

【目的】 DNA複製では、全 DNA 配列を正確にコピーする必要がある。しかし、DNA 上には様々な障害が存在するため複製装置の進行は頻繁に阻害され、最も危険な DNA 損傷である DNA 二本鎖切断 (DNA double-strand break : DSB) が生じる。DSB は誤って直されるとゲノム再編成を誘導しゲノムを不安定化し、がんや多くのゲノム疾患を引き起こす。細胞周期の中で S 期は、複製阻害によって DSB が最も頻繁にできやすい時期である。しかしこれまで複製阻害時の DSB を高頻度で検出できる領域が見つかっていなかったため、その修復過程を DNA レベルで解析することが難しく複製阻害時の DSB 修復機構は不明であった。リボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) は真核生物で保存された反復配列であり、出芽酵母の rDNA は約 150 個の rDNA 配列からなる巨大なクラスターを形成している。rDNA 配列は、リボソーム RNA 転写ユニットの他に複製開始点と複製阻害点が存在する。そして複製開始点から開始した複製は、複製阻害点に結合している Fob1 タンパク質によって進行阻害を受け、その結果 DSB が生じる。DSB の修復過程で異常が起これると rDNA コピー数変動が起こりやすく rDNA 領域が不安定になると考えられているが、DSB 修復機構は不明であった。研究代表者は先行研究において、rDNA 領域で生じる DSB をサザンブロッティングによって 検出しその修復過程を DNA レベルで解析する実験系を立ち上げた。そして DSB 修復に必要な因子を調べたところ、複製阻害時の DSB 修復には S 期以外の DSB 修復に必要な非相同末端結合や相同組換え因子は必要ではなかったことから、この DSB は新規の経路によって修復されることを明らかにした。そこで本研究課題では、この新規 DSB 修復機構を明らかにすることにより、複製阻害時の DSB からゲノム恒常性を維持する機構を明らかにすることを目指した。出芽酵母の rDNA 領域で生じる DSB の修復因子が欠損した細胞は、Fob1 発現時には DSB が生じその修復ができないため増殖阻害を示すが、Fob1 が発現しない条件では野生型と同様の増殖能を示すと予想される。そこで当初の研究実施計画では、この表現型を示す遺伝子欠損株を網羅的に探索することによって DSB 修復因子を同定するスクリーニングを行う予定であった。しかし、その前に DSB 修復因子欠損株において予想される増殖パターンが観察されることを確認することにした。

【方法】 研究代表者は先行研究において、複製装置の構成因子である Ctf4 タンパク質は DSB の修復過程で作用し、DSB 修復時に rDNA 過剰増幅が起こることを防ぐ因子であることを明らかにした。そこで、*ctf4* 遺伝子欠損株と *ctf4 fob1* 二重変異株の増殖能を比較した。そのため、*CTF4* 遺伝子と *FOB1* 遺伝子の変異をヘテロに持つ二倍体を構築し四分子解析を行うことによって、*ctf4* 遺伝子欠損株と *ctf4 fob1* 二重変異株を単離しそのコロニーサイズを比較した。

【結果】 すると *ctf4Δ* 変異株は、野生型に比べて増殖阻害を示した。そしてこの増殖阻害は、*ctf4Δ fob1* 二重変異株においては抑制されていた。よって、DSB 修復に関与する Ctf4 タンパク質が欠損した細胞は *FOB1* 遺伝子の発現によって増殖阻害が誘導されることが明らかとなった。よって今後の研究においては、*FOB1* 遺伝子の発現によって増殖阻害が引き起こされる遺伝子欠損株を網羅的に探索するスクリーニングを行う予定である。

Ctf4 タンパク質は DSB 修復制御因子であり rDNA 過剰増幅を抑制する

