなかった HU への感受性が観察された。*SD5 stn1-1* は *SD5* 株と比較し、5 mM HU においては生育に約 25 倍程度の差が見られたが、野生型株と *stn1-1* についても同程度の差が見られている (図 3-3; レーン 1 vs 2 および レーン 5 vs 6)。したがって、*stn1-1* の HU への感受性には、*SH* 領域の欠損は影響しないことが示唆される。また、先行研究により、*SD5* 株においても *trt1+*を欠損させることで、染色体が環状化した株がサバイバーとして出現することが知られている (Tashiro et al., 2017)。*trt1Δ SD5* は *trt1Δ*と同程度に HU に対し感受性を示した。そこで *trt1Δ SD5* から *stn1+*を欠損させた株を作製し、環状染色体が保持されていることを確かめた (図 3-2B)。次に、HU への感受性を確認したところ、*stn1Δ trt1Δ*の場合と同様に、サブテロメア配列を欠失させた株においても、*stn1+*の欠損により HU の感受性が増大した (図 3-3)。以上の結果より、*stn1+*の機能不全による HU への感受性はテロメアリピー

トおよびサブテロメア領域以外での欠損によることが示唆された。

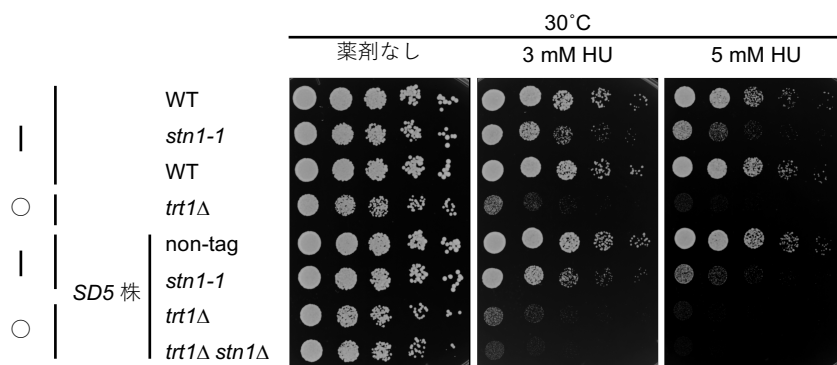


図 3-3 *stn1-1* は SH 配列の有無によらず HU に感受性を示す

表記の株で 5 倍の希釈系列を作製し、それぞれのプレートにスポットした。いずれも YES プレートを使用した。この実験結果は中岡秀憲博士により得られた。

3-3 *stn1-1* では rDNA への複製フォークの局在が減少する

stn1-1 においては、テロメアやサブテロメア以外の領域において複製に異常がある可能性が考えられたが、それが起きている領域の候補として、複製フォークの進行を阻害する RFB (Replication fork barrier) を要する繰り返し配列からなる rDNA 領域が考えられた。また実際に、先行研究において、二次元ゲル電気泳動により複製フォークの進行を観察したとき、制限温度下の *stn1-1* では rDNA 領域での複製中間体の減少が観察された (Takikawa et al., 2017)。そこで、rDNA 領域において RFB を形成するタンパク質である Reb1 を欠失させることで、*stn1-1* の HU 感受性が影響を受けるか否かを確認した (図 3-4)。*stn1-1* に比べて、*stn1-1 reb1Δ* の HU に対する感受性はやや減少した。したがって、*stn1-1* の HU に対する感受性は rDNA の RFB 形成に起因することが示唆された。

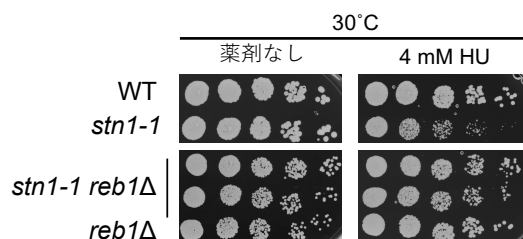


図 3-4 *stn1-1* の HU 感受性は Reb1 に依存する

表記の株で 5 倍の希釈系列を作製し、それぞれのプレートにスポットした。いずれも YES プレートを使用した。上下に分かれた写真は一つの培養プレートから撮影した一枚の写真を分離し

たものである。

Stn1 が DNA ポリメラーゼ α と結合することは多様な生物種において知られているため、*stn1-1* においては DNA ポリメラーゼ α のゲノム上での局在が変化している可能性が考えられる (Escandell et al., 2019; Ganduri & Lue, 2017; Grossi et al., 2004)。そこで DNA ポリメラーゼ α の触媒サブユニットである Pol1 に myc タグを付加した株を用い、ChIP 実験によって、*stn1-1* における DNA ポリメラーゼ α の rDNA に対する局在を調べた (図 3-5 A,B)。とくに *rfp4* (Replication fork pause) と呼ばれる領域では、複製フォークの進行の向きと rDNA の転写の方向が反対方向であるため、RFB を逃れた一部の複製フォークと転写装置が衝突し、複製が停止しやすいことが知られている (Klings & Bastia, 2004)。*stn1-1* では *rfp4* 領域と 28S をコードする領域 (図 3-5A, 28S) で、Pol1 の局在が減少することを独立な実験で繰り返し確認した (図 3-5B)。*rfp4* 領域においては Pol1 の局在は有意に減少した。陰性対照として用いた *gal1+* では差が見られなかった。また、同様に rDNA における DNA ポリメラーゼ δ の触媒サブユニットである Pol3 の局在についても、myc タグを付加した Pol3 を発現する株を用いて調べたところ、*stn1-1* においては Pol3 の 28S への局在が減少することが示された (図 3-5 C)。以上から、rDNA 領域において、*stn1-1* では DNA ポリメラーゼ α および δ を含むレプリソームの局在が減少していることが示された。

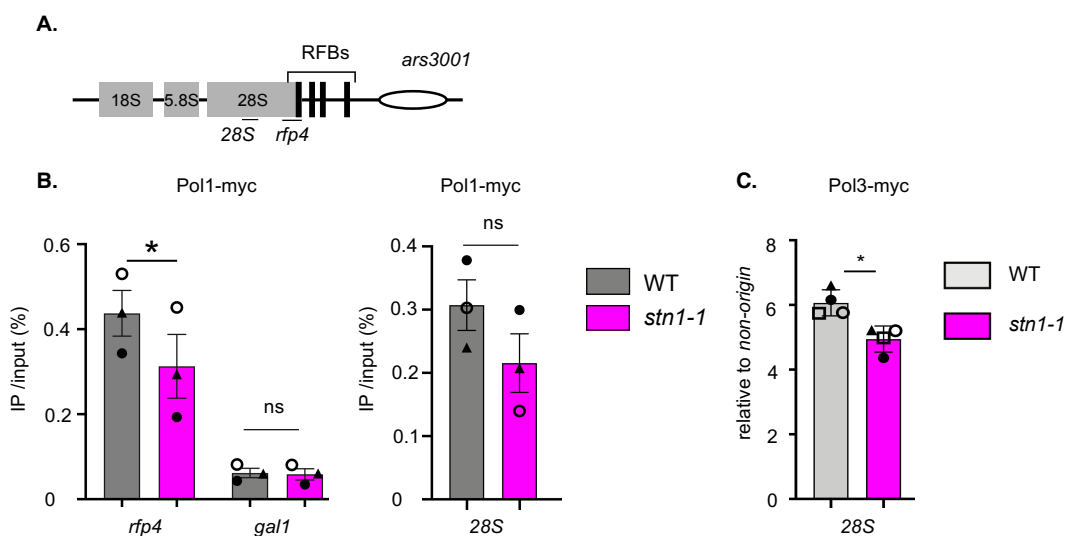


図 3-5 *stn1-1* ではレプリソームの局在が減少する

A. rDNA におけるプライマーの位置を示す。B. Pol1-myc による ChIP を行なった。表記の株を 25°C で液体培養に供した。エラーバーは S.E.M. を示す。それぞれのシンボルは独立な実験による結果を表す。*gal1+* は陰性対照として用いた。n=3, *, p \leq 0.05, n.s.; not significant (paired t-test)

による)。C. Pol3-myc による ChIP を行なった。Non-origin locus でのシグナルに対する相対値を示す。Non-origin locus は二番染色体左腕に位置する領域であり、複製開始点が存在しないことが知られている (Hayashi et al., 2007)。エラーバーは S.E.M. を示す。それぞれのシンボルは独立な実験による結果を表す。n=4,*; p \leq 0.05 (paired t-test による)。

3-4 *stn1-1* では rDNA リピートが不安定化する

rDNA においては RFB での複製フォーク停止により、DSB が生じる (Weitao, Budd, Hoopes, & Campbell, 2003)。正常な細胞では DSB は適切に修復されるが、クロマチンからレプリソームが解離しやすい変異体においては、DSB 部位におけるエクソヌクレアーゼによる消化が促進され、一本鎖が露出することにより相同組換えを介したリピート数の変動が誘導されることが知られている (Kobayashi, Heck, Nomura, & Horiuchi, 1998; Sasaki & Kobayashi, 2017)。前項で *stn1-1* では rDNA において複製反応が阻害されている可能性が示されたため、*stn1-1* において rDNA のコピー数が変化していないかを検討した。コピー数の変化を調べるため、まず rDNA 繰り返し配列を含む染色体 DNA 断片の長さを測定した。分裂酵母において、rDNA 繰り返し配列は第三染色体の両腕に存在し、ゲノム DNA を SfiI で切断することで A および B の断片として得られることが知られている (図 3-6 上部パネル; Fan, Grothues, & Smith, 1991; Miyoshi, Sadaie, Kanoh, & Ishikawa, 2003)。野生型株に加え、同じ遺伝型をもち、*stn1⁺-Flag* と *stn1-1-Flag* を有する株について、独立したクローンをそれぞれ 2 株ないし 3 株単離し液体培地で培養した。得られたサンプルからゲノム DNA を抽出し、SfiI で切断したのちに、PFGE により分離した。rDNA にハイブリダイズするプローブを用い、rDNA を含む SfiI 断片を検出した。また、1 日に一度新たな液体培地に植え継ぎ、10 日間液体培養を続けた細胞と比較することで、染色体断片の長さに変化が起きるか観察した。これは、rDNA のコピー数変化は複製フォークの停止に伴う相同組換えによる修復の結果だと考えられ、世代を経たサンプルではコピー数の変化が顕著に見られることを期待したためである。野生型株および *stn1⁺-Flag* を発現する株では、いずれのクローンにおいても、培養初日および 10 日後のサンプルで、A と B のシグナルが移動度に変化があるものの明瞭な 2 本のバンドとして観察された (図 3-6A)。また、図中の X-Y の範囲についてシグナルを定量しピークプロットを作製したところ、やや A と B のピーク位置が移動するものの、A と B のピークは明瞭であった (図 3-6B)。しかし、*stn1-1-Flag* を発現する株では、いずれのクローンにおいても、培養開始後 1 日培養したサンプルにおいては A および B のシグナルは明確に見られたが、10 日間培養したサンプルにおいてはいずれのシグナルもスメア状

