

(続紙 1)

|  |  |    |       |
|--|--|----|-------|
| 京都大学   | 博士 (生命科学)  | 氏名 | 山本 唯央 |
| 論文題目   | リボソーム DNA およびサブテロメアにおける<br>繰り返し配列維持に係る分裂酵母 <i>Stn1</i> の機能 |    |       |
| (論文内容の要旨)  |  |    |       |
| <p>Ctc1-Stn1-Ten1 複合体 (CST 複合体) は出芽酵母、哺乳類を含む幅広い真核生物種で保存された一本鎖テロメア DNA 結合蛋白質である。これまでの研究により、CST 複合体は、DNA 合成酵素 <math>\alpha</math> と結合してテロメアおよびサブテロメア領域の DNA 複製に関わることで、テロメア以外のゲノム領域においても機能する可能性が高いことが明らかにされていたが、具体的にどのような領域に関わるのかは不明であった。分裂酵母では、これまでに Ctc1 のホモログは同定されておらず、Stn1 および Ten1 のみが知られていた。申請者は、分裂酵母 <i>stn1</i> 遺伝子温度感受性株 <i>stn1-1</i> を用いて、テロメア領域以外における Stn1 の機能を明らかにすることを目的に本研究を行った。</p> <p>まず、<i>stn1-1</i> が非制限温度下であってもデオキシリボヌクレオチド合成を阻害する複製阻害剤である Hydroxyurea (HU) に対し感受性をもつことを明らかにした。次に、これまで知られているテロメア、サブテロメア以外の領域で Stn1 が機能し、HU 感受性の原因の一部となっているか否かを検討するために、テロメレース遺伝子 <i>trt1</i> を欠損することでテロメアおよび多くのサブテロメア領域が欠失している環状染色体株について検討した。その結果、環状染色体をもつ <i>stn1-1</i> に HU 感受性が認められることから、申請者は、テロメア、サブテロメア以外のゲノム領域において Stn1 が重要な役割を果たしていると考えた。さらに、テロメア、サブテロメアと同じように直列繰り返し配列からなる rRNA 遺伝子 (rDNA) 領域に注目し、その長さを同一クローンについて経時的に測定すると、野生株に比べて <i>stn1-1</i> では長さが動的に変化し、同領域に DNA 二本鎖切断マーカーであるリン酸化ヒストン H2A (<math>\gamma</math>H2A) および DNA 相同組換え因子 Rad52 が蓄積していることを明らかにした。このことから、申請者は、<i>stn1-1</i> では rDNA 領域において複製フォークの停止が高頻度に起きていることを示唆した。</p> <p>分裂酵母 rDNA の各リピートには複製開始点が存在し、rRNA の転写反応とそれと反対の向きに進行する DNA 複製フォークの衝突が起こらないように、特定の向きをもつ複製フォークの進行を停止させる RFB (replication fork barrier) が存在し、Reb1 が RFB に結合することがその停止に必要であることが分かっている。申請者は <i>reb1</i> 欠損株では、<i>stn1-1</i> における rDNA コピー数の不安定化や <math>\gamma</math>H2A 蓄積が抑制されることを見出し、Stn1 が RFB によるゲノム不安定化の抑制に必要であることを示した。</p> <p>分裂酵母サブテロメアも複数種類の繰り返し配列から構成されているが、申請者は、本領域においても <i>stn1-1</i> では <math>\gamma</math>H2A の蓄積やコピー数の増幅が見られ、<i>reb1</i> 遺伝子を欠損させることでそれらの表現型が抑制されることを示した。</p> <p>以上より、申請者は、分裂酵母 Stn1 は、複製フォークが停止しやすい繰り返し配列を多く含むテロメア、サブテロメア、rDNA 領域において、複製フォークが高頻度に停止した結果 DNA 二本鎖切断と DNA 相同組換えによってゲノム不安定化を示すことを防ぐ役割をもつことを結論づけた。ヒト <i>CTC1</i>、<i>STN1</i> 遺伝子変異は、遺伝性疾患 Coats plus 病の原因となることが知られている。本研究成果は本疾患の原因解明に貢献するものと期待された。</p> |  |    |       |

(論文審査の結果の要旨)

Ctc1-Stn1-Ten1 複合体 (CST 複合体) は、当初、出芽酵母で発見され、申請者が所属していた研究室によって哺乳類にも存在することが示された種を越えて広く保存されているテロメア DNA 結合蛋白質である。その後、CST 複合体は DNA 合成酵素  $\alpha$  と結合し、テロメア DNA 末端におけるラギング鎖合成を促進することが明らかにされていたが、テロメア以外のゲノム領域においても機能する可能性が長らく示唆されていたにも関わらず、その詳細は不明であった。

本研究において、申請者は CST 複合体のより正確な理解を得るために、分裂酵母 *stn1* の温度感受性株 *stn1-1*、ゲノムを環状 DNA として維持している環状染色体株、3本の染色体のサブテロメアを全て欠失する株などを駆使して、Stn1 が繰り返し配列で構成されているために高頻度で DNA 複製フォークの停止、DNA 二本鎖切断がおこりやすい rDNA 領域でゲノム不安定性を防ぐ重要な役割を果たしていることを見出した。さらに、これまで DNA 複製フォーク停止の有無が詳細に解析されてこなかったサブテロメアにおいても、rDNA 同様の機構で Stn1 がゲノム不安定性を抑制していることを明らかにした。

これらの研究成果は、申請者が遺伝学・分子生物学について豊富な知識と優れた実験技術を有し、それをもってはじめて CST 複合体の生物学的機能をこれまでより統合的に理解することを可能にせしめたものと判断できる。

以上のように、本論文は生命科学に関する高度で幅広い学識、遺伝学分野における優れた研究能力、そして生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見もしくは概念等が示されており、論理的かつ一貫性を持って記述されている。よって博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。更に、令和3年10月8日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

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

要旨公開可能日： \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日