

修士論文

令和2年度

DNA 過剰複製により生じる致死性は
DNA ダメージ応答経路ではレスキューできない

Cellular lethality caused by DNA over-replication cannot be rescued
by DNA damage response pathways

高知工科大学 大学院
工学研究科 基盤工学専攻
生命科学コース

1235037 岡本 愛加
担当教員：田中 誠司 教授

目次

1. 要旨	3
2. 緒言	4
3. 材料と実験方法	7
3-1. 出芽酵母株	7
3-3. 培地の組成	10
3-4. 出芽酵母形質転換 (YEAST TRANSFORMATION)	12
3-5. 同調培養法 (YEAST SYNCHRONIZED GROWTH)	13
3-6. フローサイトメトリー (FACS : FLUORESCENCE ACTIVATED CELL SORTING)	13
3-7. CHROMOSOME DNA PREPARATION IN AGAROSE PLUG FOR CHEF	14
3-8. パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE : PULSED-FIELD GEL ELECTROPHORESIS)	15
3-9. PFGE にかけてゲルのバンド定量	15
3-10. 蛍光観察	16
4. 結果	17
4-1. DNA 過剰複製は DSB を生じる	17
4-2. DSB 修復経路欠損株の生存率は過剰複製誘導後と一般的な DSB 誘導後で異なる	20
4-3. DSB 修復経路は過剰複製後の細胞生存率に寄与しない	21
4-3-1. HR 欠損株	21
4-3-2. <i>Δyku70</i> 株 (NHEJ 欠損)	52
4-4. DNA ダメージチェックポイント制御因子 RAD53 は過剰複製後の細胞生存率に寄与しない	60
4-5. 染色体安定維持に関わる種々の因子はいずれも過剰複製後の細胞生存率維持に寄与しない	68
5. 考察	82
5-1. 過剰複製を誘導した細胞において、DSB 修復経路は生存率維持に寄与できない	82
5-2. 少量の DNA 過剰複製誘導時には、DSB 修復経路が正しく働いている傾向がある	83
5-3. プレート上と同調培養実験で、生存率（生育）がやや異なることがある	83
5-4. 今回調べた DNA 安定維持に関わる因子の中には過剰複製後の細胞生存率維持に関わるものはなかった	84
謝辞	86
引用文献	87

1. 要旨

世代を超えてゲノムを安定に維持していくために、真核生物の染色体 DNA 複製は 1 回の細胞周期につき 1 度だけ起きるように厳密に制御されている。この制御の破綻は、強力な遺伝毒性につながるため、細胞生存率の著しい低下や細胞のがん化につながると考えられている。我々はこの「1 細胞周期につき 1 度だけの DNA 複製」制御が破綻すると何が起きるのかを、細胞周期の G1 期に時期尚早な複製を人工的に誘導可能な出芽酵母を用いて解析を行ってきた。その結果、i) G1 期に複製誘導すると、その後の S 期でも再び複製が起きるため、細胞は最終的に過剰複製した DNA を持つこととなり、ii) 大幅な細胞生存率の低下が起きること、iii) またこの際、少数のサバイバー細胞が現れるが、それらは高頻度にゲノム不安定性を示すことがわかっていった。そこで私はこのゲノム不安定化細胞がどのような過程を経て生じてくるのかを理解することを目的として解析を行った。

過剰複製を誘導した細胞では、S 期以降にチェックポイントキナーゼ Rad53 のリン酸化や、チェックポイントクランプ 9-1-1 複合体のサブユニットである Ddc1 の集積が生じることから、DNA 二本鎖切断 (double strand break : DSB) が生じていることが強く示唆されている (Tanaka and Araki, 2011)。そこで、DSB 修復経路である相同組換え (Homologous Recombination : HR) と非相同末端結合 (non-homologous end joining : NHEJ) において中心的な役割を果たす、*RAD51*, *RAD52*, *YKU70* を欠損した細胞を用いて過剰複製を誘導したところ、驚くべきことに、これらの有無は細胞生存率に寄与しないことがわかった。一方、相同組み換え欠損株から得られるサバイバークローンが示す染色体異常のパターンで、GCR の発生頻度が高い傾向を示した。このことは、過剰複製を誘導した細胞においても DSB 修復経路は正常に機能しているものの、最終的な生存率には寄与できていないことを示すものと考えている。さらに、チェックポイント経路をはじめとする種々の DNA ダメージ応答経路に関わる因子まで範囲を広げて、同様の解析を行ったが、これまでにその存在が過剰複製後の細胞生存率に寄与できるものは見出せなかった。