出芽酵母では、rDNA のコピー数の変化は RFB 活性に依存することが知られている (Kobayashi et al., 1998)。そこで、*stn1-1* 変異体において見られた rDNA のコピー数の変動が RFB 活性に依存するかどうかを明らかにするため、*stn1-1 reb1Δ* 二重変異株における rDNA のコピー数の変動を qPCR により調べた (図 3-7A)。15 日の液体培養の後にも *stn1-1 reb1Δ* では rDNA のコピー数の増加は見られなかった。また、*reb1Δ* においても rDNA のコピー数の変化はなかった。さらに、同様に PFGE によって rDNA を含む断片の大きさを観察したところ、*stn1-1* では長期培養により、断片 A および B のシグナルはスメア状を呈し明瞭なバンドとして認められなかったのに対し、*stn1-1 reb1Δ* 二重変異株においては、長期培養後にはややスメア状になるものの、断片 A および B ははっきりシグナルを示した (図 3-7B)。*reb1Δ* においては、*stn1⁺-Flag* と同様に、断片 A および B のシグナルは明確であった。また、シグナル強度をスキャンした結果からも、*stn1-1 reb1Δ* 二重変異株においてはピーク A および B が長期培養後も存在することが支持された (図 3-7C)。これらの結果は、rDNA を含む SfiI 断片の大きさが変化しないことを示し、qPCR によって示された結果と一致する。したがって、*stn1-1* で見られる長期培養に伴う rDNA のコピー数の増加は *reb1⁺* つまり RFB 活性に依存することが示唆された。

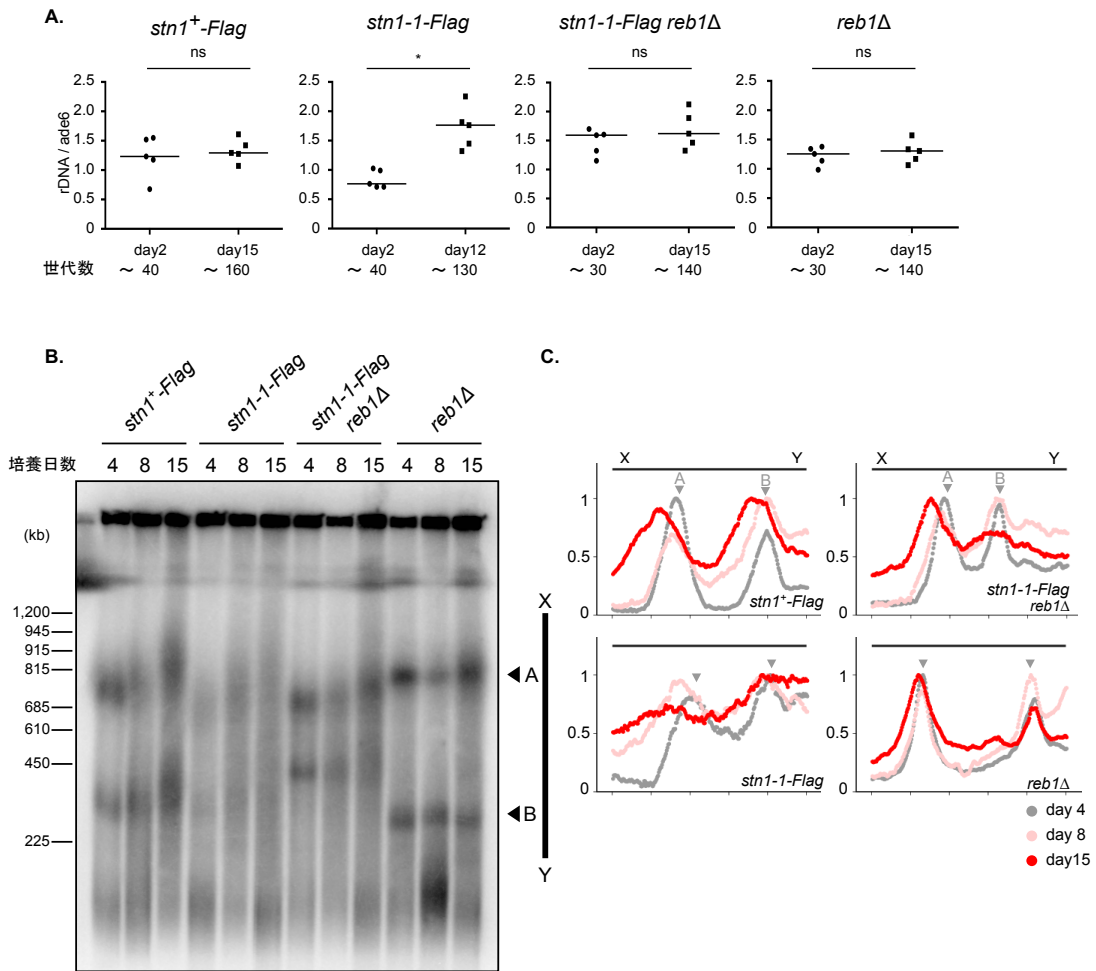


図 3-7 *stn1-1* で見られる rDNA のコピー数の変動は Reb1 に依存する

A. 表記の株で rDNA を定量した。25°C で一定期間培養し、表記の日数でそれぞれ回収した。24 時間に一度継代し細胞数を計測することで、世代数を概算した。得られた DNA を qPCR に供した。rDNA の値を *stn1⁺-Flag* および *ade6⁺* の値によって標準化した。*; $p \leq 0.05$ (Mann-Whitney test による), n.s.; not significant。 B. 図 3-7A と同様に、表記の株で rDNA を含む断片を検出した。25°C で一定期間培養し、表記の日数でそれぞれ回収した。得られた DNA を PFGE により分離した。プローブは $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ によって標識した rDNA プローブを用いた。 C. 図中の X-Y にそってシグナルを定量した。シグナル強度と移動度をそれぞれの株について、Day4, Day8, Day15 をプロットした。プロットは中岡秀憲博士により作成された。

3-6 *stn1-1* では Rad52 および γH2A が rDNA 領域へ蓄積する

stn1-1 においては、先行研究により示された rDNA 上の複製中間体がやや減少したという点 (Takikawa et al., 2017)、および、DNA ポリメラーゼ α の rDNA への局在が減少し

た (図 3-5) という点より、rDNA における複製が阻害されていると考えられる。*stn1-1* で見られる rDNA のコピー数の変化は、rDNA 中の RFB における複製フォークの停止にともなう相同組換えによる可能性が考えられる (Takikawa et al., 2017)。そこで *stn1-1* において、相同組換えを担う因子である Rad52 の局在が変化しているか検討した。*stn1-1* の株において、*rad52⁺* 遺伝子を Rad52-myc により置き換えた株を作製し、ChIP 法によって Rad52-myc の局在を調べた。テロメア繰り返し DNA 配列に接するサブテロメア領域と、rDNA のうち、RFB として知られる *rfp4* および早期発火する複製起点として知られる *ars3001* での局在を調べることにした (図 3-8A)。陰性対照として *his1⁺* を使用し、それぞれの場所でのシグナルを *his1* でのシグナルで標準化した。また、HU 無添加の場合に加えて、HU を添加する条件も同様に観察した。本実験で使用した濃度 (12 mM) の HU により、複製フォークの停止が起き、S 期のはじめで細胞周期が停止することが知られている。*stn1-1* では複製フォークの進行が阻害されている可能性があるため、複製フォークが停止するような条件ではより顕著に Rad52 の蓄積が見られることを期待した。先行研究で示された通り (Takikawa et al., 2017)、HU 非存在下の *stn1-1* において、テロメア繰り返し配列近傍における Rad52 の局在は野生型株と比べ有意に増加した (図 3-8B)。これは、*stn1-1* においては、DNA ポリメラーゼ α のテロメア繰り返し配列への呼び込みが阻害され、DNA ポリメラーゼ α による C 鎖の埋め込み反応が損なわれるため、テロメラーゼにより伸長された G 鎖が露出するためと考えられる (Takikawa et al., 2017)。HU 存在下の *stn1-1* においても、テロメア繰り返し配列近傍における Rad52 の局在は野生型株と比べ有意に増加した。また、HU 非存在下で見られた *stn1-1* における Rad52 の蓄積は、HU 存在下では減少している傾向が見られたが、これは HU により複製フォークの崩壊が他の領域でも誘導され、結果的にテロメア末端への Rad52 局在量が減少したためと考えられる。次に、*stn1-1* ではいずれの rDNA 領域においても、HU 非存在下で野生型株と比べて有意に高い局在が見られた。また、HU 存在下においては、とくに *ars3001* において、Rad52 の有意に高い局在が見られた。野生型、*stn1-1* とともに、HU 添加により、*ars3001* における Rad52 の局在は増加する傾向にあったが、これは HU によりリボヌクレオチドリダクターゼが阻害された場合であっても、dNTP が枯渇するまでには時間がかかるため、HU 存在下においても DNA 複製が起き、rDNA における複製フォークの崩壊が促進されたためと考えられる。以上から、Stn1 が rDNA 領域において Rad52 の局在を抑制していることが示唆された。

次に、129 番目のセリンがリン酸化されたヒストン H2A (以下 γ H2A) の局在を ChIP により調べた。チェックポイントキナーゼである ATM/ATR によって、DSB 付近のヒストン H2A がリン酸化されるため、 γ H2A は DSB の指標の一つとして知られている

(Nakamura, Du, Redon, & Russell, 2004; Rogakou, Pilch, Orr, Ivanova, & Bonner, 1998)。テロメア繰り返し配列近傍では、*stn1-1* において HU の有無に関わらず、野生型と比べ有意に γ H2A の蓄積が見られたものの、陰性対照である *his1+* での値を下回る結果となった (図 3-8C)。この理由は現段階で不明であるものの、このことは、テロメア繰り返し配列近傍ではチェックポイントの活性化が抑制されていることと一致する (Carneiro et al., 2010)。HU 非存在下の *stn1-1* においては、*ars3001* と *rfp4* といった rDNA 領域では、野生型株と比べて有意に高い蓄積が見られた (図 3-8C)。また、野生型、*stn1-1* ともに、HU 添加により *ars3001* と *rfp4* における γ H2A の局在が増加する傾向が見られたが、これは Rad52 の結果と一致し、野生型であっても rDNA においては HU 添加によって複製フォークの阻害が亢進していることを示す。HU 存在下の *stn1-1* においても、野生型と比べ、 γ H2A の局在が増加するという結果が再現性よく得られた。これらの結果は、*stn1-1* における rDNA 領域では、野生型と比べ、HU の有無にかかわらず DSB がより引き起こされている可能性を示唆した。出芽酵母の rDNA において、RFB によって DSB が引き起こされることが知られているため、*stn1-1* における DSB も RFB 活性によることが予想された (Weitao, Budd, & Campbell, 2003)。そこで、*stn1-1 reb1Δ* 二重変異株において γ H2A の蓄積に変化が見られるかを、ChIP により検証した (図 3-8D)。*stn1-1 reb1Δ* 二重変異株においては、*stn1-1* と比べ、rDNA における γ H2A が減少していた。この結果により、*stn1-1* での DSB が RFB 活性によることが示唆された。

