

氏名	若林 道香
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記号番号	博理工甲第 768 号
学位授与年月日	平成 22 年 3 月 24 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	アカパンカビにおける DNA 損傷チェックポイント機構の解析
論文審査委員	委員長 教授 井上 弘一 委員 教授 松本 幸次 委員 教授 弥益 恭 委員 准教授 田中 秀逸

## 論文の内容の要旨

DNA 損傷チェックポイント機構は、損傷した DNA を保持したまま細胞が細胞周期を進行させてしまうのを防ぐための仕組みである。そのためこの機構は、真核生物において広く保存されており、癌化抑制やゲノム安定性の維持に非常に重要であると考えられている。ヒトでは、DNA の損傷に応答して ATR、ATM の 2 つのホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ関連キナーゼがそれぞれエフェクターキナーゼである CHK1、CHK2 をリン酸化することで DNA 損傷チェックポイントが機能することが知られている。

近年、アカパンカビを用いた研究では遺伝子サイレンシングと概日周期リズムに関するものが飛躍的な進展を見せており、他の生物に先行する結果が発表されている。そしてこの 2 つの機構がどちらも DNA 損傷チェックポイントと関連することが最近報告された (Pregueiro *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009)。このことからアカパンカビにおける DNA 損傷チェックポイント機構は他の分野の研究者からも注目を集めつつあるが、その仕組みに関する研究はほとんど行われていない。そこで私は DNA 損傷に対するアカパンカビのチェックポイント機構に関する遺伝子を解析し、その仕組みの解明を試みた。この研究から、他の生物と共通した仕組みだけでなく、アカパンカビ独自の仕組みを示唆する、興味深い遺伝子間の関係が存在する事が明らかになった。

加えて、本研究では、DNA 損傷を与えない細胞においてはこの機構がどのような役割を担っているかについても解析を行った。本来、自然環境にて生育する生物にとって実験で誘導されるレベルの DNA 損傷が生じる事は稀であり、多くの生物で保存されている DNA 修復機構は細胞内で自然に発生する DNA 損傷に対しても機能していると考えられる。本研究では、アカパンカビにおいて DNA 損傷チェックポイント遺伝子を複数欠損した株では明らかな生育異常が見られる事に注目し、その原因の一つが DNA 複製の不安定化であることを明らかにした。

### 1. アカパンカビ DNA 損傷チェックポイント機構に関わる遺伝子の同定と遺伝子間の関係

DNA 損傷チェックポイント機構の主要な因子は ATR、ATM、CHK1、CHK2 の 4 つである。これらの遺伝子のアカパンカビホモログはそれぞれ *mus-9* (ATR)、*mus-21* (ATM)、*mus-58* (CHK1)、*mus-59* (CHK2)、*prd-4* (CHK2) であり、最後の 2 つはどちらも CHK2 のホモログである。これらの遺伝子破壊株を用いて遺

伝子間の関係を解析した。以下にその結果をまとめる。

- (1) *mus-9* と *mus-21* はそれぞれ、*mus-58* と *prd-4* に対して遺伝学的に上位である。
- (2) *mus-9* と *prd-4* は異なる経路で働く。
- (3) *mus-9 mus-59*、*mus-21 mus-58* 二重変異株はそれぞれ *mus-9*、*mus-21* 変異株と比べ、変異原感受性が低下する。

これらの結果からアカパンカビの DNA 損傷チェックポイント機構には MUS-9-MUS-58、MUS-21-PRD4 の 2 つの経路が存在する事が予想された。このモデルは ATR、ATM それぞれが CHK1、CHK2 の上位で働くという哺乳類のモデルに類似していた。その一方で、(3) のような複数の遺伝子の欠損で感受性が低下するような関係は、これまでの DNA 損傷チェックポイントの研究では報告されていなかった。しかし、本研究の発表と同時期に、同様の結果が *Aspergillus nidulans* でも報告された。*Aspergillus nidulans* はアカパンカビと同じく糸状菌のモデル生物である事から、このようなユニークな遺伝子間の関係は糸状菌の間で保存されている可能性が高いと考えている。