以上の結果は、一旦過剰複製が起きてしまうと、細胞が備える DNA ダメージ応答経路では、生存可能な状態の染色体構成に戻すことが非常に困難であることを示している。このことは、逆説的に「1 回の細胞周期につき 1 度だけの DNA 複製」という制御の重要性を示していると考えられる。

2. 緒言

真核生物の染色体 DNA 複製は過不足ない複製を保証するため、一回の細胞周期につき一度だけ起こるように厳密に制御されている。DNA 複製は染色体上の特定の領域(複製起点)から開始する。このため、複製起点の活性化の制御が一回の細胞周期につき DNA 複製を一度だけに制限するための制御のターゲットとなっている。複製起点の活性化は以下に述べるような 2 段階の反応からなる。まず細胞周期の G1 期に複製準備として複製時ヘリカーゼを不活性型で複製開始点にロードし (複製起点のライセンス化)、次にこのヘリカーゼを活性化する(複製起点の“発火”反応 : Firing)ことで S 期が開始する。これら 2 つの反応が、細胞周期の進行を制御するサイクリン依存性キナーゼ (Cyclin-dependent kinase: CDK) の活性と組み合わされることで、細胞周期の異なる時期に、この順序で起きる (ライセンス化は CDK 活性の低い G1 期に、firing は、CDK 活性が上昇した S 期以降に起きる) ように制御されることで、DNA 複製が「一回の細胞周期につき一度だけおきる」という制御 (Once-per-cell cycle control : 以下 OCC 制御と略す) を可能としている (図 1a) (総説 : (Bell and Labib, 2016; Tanaka and Araki, 2013))。

この OCC 制御が正常に機能していれば、ゲノムの正常な倍化が保証されるため、細胞は正常に増殖してゆけるが、一旦この制御が破綻してしまうと細胞生存率の著しい低下等の重篤な結果をもたらす (図 1b) (Mimura et al., 2004; Nguyen et al., 2001; Tanaka and Araki, 2011; Tanaka et al., 2007)。一旦 OCC 制御が破綻すると、ライセンス化と firing 反応が同時に複数回起きることにより DNA 再複製が誘導され、過剰に複製された DNA は最終的に異常な構造を持つ染色体となり、結果、生存率が大きく低下すると考えられる。

本研究では、Cdc45^{JET1} と Sld2-11D を同時に発現させることで、細胞が G1 期にあっても時期尚早な複製開始を誘導できる系 (Tanaka et al., 2007)を用いた。この細胞では、ゲノム上の *CDC45* 遺伝子が *CDC45^{JET1}* に置換されており、ガラクトース誘導性のプロモーターでその発現が制御される Sld2 のリン酸化模倣型変異体である Sld2-11D が第 2 の *SLD2* 遺伝子としてゲノムに組み込まれている。そのため、 α ファクター添加による G1 期停止中にガラクトースを培地に添加することで、CDK の活性がなくても複製起点の firing が起こる。この時、細胞は CDK 活性の低い G1 状態にあるため、一旦 fire した複製起点であっても、再ライセンス化が起きる。そのため、G1 期停止中、あるいは α ファクター除去による細胞周期停止からのリリース後に CDK 活性化により起きる本来の S 期で再び活性化し、過剰複製となる。過剰複製となった領域からは先行する複製フォークを追いかける複製フォークという異常な構造が形成されることが考えられる (Davidson et al., 2006)。このような異常な構造は、ヘリカーゼの衝突や M 期での分配不良につながり、最終的には染色体 DNA の二本鎖切断 (Double Strand Break : DSB) が生じると考えられる (図 2a)。実際、G1 期での再複製を誘導した系でわずかに生き残ったサバイバークローン (図 1b) の染色体をパルスフィールドゲル泳動法で解析すると、染色体異数性や、染色体転座が起きているものが多数出現することが観察されている (図 1c) (Tanaka and Araki, 2011)。このことは、OCC 制御の破綻は強力な細胞毒性を示し、細胞が生き残ったとしてもゲノム不安定化が引き起こされるということを示している。