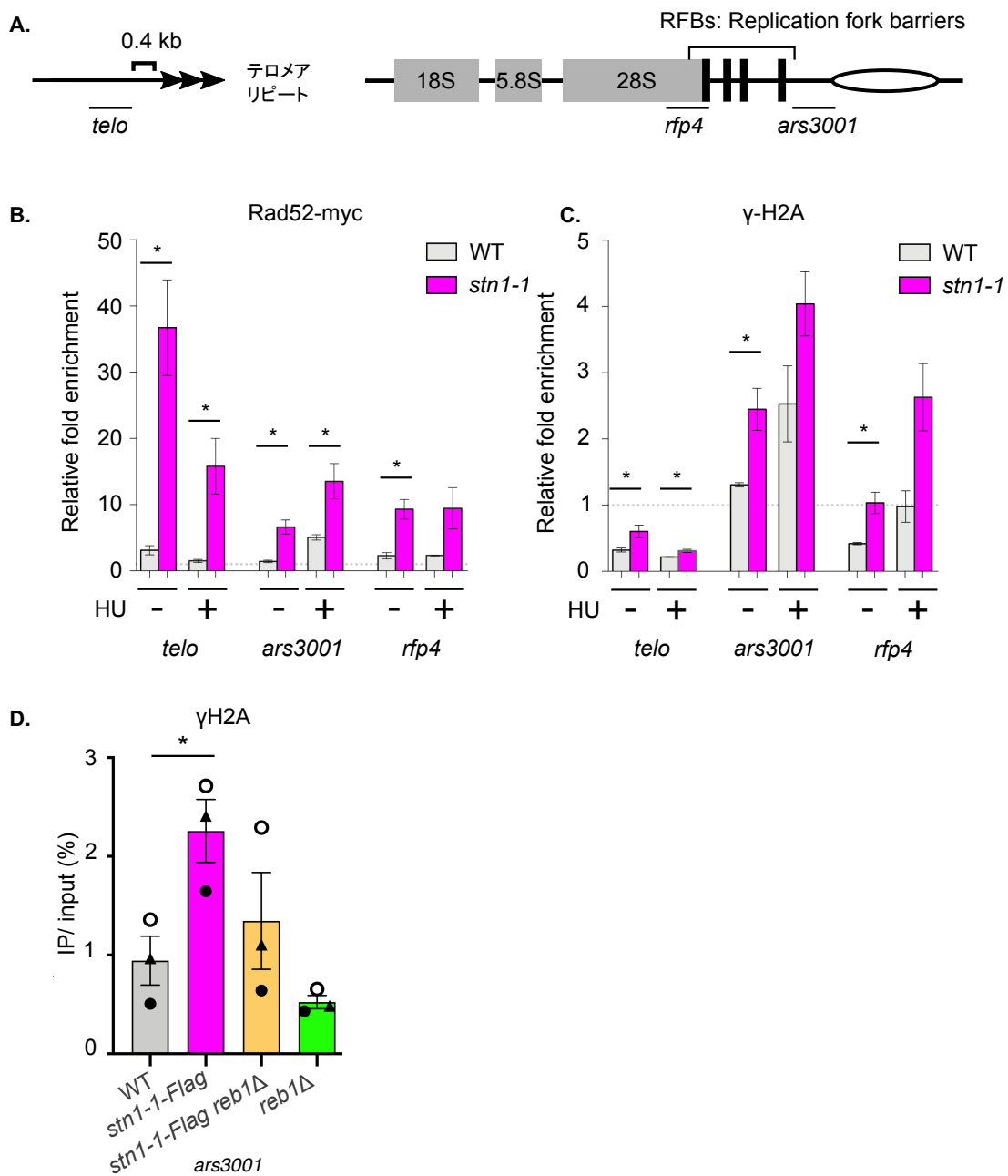


図 3-8 *stn1-1* では Rad52 および γ H2A の局在が増加する

A. テロメア近傍および rDNA におけるプライマーの位置を示す。B および C. Rad52-myc および γ H2A による ChIP を行なった。表記の株を 25°C で液体培養に供した。HU は 12 mM 4 時間処理した。エラーバーは S.E.M.を示す。y 軸の値 (relative fold enrichment) は、*his1⁺*でのシグナルに対する相対値を示す。n=3, *; $p \leq 0.05$ (ratio paired t-test による)。D. γ H2A による ChIP を行なった。表記の株を 25°C で液体培養に供した。エラーバーは S.E.M.を示す。それぞれのシンボルは独立な実験による結果を表す。n=3, *; $p \leq 0.05$ (Tukey's multiple comparisons test による)

る)。

3-7 *stn1-1* では相同組換えが生存に必要である

stn1-1 における Rad52 の蓄積が見られたことから、相同組換えが起こっていることが予想される。そこで、*stn1-1* の生存に相同組換えが必要かどうか、二重変異株を作製し調べることにした。まず、相同組換えに必要な因子である *rad51+* を欠損させた株と *stn1-1* の二重変異株を作製し、生育を調べた (図 3-9A)。*stn1-1 rad51Δ* 二重変異株は、非制限温度である 25°C、30°C のどちらにおいても、*rad51Δ* および *stn1-1* と比べて生育が悪化した。次に、*mus81+* を欠損させた株と *stn1-1* の二重変異株を作製した。Mus81 は、ホリデイジャンクション構造をほどくりゾルベースであり、停止した複製フォークの再開に伴う相同組換えに重要であることが知られている (Boddy et al., 2001)。*stn1-1 mus81Δ* 二重変異株も同様に、25°C でも 30°C のどちらにおいても、*mus81Δ* および *stn1-1* と比べ生育の悪化が見られた (図 3-9B)。以上から、*stn1-1* の生育には Rad51 や Mus81 といった相同組換えに関わる因子が必要であることが示唆された。

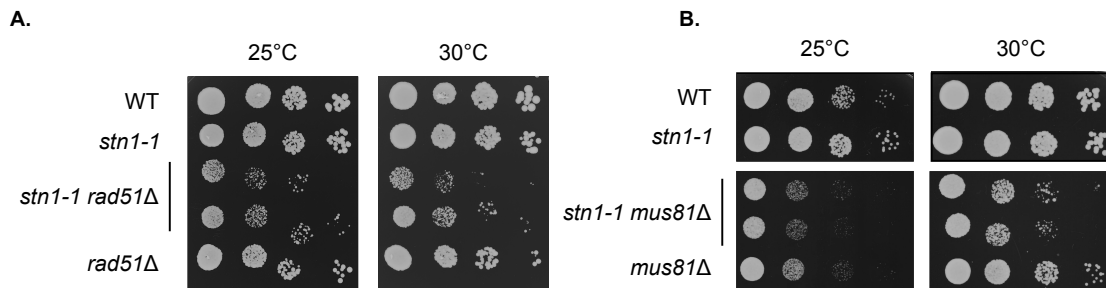


図 3-9 *stn1-1* の生存には HR 関連因子が必要である

A, B 表記の株で 10 倍の希釈系列を作製し、それぞれのプレートにスポットした。いずれも YES プレートを使用した。*stn1-1 rad51Δ* および *stn1-1 mus81Δ* については独立の 2 クローンをスポットした。

3-8 *stn1-1* ではサブテロメアが不安定化し、*swi1Δ* によりさらに不安定化する

これまでの結果から、Stn1 は複製フォークの停止や崩壊による DSB や相同組換えを抑制する機構に重要であると考えられる。*stn1-1* では複製フォークが不安定化していると予想されるため、Fork protection complex (FPC) の一部である *swi1+* を欠損させ、さらに

複製フォークを不安定化させたときの細胞の生存率に与える影響を見ることとした。Swi1 はレプリソームとともに染色体 DNA 上を移動し、複製フォークを安定化する役割を持っている (Noguchi, Noguchi, Du, & Russell, 2003; Noguchi, Noguchi, McDonald, Yates, & Russell, 2004)。*stn1-1* の非制限温度である 30°C で培養した HU 非存在下のプレート上において、*stn1-1 swi1Δ* 二重変異株では、それぞれの変異株に比べ、生育がやや悪化した (図 3-10 A)。さらに、*stn1-1 swi1Δ* 二重変異株は HU に対し強い感受性を示した。したがって、*stn1-1* では複製フォークが不安定化し、その安定化には Swi1 が重要であることが示唆された。

swi1Δ では rDNA やサブテロメアにおいて、 γ H2A や Rad52 が蓄積し、相同組換えが亢進することが知られている (Gadaleta et al., 2016; Noguchi et al., 2003)。そこで、*stn1-1 swi1Δ* 二重変異株におけるサブテロメアの構造を確かめた。ゲノム DNA を ApaI によって切断し、テロメア繰り返し配列との境界から 1 kb セントロメア側付近に存在する TAS1 配列を認識するプローブを用いて、サザンハイブリダイゼーションを行なった (Nakamura et al., 1998; Sugawara & Haber, 1992)。野生型株においては 5 本のバンドが確認された (図 3-10B)。分裂酵母サブテロメアのうち、TAS1 を含む末端から 10 kb 程度の領域については、繰り返し配列を持ち、頻りに染色体間や同一染色体内で相同組換えが起こるため、株間や染色体間で配列が異なる (Oizumi et al., 2021; Tashiro et al., 2017)。このため、TAS1 を含む ApaI 断片についても長さが染色体間で異なり、野生型株で見られる複数のシグナルがどの染色体由来かを判断することは困難である。しかし、*stn1-1* では、野生型株では見られない高分子のラダー状のシグナルが生じた (図 3-10B;*)。この結果は、*stn1-1* ではサブテロメアで頻りに相同組換えが起き、TAS1 を含む繰り返し配列が増幅されたためと考えられる (図 3-10B 右模式図)。また、同様のシグナルは *swi1Δ* でも観察されたが、このことは *swi1Δ* においてはサブテロメアでの相同組換えが促進しているという報告と一致する (Gadaleta et al., 2016)。さらに、*stn1-1 swi1Δ* 二重変異株については、野生株およびそれぞれの変異株で見られた複数のバンドが消失した上、スメア状のシグナルが観察された (図 3-10B; ○)。このことから、*stn1-1 swi1Δ* 二重変異株においては、サブテロメアでの相同組換えが促進され、さらなる構造変化が生じている可能性がある。したがって、*stn1-1* においてすでにサブテロメアは不安定であるが、*swi1+* を欠損させることにより、相乗的にサブテロメアの不安定化が進んだと考えられる。本研究においては詳細な機構は明らかにしていないものの、*stn1-1* においては Swi1 がサブテロメアの構造を維持するために重要であることが示唆された。

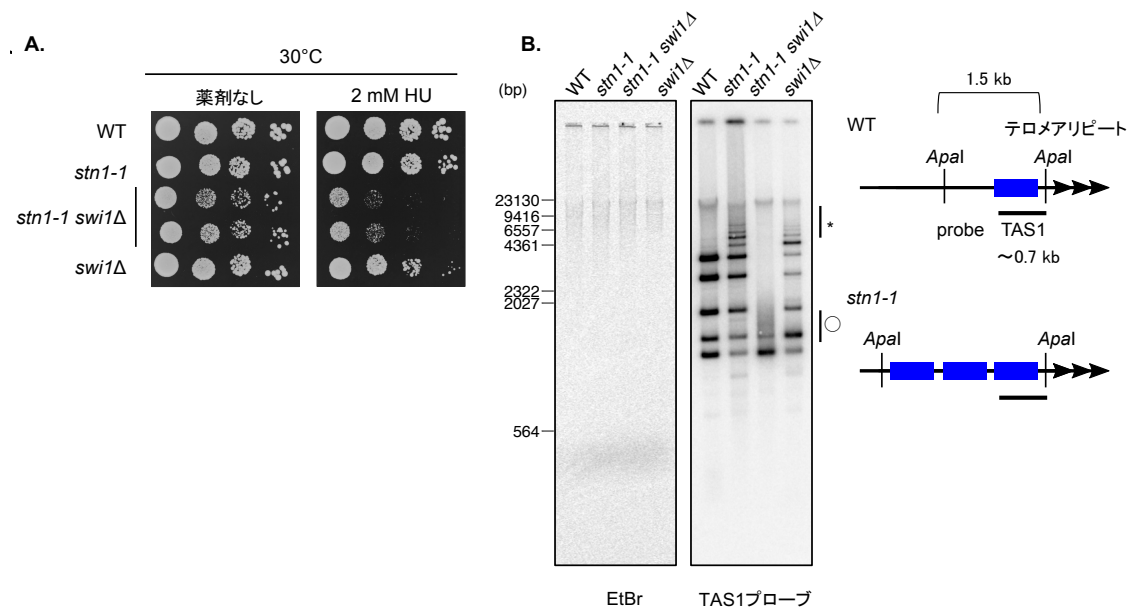


図 3-10 *stn1-1* ではサブテロメアが不安定化し、*swi1Δ*によりさらに不安定化する

A. 表記の株で 10 倍の希釈系列を作製し、それぞれのプレートにスポットした。いずれも YES プレートを使用した。*stn1-1 swi1Δ*については独立の 2 クローンをスポットした。B. 表記の株で TAS1 シグナルを検出するサザンハイブリダイゼーションを行なった。表記の株を 25°C で液体培養し、回収したのちに得られたゲノム DNA を *ApaI* によって切断した。プローブは TAS1 プローブを $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ によって標識した。TAS1 プローブの位置を右パネルに示す。