さらに、このユニークな遺伝子間の関係が、実際のリン酸化シグナル経路を反映したものかどうかを明らかにするため、MUS-58、MUS-59 のリン酸化をそれぞれ解析した。その結果、MUS-58、MUS-59 はどちらも MUS-9 と MUS-21 の両方からリン酸化を受ける事が明らかになった。しかし、MUS-9 と MUS-21 それぞれによるリン酸化が MUS-58 と MUS-59 の機能にどのような影響を与えるかについては更なる研究を要する。

## 2. アカパンカビのゲノム安定性維持におけるチェックポイント機構の役割

DNA 損傷チェックポイントが損傷を与えない、通常の生育においてどのような働きを持っているかを明らかにするため、*mus-9 mus-21* 二重変異株の致死性に注目した。この解析では *mus-9* の温度感受性変異株 (*mus-9<sup>ts</sup>*) を *mus-21* と交配する事で得た *mus-9<sup>ts</sup> mus-21* 二重変異株を使用した。この *mus-9<sup>ts</sup> mus-21* 二重変異株は許容温度 (25°C) においても、生育の異常を示し、さらに DNA の二本鎖切断が自然に蓄積する事が明らかになった。よって、この損傷蓄積による染色体構造の異常が *mus-9 mus-21* 二重変異株の致死性の原因であると考えている。

さらに、この自然発生的な DNA 二本鎖切断の生じる原因として、DNA 複製フォークの不安定化に注目し解析を行った。複製フォークの安定化には ATR の関わる複製チェックポイント機構が極めて重要であると言われている。そこでこの複製チェックポイントに関わる *rad9*、*mrc1* について解析した。その結果これらの遺伝子の欠損株では DNA 複製を阻害する事で DNA の二本鎖切断の指標であるヒストン H2A のリン酸化が発生する事が明らかになり、さらにそのリン酸化は *mus-21* に依存していた。加えて *mrc1 mus-21* 二重変異株では *mus-9<sup>ts</sup> mus-21* 二重変異株と類似した生育の異常と染色体の断片化が確認された。この事から *mus-9*、*rad9*、*mrc1* が関与する複製チェックポイント機構によってアカパンカビの複製フォークは安定化され、これらの遺伝子の欠損によって複製フォークが不安定化した際には *mus-21* とヒストン H2A が関わる機構によって染色体構造の安定性と細胞の生育が正常に保たれる事が予想された。

## 論文の審査結果の要旨

本学位論文審査委員会は、平成22年2月10日（水）13:00～14:30に埼玉大学理工学科棟研究交流サロン室において論文発表会を開催した。審査結果の概要は以下の通りである。

本論文は、アカパンカビのDNA損傷チェックポイント機構の関連遺伝子に関し、その役割を遺伝学および生化学的に解析したものである。DNA損傷チェックポイント機構は、真核生物において広く保存されており、癌化抑制やゲノム安定性の維持に重要であると考えられている。本研究から、他の生物と共通した仕組みだけでなく、アカパンカビ独自の仕組みを示唆する興味深いチェックポイント遺伝子間の関係が明らかになった。さらに、人為的に変異原などのDNA損傷を与えない細胞において、この機構がどのような役割を担っているかについても解析を行い、それらが通常の栄養増殖の際もDNA複製の安定維持に関与することを明らかにした。