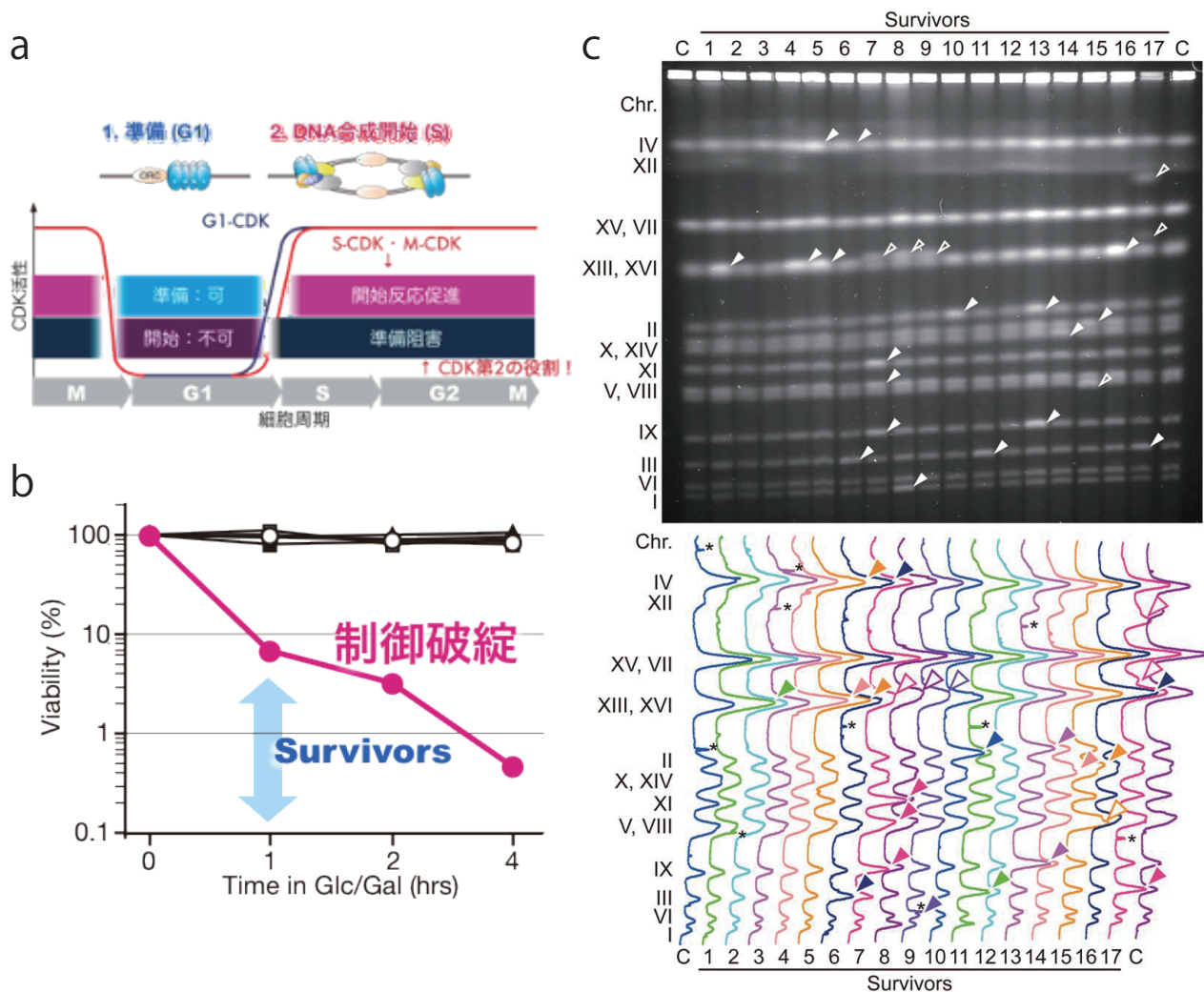


図1. OCC 制御機構の破綻による過剰複製は強力な細胞毒性を示し、ゲノムが不安定化したサバイバーを高頻度に生み出す。

(a) OCC 制御機構の模式図。(b) OCC 制御機構を破綻させると細胞生存率は大幅に低下する。(赤線, Tanaka & Araki, 2011 図 S1B を改変)。(c) DNA 過剰複製後に現れたサバイバーの細胞染色体構成。異常な染色体を矢印で示す。白矢印は染色体本数が増加している染色体異数性を、中抜き矢印は本来とは違う長さになっている転座や欠失を示す (Tanaka & Araki, 2011)。