3-9 *stn1-1* のサブテロメアにおける不安定化および γH2A の蓄積は Reb1 に依存する

前項では *stn1-1* においてサブテロメア領域内で DNA 組換えが亢進していることが観察された (図 3-10B;*)。また、これまでの結果から、*stn1-1* で見られる表現型は Reb1 に依存すると考えられる (図 3-4, 3-7)。出芽酵母において Reb1 はサブテロメアに結合する因子であることが知られているため、本論文では分裂酵母の Reb1 が rDNA 領域だけでなくサブテロメアにおいても機能すると仮説を立てた (Berthiau et al., 2006; Pasquier & Wellinger, 2020)。rDNA 領域に見られる Reb1 結合配列はサブテロメアに存在しないため、何らかの因子を介して Reb1 がサブテロメアに局在する可能性を考えた。テロメア二重鎖結合タンパク質である Taz1 はテロメア繰り返し配列だけでなくサブテロメアにも結合する (Kanoh, Sadaie, Urano, & Ishikawa, 2005)。そこで、まず、Yeast two

hybrid法により、Reb1とテロメア二重鎖に結合するTaz1との結合を検討した(図3-11A)。また、Taz1は二量体を形成するため、陽性対照としてTaz1間の結合も確認した。その結果、Taz1はReb1と結合することが示された。したがって、Reb1がTaz1を介してサブテロメアで機能している可能性がある。次に、前項では*stn1-1*において観察されたサブテロメアの相同組換えが*reb1+*を欠損させることで抑制されるか検証した(図3-11B)。同様にTAS1プローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行なった結果、*stn1-1*においてはいずれの培養日数においても、高分子量のラダー状のシグナル(*)が観察された。一方、*stn1-1 reb1Δ*において、*stn1-1*で見られたラダー状のシグナルはほぼ検出できなかった。したがって、*stn1-1*で見られたサブテロメアの相同組換えは*reb1+*を欠損させることで抑制されることが示された。

また、これまでの結果から、*stn1-1*では、rDNA領域と同様に、サブテロメアにおいても複製に伴うDSBが生じている可能性が考えられる。そこで、まず*stn1-1*においてサブテロメアにおける γ H2Aの蓄積が見られるかをChIPにより検証した(図3-11C)。本実験では、テロメア末端から20 kbの位置にプライマーを設計した。*stn1-1*ではサブテロメアにおいて、野生型株に比べて γ H2Aが蓄積するという結果を繰り返し得た。次に、*reb1+*を欠損させることで、*stn1-1*と比べ、サブテロメアにおける γ H2Aの蓄積が有意に減少した。また、陰性対照である*his1+*においてはいずれの株も同程度の値を示した。以上の結果より、*stn1-1*によるサブテロメアでの相同組換えおよびDSBの発生はReb1依存的であることが示唆された。

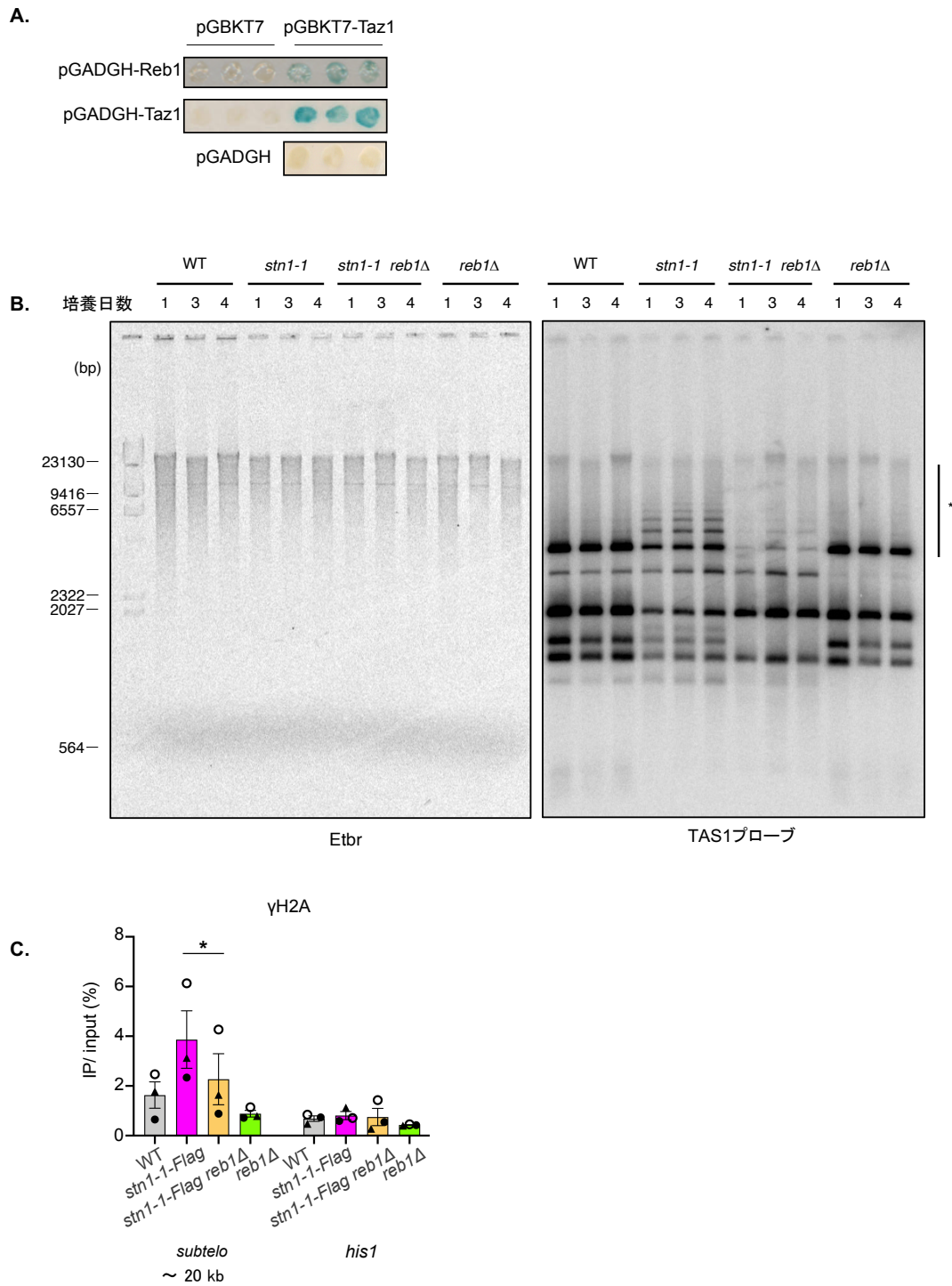


図 3-11 *stn1-1* で見られるサブテロメアの不安定化は、*reb1*⁺の欠損により抑制される
A. Taz1 と Reb1 の結合を Yeast two hybrid 法により検証した。Taz1 は陽性対象として用いた。
この結果は三好知一郎博士によって得られた。B. 表記の株で TAS1 シグナルを検出するサザン

ハイブリダイゼーションを行なった。表記の株を 25°C で液体培養し、回収したのちに得られたゲノム DNA を *Apal* によって切断した。プローブは TAS1 プローブを [α - 32 P]-dCTP によって標識した。C. γ H2A による ChIP を行なった。表記の株を 25°C で液体培養に供した。*his1⁺* は陰性対照として用いた。エラーバーは S.E.M. を示す。それぞれのシンボルは独立な実験による結果を表す。n=3, *, p \leq 0.05 (Tukey's multiple comparisons test による)。

3-10 環状化株の *stn1-1* においても γ H2A が rDNA に蓄積する

Stn1 はテロメア末端に結合するタンパク質である。*stn1-1* ではサブテロメアと rDNA の双方で γ H2A の蓄積が見られたため、*Stn1* がサブテロメアと rDNA での安定化に寄与していると考えられるが、両領域ともテロメアに隣接する領域であるため、テロメア末端に局在する *Stn1* が隣接する両領域での安定性維持に寄与している可能性がある。そこで、*Stn1* によるサブテロメアおよび rDNA での安定性維持に、テロメア繰り返し配列が必要かどうか確かめるため、テロメア繰り返し配列を持たない環状染色体の場合においても *stn1-1* による γ H2A の蓄積が見られるかを検証した。環状化株である *trt1 Δ* に対し *stn1-1-Flag* を導入した株を用い、*trt1 Δ* と比較した (図 3-12)。まず、rDNA 領域 (*ars3001*) では、*stn1-1 trt1 Δ* において、*trt1 Δ* と比べ γ H2A の蓄積が見られた。とくに HU 非存在下では有意に差があった。また、HU 添加により、*stn1-1 trt1 Δ* ・ *trt1 Δ* のいずれの株においても γ H2A の蓄積が増加する傾向が見られた。このことは、環状染色体における rDNA であっても、線状染色体の場合と同様に、HU による複製フォークの阻害が亢進していることを示す。以上から、テロメア繰り返し配列を持たない *trt1 Δ* の場合であっても、*stn1-1* によって rDNA における DSB が誘導されることが示された。次に、サブテロメアについても同様に検証した。本実験で使用した環状染色体を有する *trt1 Δ* においては、テロメア末端から 10 kb 程度が消化されて失われている (Sadaie et al., 2003)。したがってサブテロメアについては、テロメア繰り返し配列との境界から 20 kb 程度セントロメア側に位置するプライマーを使用した。HU 添加により、環状染色体をもつ *stn1-1 trt1 Δ* 、*trt1 Δ* のいずれの株においても γ H2A の蓄積が増加する傾向が見られた。このことから、環状染色体の場合のサブテロメアにおいて、rDNA で見られるように、HU により複製フォークの停止が亢進することが示された。また、前項で示したように、線状染色体の場合、*stn1-1* は野生型株と比べサブテロメアでの γ H2A の蓄積が見られていた (図 3-11C)。しかし、環状染色体を有する *stn1-1 trt1 Δ* では、HU の有無にかかわらず、*trt1 Δ* と比べてサブテロメアでの γ H2A の蓄積は見られなかった (図 3-12)。以上から、テロメア繰り返し

返し配列を持たない *trt1Δ* の場合、*stn1-1* によってサブテロメアにおける DSB が誘導されないことが示された。これまでの結果から、環状化株において *Stn1* は rDNA での DSB を抑制する一方で、サブテロメアでの DSB の抑制には寄与していないことが示唆された。