本論文の研究は大きくは以下の二つよりなる。

### 1、アカパンカビ DNA 損傷チェックポイント機構に関わる遺伝子の同定と遺伝子間の関係

DNA損傷チェックポイント機構の主要な因子はATR、ATM、CHK1、CHK2の4つである。これらの遺伝子のアカパンカビホモログはそれぞれ *mus-9* (ATR)、*mus-21* (ATM)、*mus-58* (CHK1)、*mus-59* (CHK2)、*prd-4* (CHK2) である。*mus-58*、*mus-59* は、本研究によってはじめて同定された。これらの遺伝子破壊株を用いて遺伝子間の関係を解析したところ、(1) *mus-9* と *mus-21* はそれぞれ、*mus-58* と *prd-4* に対して遺伝学的に上位であること、(2) *mus-9* と *prd-4* は異なる経路で働くこと、(3) *mus-9 mus-59*、*mus-21 mus-58* 二重変異株はそれぞれ *mus-9*、*mus-21* 変異株と比べ、変異原感受性が低下することが明らかとなった。これらの結果から、アカパンカビのDNA損傷チェックポイント機構にはMUS-9 - MUS-58、MUS-21 - PRD4の2つの経路が存在する事が示唆された。このモデルはATR、ATMそれぞれがCHK1、CHK2の上位で働くという哺乳類のモデルに類似していた。その一方で、(3)のような複数の遺伝子の欠損で感受性が低下するという関係は、これまでのDNA損傷チェックポイントの研究では報告されていない新規の発見であった。同様の結果は同時期に *Aspergillus nidulans* でも報告され、このようなユニークな遺伝子間の関係は糸状菌の間で保存されている可能性が示された。

### 2、アカパンカビのゲノム安定性維持におけるチェックポイント機構の役割

DNA損傷チェックポイント機構が、通常の生育下においてどのような働きを持っているかを明らかにするため、*mus-9 mus-21* 二重変異株の解析を計画した。しかしこの二重変異株は致死になることが強く示唆され、これを回避するため、*mus-9* の温度感受性変異株 (*mus-9<sup>ts</sup>*) を作製し *mus-9<sup>ts</sup> mus-21* 二重変異株を得ることに成功した。この *mus-9<sup>ts</sup> mus-21* 二重変異株は許容温度 (25°C) においても生育の異常を示し、さらにこの株ではDNAの二本鎖切断が通常培養下でも生じ、蓄積する事が明らかになった。これらのことから、この損傷蓄積による染色体構造の異常が *mus-9 mus-21* 二重変異株の致死性の原因であることが示唆された。

さらに、この自然発生的なDNA二本鎖切断の生じる原因として、DNA複製フォークの不安定化に注目し、複製装置の安定化や複製に異常が生じた際のATRからのシグナルのメディエーターをコードするとされている *rad9*、*mrcl* について解析した。その結果、これらの遺伝子の欠損株ではDNA複製を阻害することでDNAの二本鎖切断の指標であるヒストンH2Aのリン酸化が発生し、そのリン酸化は *mus-21* に依存していることが判った。さらに *mrcl mus-21* 二重変異株では、*mus-9<sup>ts</sup> mus-21* 二重変異株と類似した生育の異常と染

色体の断片化が認められた。このことから複製フォークの不安定化に対して、チェックポイント機構が働くことで、細胞の生育と染色体の安定化が維持されていることが明らかになった。

以上本論文では、これまでアカパンカビにおける DNA 損傷修復機構の解明の分野で解析が遅れていた損傷チェックポイント機構に関し、*ATR*、*ATM*に加えて、新たに *chk1*、*chk2* のホモログを同定し、それらの間の遺伝学的関係を明らかにした。また、ヒトまで保存されている面と、アカパンカビもしくは糸状菌における独自の特徴をも新たに見いだし、さらに、DNA 損傷チェックポイント機構は、人為的な DNA 損傷のない通常増殖時においても、複製フォークの安定化を介してゲノム情報の維持に関わることを明らかにした。これらの結果の一部は、2編の論文（内1編が筆頭著者）にすでにまとめられ査読付きジャーナルで発表され、さらに2編の論文の準備が進められている。

以上のことから、審査委員会としては、本学位申請論文は博士（理学）の論文として十分なレベルに達していると判断し、合格と判定した。