上述の G1 期での再複製を誘導した系でのサバイバークローンで見られた染色体異数性や、転座等のゲノム不安定性は、がん細胞の大きな特徴として知られているゲノム不安定性と酷似している。また、がん細胞では、複製因子の過剰発現がしばしば観察され、複製ストレスと細胞がん化は密接な関係にあること広く知られている (Hills and Diffley, 2014; Macheret and Halazonetis, 2015) ことから、複製制御機構の異常がゲノム不安定性を引き起こし、細胞がん化に関わっている可能性も示唆される。このように、過剰複製がゲノム不安定化につながることはわかったが、細胞が過剰複製というストレスにどのように対処し、結果ゲノムの不安定化がどのような過程を経て起きるのかについては分かっていない。そこでこれらの点を理解することを目的として、真核細胞の良いモデルである出芽酵

母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて解析を行なった。その結果、DNA ダメージチェックポイント経路、その他の DNA 安定維持に関わる経路が、過剰複製の誘導後の細胞生存率に影響しないことが分かった。これらの結果は、逆説的に「一回の細胞周期に一度だけの DNA 複製」という制御の重要性を示している。

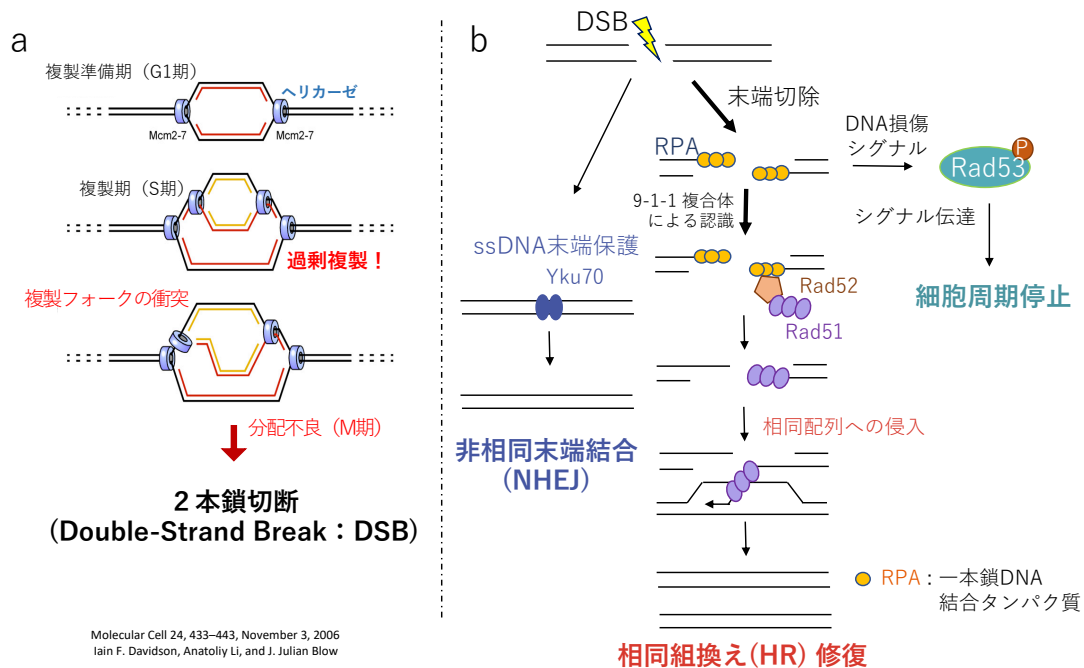


図 2. 過剰複製は DSB を引き起こし、DSB 修復経路によって修復される。

(a) DNA 過剰複製により形成されることが考えられる異常な複製フォーク。このような染色体は、娘細胞へ正しく分配できないため、最終的に DSB へつながることが考えられる。(b) DSB ダメージ応答経路と既知の修復経路の簡易的模式図。DSB が生じると、DNA ダメージ応答経路のチェックポイント制御が働き、細胞周期が停止する。また、2 種類の DSB 修復経路である、非相同末端結合 (NHEJ) あるいは相同組換え (HR) により修復される。