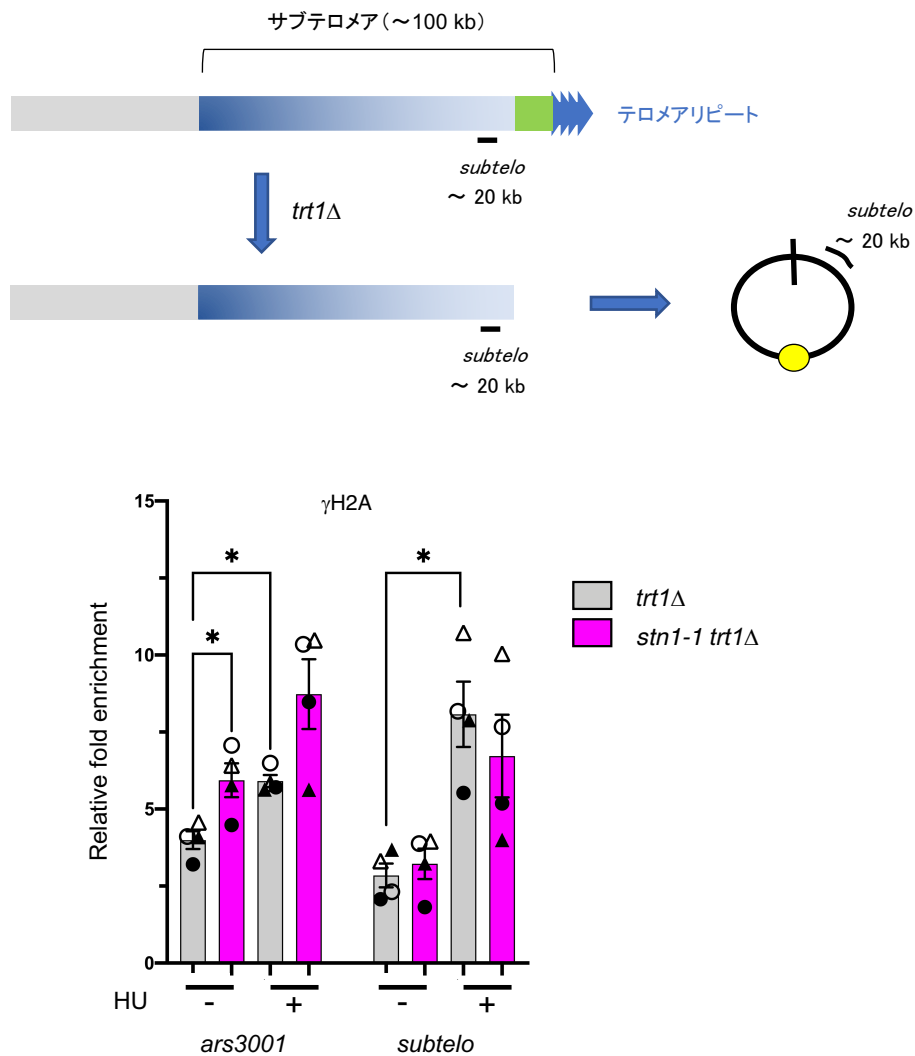


図 3-12 *stn1-1 trt1Δ* では rDNA において γ H2A が蓄積する

(パネル上部) *trt1Δ* における環状化株形成の過程およびサブテロメアプライマーの位置を示す。
 (パネル下部) γ H2A による ChIP を行なった。表記の株を 25°C で液体培養に供した。HU は 12 mM を 4 時間処理した。エラーバーは S.E.M. を示す。それぞれのシンボルは独立な実験による結果を表す。*his1⁺* でのシグナルに対する相対値を示す。n=4,*; p ≤ 0.05 (Tukey's multiple comparisons test による)。

3-11 *stn1Δ trt1Δ*では三番染色体の構造が変化する

*trt1Δ*など環状染色体を形成するとされている株においても、一番および二番染色体の環状化は確認されているものの、三番染色体については rDNA を用いた DNA 相同組換えなどで維持されていると考えられている (Jain et al., 2010)。また、*stn1Δ*も環状染色体を持つことが知られているが、その三番染色体が *trt1Δ*と同様に維持されているのかは不明である (Martín et al., 2007)。これまでの結果から、Stn1 が rDNA リピートの安定性に重要であることが明らかとなったため、*trt1Δ*における rDNA を介した三番染色体の維持にも Stn1 が寄与する可能性があると考えた。そこで、すでに染色体が環状化している *trt1Δ*から *stn1+*を欠損させたときに、三番染色体の構造が変化するかを調べた。ゲノム DNA を SfiI で切断し、PFGE により分離し、rDNA プローブでハイブリダイズすることで、三番染色体の rDNA 領域を含む SfiI 断片の構造を調べた (図 3-13A)。*trt1Δ*の親株として使用した野生型株では、500~600 kb 付近にスメア状のシグナル (図 3-13A、鍵括弧で示す) が見られた。断片の大きさが図 3-6 などで示した野生型株と異なるが、それは使用した株の種類が異なるためである。分裂酵母の rDNA は両腕合わせて 100~150 コピーと考えられているが、野生型であっても株間で rDNA の右腕と左腕への分布が異なることが知られている。本実験で用いた野生型株では、三番染色体の左腕および右腕に 500~600 kb の rDNA が分布していると推測される。一方、*trt1Δ*では、ウェル以外ではシグナルが見られなかった (←)。PFGE においては、環状染色体 DNA のほか、組換え中間体などを含む複雑な構造は泳動により分離できないことが知られている。この結果は、*trt1Δ*において三番染色体の rDNA が相同組換えにより維持されており、組換え中間体が蓄積しているためウェルから泳動が進行しないとする先行研究と一致する (Jain et al., 2010; Tashiro et al., 2017)。一方、*trt1Δ stn1Δ*株については、独立に取得したクローン A および B からシングルコロニー由来のゲノム DNA を得た。PFGE によって分離したところ、ほぼ全てのクローンでシグナルが見られた。したがって、*trt1Δ stn1Δ*と *trt1Δ*の三番染色体は互いに異なる構造をとる可能性が示唆された。また、クローン A においては、コロニーごとに大きさは違うものの、1000~1600 kb 付近に強いシグナル (***) が検出され、クローン B については 2200 kb 付近の強いシグナル (*) のみが検出された。次に、ゲノム DNA を用いた qPCR により、rDNA およびサブテロメアの DNA 量を相対的に定量した (図 3-13B)。*trt1Δ stn1Δ*と *trt1Δ*ではサブテロメアの DNA 量には変化がなかった。一方、rDNA 量について、野生型株に対し *trt1Δ*では2倍ほどに増加していた。さらに、*trt1Δ*に比べ、*trt1Δ stn1Δ*のクローン A では減少し、野生型株の 1.5 倍程

度の rDNA 量を示した。クローン B では、*trt1Δ* とクローン A の間の量を示した。野生型株では、図 3-13A の結果から、500~600 kb の rDNA が三番染色体の左右に分布しているため、合計でおおよそ 1000~1200 kb 程度の rDNA を持つと予想される。qPCR の結果から *trt1Δ* においては rDNA 量が野生型株の 2 倍程度であることを鑑みると、2000 kb 超程度の rDNA を持つと考えられる。これらを踏まえ、qPCR の結果から概算すると、*trt1Δ stn1Δ* では 1500~2000 kb 程度の rDNA を持つと予測される。この結果は、図 3-13A で見られたクローン A および B で見られたバンド (*および**) の大きさと一致したため、*trt1Δ stn1Δ* において検出されたバンドは、左腕と右腕に存在する rDNA が融合して形成された断片である可能性が高い。また、*trt1Δ stn1Δ* 中のクローン A では、コロニー間で rDNA を含む断片の大きさにばらつきが見られた。このことは、*trt1Δ* において一番および二番染色体の融合部位がコロニー間で異なることと同様に (Sadaie et al., 2003)、*trt1Δ stn1Δ* における三番染色体においても融合部位がコロニー間で異なるためと考えられる。また、クローン B については安定してバンド (*) が検出されたため、クローン A ではクローン B と比べて、よりヘテロな細胞集団となっている可能性が考えられる。これまでの知見より、テロメア繰り返し配列を失った環状化株であっても、Stn1 は rDNA の安定性に寄与することが示唆された。

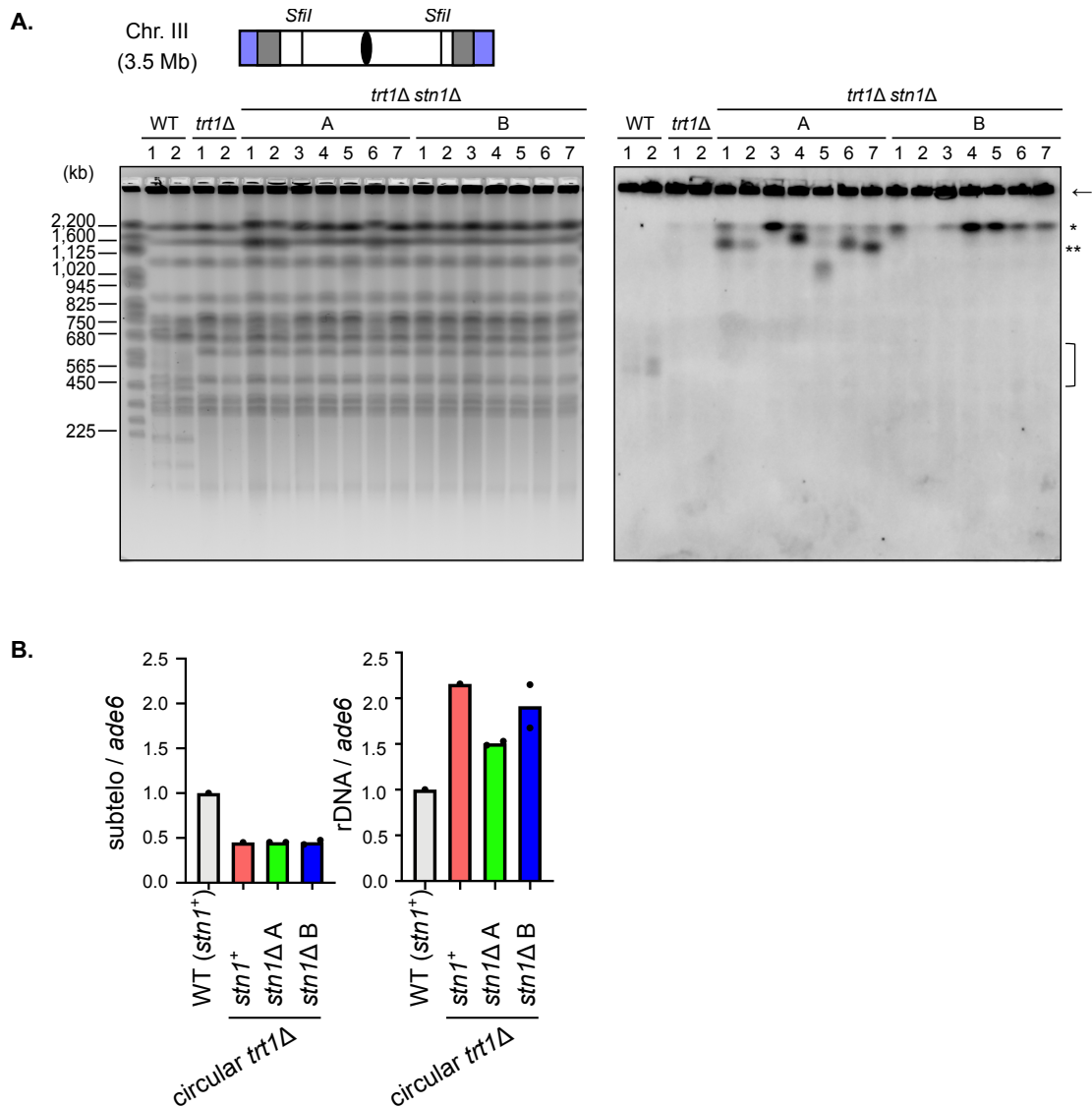


図 3-13 *stn1*Δ *trt1*Δでは三番染色体の構造が変化する

A. 表記の株で rDNA を含む断片を検出した。WT, *trt1*Δ, *stn1*Δ *trt1*Δ (クローン A, B) についてそれぞれ 2 コロニーあるいは 7 コロニーずつ単離し、液体培養に供した。得られた DNA を PFGE により分離した。レーンの番号は単一クローン名を示す。プローブは DIG によって標識した rDNA プローブを用いた。この実験結果は三好知一郎博士により得られた。