3. 材料と実験方法

3-1. 出芽酵母株

Name	Genotype	Reference
W303 Δ bar1	<i>MATa ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i> <i>Δbar1::hisG</i>	Laboratory stock
YST513	W303 Δ bar1 <i>ura3-1::GAL-MHT (URA3)</i> x1 copy	Tanaka & Araki (2011)
YST563	W303 Δ bar1 <i>CDC45^{JET1} ura3-1::GAL-sld2-11D-MHT (URA3)</i> x2 copies	Tanaka & Araki (2011)
YST1700	YST563 <i>DDC1-GFP::kanMX</i>	Tanaka & Araki (2011)
YST2509	YST563 Δ rad9::kanMX	This study
YST2510	YST563 Δ rad52::kanMX	This study
YST2511	YST563 Δ sml1::kanMX	This study
YST2536	YST563 Δ rad9::kanMX	This study
YST2538	YST563 Δ chk1::kanMX	This study
YST2539	YST563 Δ hrq1::kanMX	This study
YST2540	YST563 Δ mus81::kanMX	This study
YST2541	YST563 Δ yen1::kanMX	This study
YST2542	YST563 Δ rad51::kanMX	This study
YST2543	YST563 Δ rad24::kanMX	This study
YST2544	YST563 Δ sae2::kanMX	This study
YST2545	YST563 Δ csm3::kanMX	This study
YST2546	YST563 Δ mre11::kanMX	This study
YST2547	YST563 Δ tof1::kanMX	This study
YST2548	YST563 Δ htz1::kanMX	This study
YST2549	YST563 Δ elg1::kanMX	This study
YST2550	YST563 Δ rmil::kanMX	This study
YST2551	YST563 Δ mad1::kanMX	This study
YST2552	YST563 Δ sgs1::kanMX	This study
YST2553	YST563 Δ srs2::kanMX	This study
YST2554	YST563 Δ mad2::kanMX	This study
YST2555	YST563 Δ bub1::kanMX	This study
YST2601	YST563 Δ rdh54::kanMX	This study
YST3172	YST513 Δ chk1::KanMX	This study
YST3173	YST513 Δ ctf4::KanMX	This study
YST3174	YST513 Δ ctf8::KanMX	This study

Name	Genotype	Reference
YST3175	YST513 $\Delta ctf18::KanMX$	This study
YST3176	YST513 $\Delta dcc1::KanMX$	This study
YST3177	YST513 $\Delta fun30::KanMX$	This study
YST3178	YST513 $\Delta mad2::KanMX$	This study
YST3179	YST513 $\Delta mcm21::KanMX$	This study
YST3181	YST513 $\Delta mus81::KanMX$	This study
YST3182	YST513 $\Delta rad9::KanMX$	This study
YST3183	YST513 $\Delta rad24::KanMX$	This study
YST3184	YST513 $\Delta rad52::KanMX$	This study
YST3185	YST513 $\Delta rdh54::KanMX$	This study
YST3186	YST513 $\Delta rtt109::KanMX$	This study
YST3187	YST513 $\Delta mrc1::KanMX$	This study
YST3188	YST513 $\Delta mre11::KanMX$	This study
YST3189	YST513 $\Delta rad51::KanMX$	This study
YST3190	YST513 $\Delta slx4::KanMX$	This study
YST3191	YST513 $\Delta tell::KanMX$	This study
YST3192	YST513 $\Delta tof1::KanMX$	This study
YST3193	YST513 $\Delta yku70::KanMX$	This study
YST3194	YST513 $\Delta sml1::KanMX$	This study
YST3219	YST3194 $\Delta rad53::KanMX$	This study
YST3221	YST563 $\Delta rtt109::kanMX$	This study
YST3287	YST513 $\Delta rif1::KanMX$	This study
YST3288	YST563 $\Delta rif1::kanMX$	This study
YST3290	YST563 $\Delta mrc1::kanMX$	This study
YST3292	YST563 $\Delta yku70::kanMX$	This study
YST3461	YST513 $\Delta csm3::KanMX$	This study
YST3463	YST513 $\Delta elg1::KanMX$	This study
YST3465	YST513 $\Delta hrq1::KanMX$	This study
YST3467	YST513 $\Delta htz1::KanMX$	This study
YST3471	YST513 $\Delta pif1::KanMX$	This study
YST3473	YST513 $\Delta rmi1::KanMX$	This study
YST3475	YST513 $\Delta rrm3::KanMX$	This study
YST3477	YST513 $\Delta sae2::KanMX$	This study
YST3479	YST513 $\Delta sgs1::KanMX$	This study
YST3481	YST513 $\Delta srs2::KanMX$	This study
YST3483	YST513 $\Delta yen1::KanMX$	This study