B. 表記の株で rDNA を定量した。WT, *trt1*Δ, *stn1*Δ *trt1*Δ (クローン A, B) についてそれぞれ 1 コロニーあるいは 2 コロニーずつ単離し、液体培養して回収したのち、得られた DNA を qPCR に供した。末端から 20 kb のサブテロメアおよび rDNA での値を WT および *ade6*⁺での値によって標準化した。この実験結果は中岡秀憲博士により得られた。

第四章 考察

本研究では、分裂酵母においてサブテロメアおよび rDNA などの反復配列の安定性に Stn1 が寄与していることを明らかにした。*stn1*⁺の高温感受性株 *stn1-1* においては *stn1-1* を長期間培養すると、rDNA のコピー数が増加することが示された。さらに、DSB マーカーである γ H2A が rDNA において蓄積した。以上の表現型が、rDNA において RFB 活性を有する *reb1*⁺を欠損させることで抑制されたため、*stn1-1* では rDNA の RFB で停止した複製フォークが崩壊することにより、相同組換えが亢進していることが示唆された。Stn1 と DNA ポリメラーゼ α が結合することは知られているため、Stn1 が rDNA における複製フォークの安定性に寄与していると考えられる。また、*stn1-1* によって引き起こされるサブテロメアの不安定性についても、*reb1*⁺の欠損によって抑制されることから、サブテロメアにおける Reb1 の機能についても知見を得た。さらに、Stn1 と rDNA の関係から、環状染色体において Stn1 が果たす機能についても示唆的なデータを得た。

4-1 複製フォークと Stn1

本研究では、*stn1-1* においては DNA ポリメラーゼ α の触媒サブユニットである Pol1 の rDNA における局在が減少していることを確かめた(図 3-5A, B)。また、Pol1 に加え、Pol3 についても rDNA における局在が減少していることを確かめた(図 3-5C)。また、Stn1 は DNA ポリメラーゼ α と結合することが知られている (Grossi et al., 2004)。これらのことから、Stn1 が rDNA における複製を促進させる機構として、DNA ポリメラーゼ α との結合を介してレプリソームの染色体 DNA への局在を安定化させているということが予測される。哺乳類細胞において、DNA ポリメラーゼ α と DNA ヘリケースを繋ぐハブタンパク質として機能する CTF4 と、Stn1 がその構成因子である CST 複合体の相互作用があることが示されている (Wang, Brady, Caiello, Ackerson, & Stewart, 2019)。また、出芽酵母において *CTF4* を欠損させた場合、rDNA 中の RFB で停止した複製フォークにより DSB が生じ、さらに 5'末端の切除が進行することで生じた一本鎖 DNA によって相同組換えが誘導される (Sasaki & Kobayashi, 2017)。その結果、rDNA のコピー数が増加する。*ctf4 Δ* では DNA ポリメラーゼ α の複製フォークへの結合が減少することが知られている (Tanaka et al., 2009)。本研究により示された、rDNA のコピー数が増加する、また DNA ポリメラーゼ α の局在が減少するなどの表現型が出芽酵母 *ctf4 Δ* と *stn1-1* との間で類似している点を鑑みると、*stn1-1* では DNA ポリメラーゼ α が安定に染色体 DNA へ局在できないため、RFB における DSB 末端の切除反応が促進され、相同組換えが亢進する可能性が示唆される(図 4-1)。

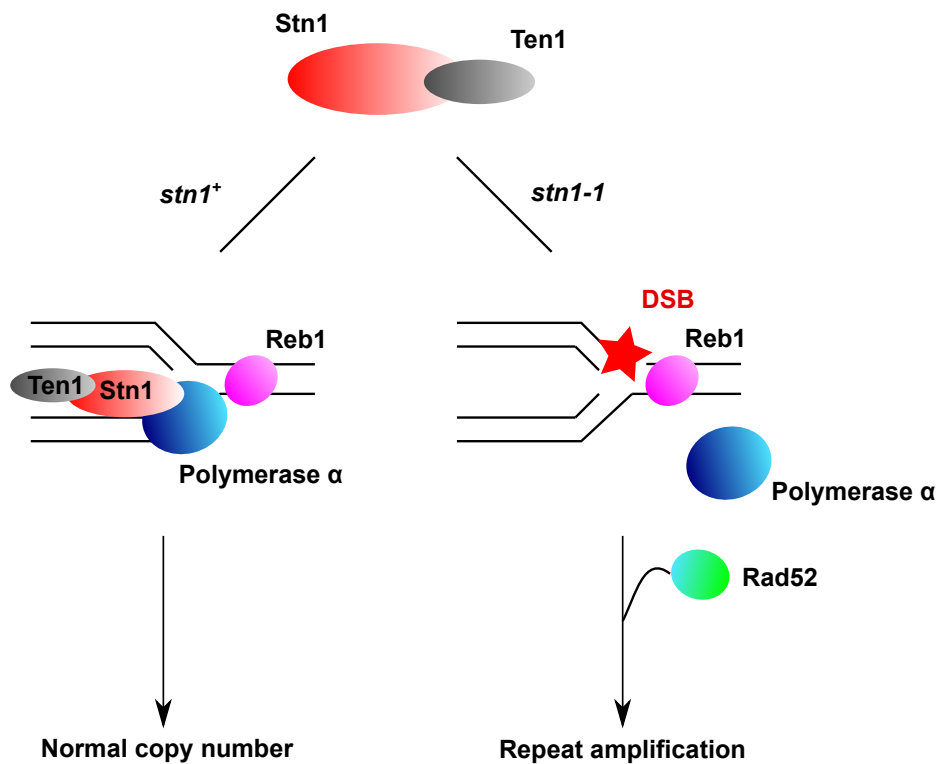


図 4-1 *stn1-1* においてリピートが増幅する

rDNA における Stn1 の機能を示すモデル図。rDNA において、転写装置の進行方向と複製フォークの進行方向が対向しているため、正面衝突が生じる危険性がある。これを回避するため、複製フォークの進行を阻害する RFB が存在する。正常な Stn1-Ten1 複合体が存在する細胞では、Reb1 を介した RFB により複製フォークが停止した場合であっても複製フォークは欠落せず、コピー数は変動しない。一方 *stn1-1* では、ポリメラーゼの解離と DSB が生じ、Rad52 が呼び込まれ、相同組換えが起こる。その結果、コピー数の増大が起こる。したがって、Stn1 は RFB における DSB と、その結果としてもたらされる、HR を介したリピート数の不安定性を抑制していると考えられる。

加えて、*stn1-1* においては DNA ポリメラーゼαだけでなく、DNA ポリメラーゼδの触媒サブユニットである Pol3 の rDNA 局在も減少していることを確認した (図 3-5C)。RFB での複製フォークの停止などが原因で生じる DSB の修復には、複製を伴う経路が用いられると考えられ、その経路は BIR (Break-induced replication) と呼ばれる (Malkova, Ivanov, & Haber, 1996)。BIR とは、末端切除反応により生じた 3'末端が下流の二本鎖 DNA に侵入し D ループを形成し、D ループそのものを鋳型として複製が進行する反応である。この複製には DNA ポリメラーゼαおよびポリメラーゼδが必要であり、ポリメラーゼδの変異株では BIR による修復が遅れるため、DSB 部位における 5'末端の消化がより

促進される (Donnianni et al., 2019)。上述のように、*stn1-1* においては相同組換えが亢進していることから、RFB によって生じた DSB において 5' の末端切除反応が亢進していることが予想される。*stn1-1* においては、BIR に必要である DNA ポリメラーゼ α およびポリメラーゼ δ の rDNA における局在が減少しているという結果が得られており (図 3-5)、それらの DNA ポリメラーゼが安定に染色体上に局在できないために BIR による修復が損なわれている可能性も考えられる。Stn1 が BIR を伴う修復と関連するかどうかは今後の研究にて明らかにされるべきである。また、本研究においては、とくに rDNA とサブテロメア領域に主に着目したが、哺乳類 CST 複合体がゲノム上の DSB 修復に機能しているという報告もあることから (Mirman et al., 2018)、分裂酵母における Stn1 についても、他の複製が困難な領域でも機能していることは十分考えられ、今後の検証が待たれる。

4-2 Reb1 のサブテロメアにおける機能

Reb1 は rDNA において RFB を形成し、複製フォークの進行を阻害する。*stn1-1* では rDNA で見られた表現型と同様に、サブテロメアでの γ H2A の蓄積や相同組換えが誘導されたが、その表現型は *reb1+* を欠損させることで抑制された (図 3-11)。このことから、*stn1-1* におけるサブテロメアの不安定性は Reb1 によって誘導されると考えられる。したがって、分裂酵母 Reb1 が rDNA において RFB を形成することと同様に、サブテロメアにおいて複製を阻害している可能性が考えられる。Reb1 は rDNA 領域において Ter2/3 と呼ばれる配列に結合することが知られている。分裂酵母におけるサブテロメアには、Ter2/3 配列に相当する配列は存在せず、Reb1 がサブテロメアに局在するかどうかは明らかにされていない。しかしながら、Yeast two hybrid 法によって示された、テロメア結合タンパク質である Taz1 と Reb1 が結合するという結果より、Reb1 が Taz1 を介してサブテロメアに局在する可能性も考えられる (図 3-11)。また、哺乳類 TRF2 は Myb ドメインを介してテロメアと結合するが、分裂酵母 Reb1 は TRF2 と同性的の高い Myb ドメインを有することから、サブテロメア DNA へ直接結合する可能性も十分考えられる (Jaiswal et al., 2016)。出芽酵母 Reb1 においては、配列依存的にサブテロメアへ結合することが知られている (Berthiau et al., 2006; Pasquier & Wellinger, 2020)。したがって、分裂酵母においても、局在方法は不明であるものの、Reb1 が rDNA のみならずサブテロメアでの複製も阻害すると推測できる。

4-3 環状化株における Stn1 の機能

*trt1Δ*は環状染色体を持つが、三番染色体は末端が rDNA による相同組換えを介して維持されていると考えられている。染色体などサイズの大きい DNA については PFGE により分離することができるが、環状染色体や組換え中間体など複雑な構造を持つ DNA は泳動されず、ウェルに停留することが知られている。この性質から、*trt1Δ*において、三番染色体末端に存在する SfiI により切断した場合であっても、rDNA を含む断片は PFGE により検出されない (図 3-13A; Tashiro, Nishihara, Kugou, Ohta, & Kanoh, 2017)。一方、*trt1Δ stn1Δ*においては rDNA を含む断片が見られたことから、*trt1Δ stn1Δ*における三番染色体の構造は *trt1Δ*とは異なることが示唆された (図 3-13)。 *trt1Δ stn1Δ*において rDNA を含むシグナルが検出された理由については、*trt1Δ stn1Δ*においては rDNA において DSB が多く誘導された結果細かいニックなどが生じ、泳動が可能となったためと考えられる。これは、*stn1-1*の rDNA において γ H2A が蓄積し、環状化 *trt1Δ stn1-1*においても同様に γ H2A が蓄積したことから、*stn1⁺*の欠損により rDNA に DSB が生じやすくなると考えられるためである (図 3-8, 3-12)。さらに、*trt1Δ stn1Δ*において PFGE により検出された rDNA を含む断片の大きさが、両腕に存在する rDNA が自己環状化により融合したと仮定した場合と合致することから (図 3-13)、三番染色体が rDNA の組換えにより維持されず、一番および二番染色体と同様に環状化した可能性が考えられる。また、*trt1Δ stn1Δ*におけるクローン A とクローン B については、PFGE により検出された rDNA を含む断片の大きさや rDNA の量が異なり、クローン A はより少ない rDNA を有することが示された。一方、クローン A とクローン B については、HU に対する感受性の程度がやや異なり、クローン A はクローン B と比べ、HU に対しより強い感受性を示した (図 3-2D)。出芽酵母を用いた研究により、rDNA の量が少ない株は DNA 損傷をもたらす薬剤に対しより感受性を示すことが明らかとなっているが (Ide et al., 2010)、本研究の結果から、分裂酵母においても HU に対する感受性と rDNA の量に相関が見られることが示唆された。

テロメア配列を持たない状態でどのように末端が維持されているかについては議論がある。Reb1 が Taz1 と結合するという新たな結果が得られたことから (図 3-11A)、Taz1 は他のシェルタリン因子を呼び込むことができるために (Miyoshi et al., 2008)、Reb1 が Taz1 を介して他のシェルタリン因子を rDNA に呼び込み、テロメア繰り返し配列と同様の環境を維持しているという可能性が考えられる。また、Stn1 が環状化株の rDNA においても γ H2A の蓄積を抑制しうる (図 3-12)、および *trt1Δ stn1Δ*で三番染色体が環状化している可能性が考えられること (図3-13) という結果から、Stn1 が通常のテロ

メア末端に局在する場合と同様に、rDNA 配列で構成される末端においても末端保護の機能を担っているという可能性も考えられる。上述のように、環状染色体を有すると言われている株においても、様々な染色体構造を持つ可能性があるため、種々の環状化株の維持機構を解明することは非常に意義深いと考える。

参考文献

- Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLeod, M., & Warbrick, E. (1993). *Experiments with fission yeast : a laboratory course manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Berthiau, A.S., Yankulov, K., Bah, A., Revardel, E., Luciano, P., Wellinger, R. J., Géli, V., & Gilson, E. (2006). Subtelomeric proteins negatively regulate telomere elongation in budding yeast. *EMBO Journal*, *25*(4), 846–856. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600975>
- Boddy, M. N., Gaillard, P. H. L., McDonald, W. H., Shanahan, P., Yates, J. R., & Russell, P. (2001). Mus81-Eme1 are essential components of a Holliday junction resolvase. *Cell*, *107*(4), 537–548. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00536-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00536-0)
- Brewer, B. J., & Fangman, W. L. (1988). A replication fork barrier at the 3' end of yeast ribosomal RNA genes. *Cell*, *55*(4), 637–643. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90222-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90222-x)
- Carneiro, T., Khair, L., Reis, C. C., Borges, V., Moser, B. A., Nakamura, T. M., & Ferreira, M. G. (2010). Telomeres avoid end detection by severing the checkpoint signal transduction pathway. *Nature*, *467*(7312), 228–232. <https://doi.org/10.1038/nature09353>
- Chastain, M., Zhou, Q., Shiva, O., Whitmore, L., Jia, P., Dai, X., Huang, C., Fadri-Moskwick, M., Ye, P., & Chai, W. (2016). Human CST Facilitates Genome-wide RAD51 Recruitment to GC-Rich Repetitive Sequences in Response to Replication Stress. *Cell Reports*, *16*(5), 1300–1314. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.06.077>
- de Lange, T. (2005). Shelterin: The protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes and Development*, *19*(18), 2100–2110. <https://doi.org/10.1101/gad.1346005>
- Diesch, J., Hannan, R. D., & Sanij, E. (2014). Perturbations at the ribosomal genes loci are at the centre of cellular dysfunction and human disease. *Cell and Bioscience*, *4*(1), 32–41. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-4-43>
- Dingwall, A., Shapiro, L., & Ely, B. (1990). Analysis of bacterial genome organization and replication using pulsed-field gel electrophoresis. *Methods*, *1*(2), 160–168. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(05\)80131-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1046-2023(05)80131-8)
- Donnianni, R. A., Zhou, Z. X., Lujan, S. A., Al-Zain, A., Garcia, V., Glancy, E., Burkholder, A. B., Kunkel, T. A., & Symington, L. S. (2019). DNA Polymerase Delta Synthesizes Both Strands during Break-Induced Replication. *Molecular Cell*, *76*(3), 371–381.e4.

- <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.033>
- Escandell, J. M., Carvalho, E. S., Gallo-Fernandez, M., Reis, C. C., Matmati, S., Luís, I. M., Abreu, I. A., Coulon, S., & Ferreira, M. G. (2019). Ssu72 phosphatase is a conserved telomere replication terminator. *The EMBO Journal*, e100476.
<https://doi.org/10.15252/embj.2018100476>
- Fan, J. B., Grothues, D., & Smith, C. L. (1991). Alignment of Sfi I sites with the Not I restriction map of *Schizosaccharomyces pombe* genome. *Nucleic Acids Research*, 19(22), 6289–6294. <https://doi.org/10.1093/nar/19.22.6289>
- Gadaleta, M. C., Das, M. M., Tanizawa, H., Chang, Y. T., Noma, K., Nakamura, T. M., & Noguchi, E. (2016). Swi1 Timeless Prevents Repeat Instability at Fission Yeast Telomeres. *PLOS Genetics*, 12(3), e1005943. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005943>
- Ganduri, S., & Lue, N. F. (2017). STN1-POLA2 interaction provides a basis for primase-pol α stimulation by human STN1. *Nucleic Acids Research*, 45(16), 9455–9466.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkx621>
- Garvik, B., Carson, M., & Hartwell, L. (1995). Single-stranded DNA arising at telomeres in *cdc13* mutants may constitute a specific signal for the RAD9 checkpoint. *Molecular and Cellular Biology*, 15(11), 6128–6138. <https://doi.org/10.1128/mcb.15.11.6128>
- Grandin, N., Damon, C., & Charbonneau, M. (2001). Ten1 functions in telomere end protection and length regulation in association with Stn1 and Cdc13. *The EMBO Journal*, 20(5), 1173–1183. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.5.1173>
- Grandin, N., Reed, S. I., & Charbonneau, M. (1997). Stn1, a new *Saccharomyces cerevisiae* protein, is implicated in telomere size regulation in association with Cdc13. *Genes & Development*, 11(4), 512–527. <https://doi.org/10.1101/gad.11.4.512>
- Grossi, S., Puglisi, A., Dmitriev, P. V., Lopes, M., & Shore, D. (2004). Pol12, the B subunit of DNA polymerase alpha, functions in both telomere capping and length regulation. *Genes & Development*, 18(9), 992–1006. <https://doi.org/10.1101/gad.300004>
- Hayashi, M., Katou, Y., Itoh, T., Tazumi, A., Tazumi, M., Yamada, Y., Takahashi, T., Nakagawa, T., Shirahige, K., & Masukata, H. (2007). Genome-wide localization of pre-RC sites and identification of replication origins in fission yeast. *The EMBO Journal*, 26(5), 1327–1339. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601585>
- Ide, S., Miyazaki, T., Maki, H., & Kobayashi, T. (2010). Abundance of Ribosomal RNA Gene Copies Maintains Genome Integrity. *Science*, 327(5966), 693–696.
<https://doi.org/10.1126/science.1179044>

- Ishikawa, F. (2013). Portrait of replication stress viewed from telomeres. *Cancer Science*, *104*(7), 790–794. <https://doi.org/10.1111/cas.12165>
- Ivessa, A. S., Zhou, J. Q., Schulz, V. P., Monson, E. K., & Zakian, V. A. (2002). *Saccharomyces Rrm3p*, a 5' to 3' DNA helicase that promotes replication fork progression through telomeric and subtelomeric DNA. *Genes and Development*, *16*(11), 1383–1396. <https://doi.org/10.1101/gad.982902>
- Jain, D., Hebden, A. K., Nakamura, T. M., Miller, K. M., & Cooper, J. P. (2010). HAATI survivors replace canonical telomeres with blocks of generic heterochromatin. *Nature*, *467*(7312), 223–227. <https://doi.org/10.1038/nature09374>
- Jaiswal, R., Choudhury, M., Zaman, S., Singh, S., Santosh, V., Bastia, D., & Escalante, C. R. (2016). Functional architecture of the Reb1-Ter complex of *Schizosaccharomyces pombe*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(16), E2267-76. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525465113>
- Kanoh, J., Sadaie, M., Urano, T., & Ishikawa, F. (2005). Telomere binding protein Taz1 establishes Swi6 heterochromatin independently of RNAi at telomeres. *Current Biology : CB*, *15*(20), 1808–1819. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.09.041>
- Kobayashi, T., Heck, D. J., Nomura, M., & Horiuchi, T. (1998). Expansion and contraction of ribosomal DNA repeats in (Fob1) protein and the role of RNA polymerase I Expansion and contraction of ribosomal DNA repeats in *Saccharomyces cerevisiae* : requirement of replication fork blocking (Fob1) protein and the role. *Genes & Development*, *12*(24), 3821–3830. <https://doi.org/10.1101/gad.12.24.3821>
- Kobayashi, T., & Horiuchi, T. (1996). A yeast gene product, Fob1 protein, required for both replication fork blocking and recombinational hotspot activities. *Genes to Cells*, *1*(5), 465–474. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.1996.d01-256.x>
- Kobayashi, T., Horiuchi, T., Tongaonkar, P., Vu, L., & Nomura, M. (2004). SIR2 regulates recombination between different rDNA repeats, but not recombination within individual rRNA genes in yeast. *Cell*, *117*(4), 441–453. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00414-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00414-3)
- Kobayashi, T., Nomura, M., & Horiuchi, T. (2001). Identification of DNA *cis* Elements Essential for Expansion of Ribosomal DNA Repeats in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, *21*(1), 136–147. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.1.136-147.2001>
- Krings, G., & Bastia, D. (2004). *swi1*- and *swi3*-dependent and independent replication fork

- arrest at the ribosomal DNA of *Schizosaccharomyces pombe*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(39), 14085–14090.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0406037101>
- Krings, G., & Bastia, D. (2005). Sap1p binds to Ter1 at the ribosomal DNA of *Schizosaccharomyces pombe* and causes polar replication fork arrest. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(47), 39135–39142. <https://doi.org/10.1074/jbc.M508996200>
- Linardopoulou, E. V., Williams, E. M., Fan, Y., Friedman, C., Young, J. M., & Trask, B. J. (2005). Human subtelomeres are hot spots of interchromosomal recombination and segmental duplication. *Nature*, *437*(7055), 94–100. <https://doi.org/10.1038/nature04029>
- Malkova, A., Ivanov, E. L., & Haber, J. E. (1996). Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast: A possible role for break-induced DNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(14), 7131–7136.
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.14.7131>
- Martín, V., Du, L. L., Rozenzhak, S., & Russell, P. (2007). Protection of telomeres by a conserved Stn1-Ten1 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(35), 14038–14043.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0705497104>
- Matmati, S., Vaurs, M., Escandell, J. M., Maestroni, L., Nakamura, T. M., Ferreira, M. G., Géli, V., & Coulon, S. (2018). The fission yeast Stn1-Ten1 complex limits telomerase activity via its SUMO-interacting motif and promotes telomeres replication. *Science Advances*, *4*(5), eaar2740. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aar2740>
- Matsuda, A., Chikashige, Y., Ding, D. Q., Ohtsuki, C., Mori, C., Asakawa, H., Kimura, H., Haraguchi, T., & Hiraoka, Y. (2015). Highly condensed chromatins are formed adjacent to subtelomeric and decondensed silent chromatin in fission yeast. *Nature Communications*, *6*(1), 7753. <https://doi.org/10.1038/ncomms8753>
- Mirman, Z., Lottersberger, F., Takai, H., Kibe, T., Gong, Y., Takai, K., Bianchi, A., Zimmermann, M., Durocher, D., & de Lange, T. (2018). 53BP1–RIF1–shieldin counteracts DSB resection through CST- and Pol α -dependent fill-in. *Nature*, *560*(7716), 112–116. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0324-7>
- Miyake, Y., Nakamura, M., Nabetani, A., Shimamura, S., Tamura, M., Yonehara, S., Saito, M., & Ishikawa, F. (2009). RPA-like mammalian Ctc1-Stn1-Ten1 complex binds to single-stranded DNA and protects telomeres independently of the Pot1 pathway. *Molecular Cell*, *36*(2), 193–206. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.08.009>

- Miyoshi, T., Kanoh, J., & Ishikawa, F. (2009). Fission yeast Ku protein is required for recovery from DNA replication stress. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, *14*(9), 1091–1103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2009.01337.x>
- Miyoshi, T., Kanoh, J., Saito, M., & Ishikawa, F. (2008). Fission yeast Pot1-Tpp1 protects telomeres and regulates telomere length. *Science*, *320*(5881), 1341–1344. <https://doi.org/10.1126/science.1154819>
- Miyoshi, T., Sadaie, M., Kanoh, J., & Ishikawa, F. (2003). Telomeric DNA ends are essential for the localization of Ku at telomeres in fission yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, *278*(3), 1924–1931. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208813200>
- Naito, T., Matsuura, A., & Ishikawa, F. (1998). Circular chromosome formation in a fission yeast mutant defective in two ATM homologues. *Nature Genetics*, *20*(2), 203–206. <https://doi.org/10.1038/2517>
- Nakamura, T. M., Cooper, J. P., & Cech, T. R. (1998). Two modes of survival of fission yeast without telomerase. *Science*, *282*(5388), 493–496. <https://doi.org/10.1126/science.282.5388.493>
- Nakamura, T. M., Du, L., Redon, C., & Russell, P. (2004). Histone H2A Phosphorylation Controls Crb2 Recruitment at DNA Breaks, Maintains Checkpoint Arrest, and Influences DNA Repair in Fission Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(17), 7820–7820. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.17.7820.2004>
- Noguchi, E., Noguchi, C., Du, L. L., & Russell, P. (2003). Swi1 Prevents Replication Fork Collapse and Controls Checkpoint Kinase Cds1. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(21), 7861–7874. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.21.7861-7874.2003>
- Noguchi, E., Noguchi, C., McDonald, W. H., Yates, J. R., & Russell, P. (2004). Swi1 and Swi3 Are Components of a Replication Fork Protection Complex in Fission Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(19), 8342–8355. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.19.8342-8355.2004>
- Ohki, R., & Ishikawa, F. (2004). Telomere-bound TRF1 and TRF2 stall the replication fork at telomeric repeats. *Nucleic Acids Research*, *32*(5), 1627–1637. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh309>
- Oizumi, Y., Kaji, T., Tashiro, S., Takeshita, Y., Date, Y., & Kanoh, J. (2021). Complete sequences of *Schizosaccharomyces pombe* subtelomeres reveal multiple patterns of genome variation. *Nature Communications*, *12*(1), 3–8. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20595-1>

- Paeschke, K., Capra, J. A., & Zakian, V. A. (2011). DNA Replication through G-Quadruplex Motifs Is Promoted by the *Saccharomyces cerevisiae* Pif1 DNA Helicase. *Cell*, *145*(5), 678–691. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.04.015>
- Pasquier, E., & Wellinger, R. J. (2020). In vivo chromatin organization on native yeast telomeric regions is independent of a cis-telomere loopback conformation. *Epigenetics and Chromatin*, *13*(1), 1–22. <https://doi.org/10.1186/s13072-020-00344-w>
- Qi, H., & Zakian, V. A. (2000). The *Saccharomyces* telomere-binding protein Cdc13p interacts with both the catalytic subunit of DNA polymerase α and the telomerase-associated Est1 protein. *Genes and Development*, *14*(14), 1777–1788. <https://doi.org/10.1101/gad.14.14.1777>
- Rodland, K. D., & Russell, P. J. (1982). Regulation of ribosomal RNA cistron number in a strain of *Neurospora crassa* with a duplication of the nucleolus organizer region. *Biochimica et Biophysica Acta*, *697*(2), 162–169. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(82\)90072-0](https://doi.org/10.1016/0167-4781(82)90072-0)
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., & Bonner, W. M. (1998). Double-stranded Breaks Induce Histone H2AX phosphorylation on Serine 139. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(10), 5858–5868. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.10.5858>
- Rustchenko, E. P., Curran, T. M., & Sherman, F. (1993). Variations in the number of ribosomal DNA units in morphological mutants and normal strains of *Candida albicans* and in normal strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, *175*(22), 7189–7199. <https://doi.org/10.1128/jb.175.22.7189-7199.1993>
- Sadaie, M., Naito, T., & Ishikawa, F. (2003). Stable inheritance of telomere chromatin structure and function in the absence of telomeric repeats. *Genes & Development*, *17*(18), 2271–2282. <https://doi.org/10.1101/gad.1112103>
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold spring harbor laboratory press.
- Sanchez-Gorostiaga, A., Lopez-Estrano, C., Krimer, D. B., Schwartzman, J. B., & Hernandez, P. (2004). Transcription Termination Factor reb1p Causes Two Replication Fork Barriers at Its Cognate Sites in Fission Yeast Ribosomal DNA In Vivo. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(1), 398–406. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.1.398-406.2004>
- Sanchez, J. A., Kim, S. M., & Huberman, J. A. (1998). Ribosomal DNA Replication in the Fission Yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Experimental Cell Research*, *238*(1), 220–230.

- <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/excr.1997.3835>
- Sasaki, M., & Kobayashi, T. (2017). Ctf4 Prevents Genome Rearrangements by Suppressing DNA Double-Strand Break Formation and Its End Resection at Arrested Replication Forks. *Molecular Cell*, 66(4), 533–545.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.04.020>
- Sen, D., & Gilbert, W. (1998). Formation of parallel four-stranded complexes by guanine-rich motif for meiosis. *Nature*, 334, 364–366. <https://doi.org/10.1038/334364a0>
- Stewart, J. A., Wang, F., Chaiken, M. F., Kasbek, C., Chastain, P. D., Wright, W. E., & Price, C. M. (2012). Human CST promotes telomere duplex replication and general replication restart after fork stalling. *The EMBO Journal*, 31(17), 3537–3549. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.215>
- Sugawara, N. F. (1988). *DNA Sequences at the Telomeres of the Fission Yeast S. Pombe*. (Doctoral dissertation, Harvard University).
- Sugawara, N., & Haber, J. E. (1992). *Characterization of Double-Strand Break-Induced Recombination : Homology Requirements and Single-Stranded DNA Formation*. <https://doi.org/10.1128/MCB.12.2.563>. Updated
- Takikawa, M., Tarumoto, Y., & Ishikawa, F. (2017). Fission yeast Stn1 is crucial for semi-conservative replication at telomeres and subtelomeres. *Nucleic Acids Research*, 45(3), 1255–1269. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1176>
- Tanaka, H., Katou, Y., Yagura, M., Saitoh, K., Itoh, T., Araki, H., Bando, M., & Shirahige, K. (2009). Ctf4 coordinates the progression of helicase and DNA polymerase α . *Genes to Cells*, 14(7), 807–820. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2009.01310.x>
- Tashiro, S., Handa, T., Matsuda, A., Ban, T., Takigawa, T., Miyasato, K., Ishii, K., Kugou, K., Ohta, K., Hiraoka, Y., Masukata, H., & Kanoh, J. (2016). Shugoshin forms a specialized chromatin domain at subtelomeres that regulates transcription and replication timing. *Nature Communications*, 7(1), 10393. <https://doi.org/10.1038/ncomms10393>
- Tashiro, S., Nishihara, Y., Kugou, K., Ohta, K., & Kanoh, J. (2017). NAR breakthrough article: Subtelomeres constitute a safeguard for gene expression and chromosome homeostasis. *Nucleic Acids Research*, 45(18), 10333–10349. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx780>
- Udugama, M., Sanij, E., Voon, H. P. J., Son, J., Hii, L., Henson, J. D., ... Wong, L. H. (2018). Ribosomal DNA copy loss and repeat instability in ATRX-mutated cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(18), 4737–4742. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720391115>
- Wang, X., & Baumann, P. (2008). Chromosome fusions following telomere loss are mediated

- by single-strand annealing. *Molecular Cell*, 31(4), 463–473.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.028>
- Wang, Y., Brady, K. S., Caiello, B. P., Ackerson, S. M., & Stewart, J. A. (2019). Human CST suppresses origin licensing and promotes AND-1/Ctf4 chromatin association. *Life Science Alliance*, 2(2), e201800270. <https://doi.org/10.26508/lsa.201800270>
- Wang, Y., & Chai, W. (2018). Pathogenic CTC1 mutations cause global genome instabilities under replication stress. *Nucleic Acids Research*, 46(8), 3981–3992.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky114>
- Weitao, T., Budd, M., & Campbell, J. L. (2003). Evidence that yeast *SGS1*, *DNA2*, *SRS2*, and *FOBI* interact to maintain rDNA stability. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 532(1–2), 157–172.
<https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.08.015>
- Weitao, T., Budd, M., Hoopes, L. L. M., & Campbell, J. L. (2003). Dna2 helicase/nuclease causes replicative fork stalling and double-strand breaks in the ribosomal DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(25), 22513–22522.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M301610200>
- Zeman, M. K., & Cimprich, K. A. (2014). Causes and consequences of replication stress. *Nature Cell Biology*, 16(1), 2–9. <https://doi.org/10.1038/ncb2897>

謝辞

本研究を最後まで遂行する機会を与えてくださり、いつも幅広い知見からのご助言をくださったことはもちろん、学会参加など様々な経験を通じて研究への取り組み方をご教授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り、的確なアドバイスを頂きました加納純子教授に感謝いたします。論文の組み立てを一からご指導くださった田代三喜博士に感謝いたします。本研究で主に用いた *stn1-1* の株を引き継がせていただいたとともに、実験を一から丁寧にご指導くださった滝川雅大博士に感謝いたします。お忙しい中、リバイズ実験とリビジョン原稿の改訂に多大な時間と労力を割いてくださり、受理まで持って行ってくださった三好知一郎博士、中岡秀憲博士に心より感謝申し上げます。

また、共通試薬の作製や研究室環境の管理を行ってくださった田村美樹氏、渡邊祐三氏にお礼申し上げます。研究室における事務処理を快く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、福村姿子氏、林奈緒美氏、平田陽子氏にお礼申し上げます。本論文を提出するにあたり、諸々の作業を担ってくださった秘書の津田貴子氏および澁谷かれん氏に感謝申し上げます。

研究生活で悩んだときにいつも愚痴を聞いてくださった Hong Hyenjong 博士、石川研 OB, OG のみなさま、そしていつも激励してくださった竹安邦夫教授に心よりお礼を申し上げます。またディスカッションから飲み会までお付き合いくださり、大変お世話になりました石川研究室の皆様にも心よりお礼申し上げます。最後に、これまで何も言わずに支えてくれ、見守ってくれていた家族に深く感謝申し上げます。

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。

Fission yeast Stn1 maintains stability of repetitive DNA at subtelomere and ribosomal DNA regions

Io Yamamoto, Hidenori Nakaoka, Masahiro Takikawa, Sanki Tashiro, Junko Kanoh, Tomoichiro Miyoshi, and Fuyuki Ishikawa

Nucleic Acids Research, Volume 49, Issue 18, 11 October 2021, Pages 10465–10476.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkab767>

© The Author(s) 2021. Published by Oxford University Press on behalf of Nucleic Acids Research.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com