Name	Genotype	Reference
YST3486	YST563 $\Delta ctf4::kanMX$	This study
YST3487	YST563 $\Delta ctf8::kanMX$	This study
YST3489	YST563 $\Delta ctf18::kanMX$	This study
YST3491	YST563 $\Delta dcc1::kanMX$	This study
YST3493	YST563 $\Delta mcm21::kanMX$	This study
YST3497	YST563 $\Delta pif1::kanMX$	This study
YST3499	YST563 $\Delta rrm3::kanMX$	This study
YAO005	YST513 $\Delta mad1::KanMX$	This study
YAO008	YST563 $\Delta fun30::kanMX$	This study
YAO010	YST563 $\Delta slx4::kanMX$	This study
YAO011	YST2511 $\Delta rad53::HIS3$	This study
YAO021	YST1700 $\Delta yku70::HIS3$	This study
YAO023	YST1700 $\Delta rad51::HIS3$	This study
YAO025	YST1700 $\Delta rad52::HIS3$	This study
YAO027	YST1700 $\Delta sml1::HIS3$	This study
YAO029	YST1700 $\Delta sml1::HIS3 \Delta rad53::nat1$	This study

3-3. 培地の組成

- 完全培地 YPA (per Litter)

H ₂ O	900 mL
Yeast Extract	10 g (1%) (BD)
Peptone	20 g (2%) (Oxid)
Adenine	40 mg (Wako)
(Agar	20 g (INA)

↓

Autoclave (120°C, 15 min)後、炭素源として別で調整・滅菌しておいた以下のもの、いずれかを加え 1 L とした。

YPAD	20 % Glucose, 100 mL
YPARaff	20 % Raffinose, 100 mL
YPAGal	20 % Galactose, 100 mL
YPAGlycerol	20 % Glycerol, 100 mL

- 合成培地 Synthetic Complete : SC (per Litter) plate

Bottle A : Ager	20 g
Glucose	20 g
H ₂ O	800 mL

Bottle B : Adenine	0.04 g (Wako)
SC-Ade	1.98 g (Formedium)
H ₂ O	100 mL

上記 A、B をそれぞれ混合し、autoclave(120°C, 15 min)滅菌後、予め別に作製し、フィルター滅菌した 10x YNB^{*1} 100 mL を加え、1 L とした。

・合成培地 Synthetic Complete : SC (per 1000 μ L) liquid

10x YNB ^{*1}	100 μ L
10x SC-HLTU ^{*2}	100 μ L
20% Glucose	100 μ L
Histidine	4 μ L
Leucine	10 μ L
Tryptophan	20 μ L
Uracil	20 μ L
Adenine	8 μ L
H ₂ O	to 1 mL

^{*1} 10x YNB (Yeast Nitrogen Base)

YNB w/o a.a.	67 g (Formedium)
H ₂ O	1 L

上記を混合し、フィルター滅菌。(store in dark, at 4°C)

^{*2} 10x SC-HLTU

Synthetic Complete

Mixture -HLTU	1.394 g (Formedium)
H ₂ O	to 100 mL

上記を混合し、autoclave (120°C, 15 min) 滅菌。(store at R.T.)

上述した培地に薬剤を加える場合、以下の量（最終濃度）を加えた。

・ G418(Kan)	200 μ g/mL
・ nourseothricin (NAT)	100 μ g/mL
・ Hydroxy Urea (HU)	100 mM
・ Zeocin	100 μ g/mL

3-4.出芽酵母形質転換 (Yeast Transformation)

1. 前培養：14 mL PP 試験管に 1 mL の YPAD をいれ、少量の細胞を楊枝で突き取り、培養液へ懸濁し、震盪培養した (at 30°C, o/n)。
2. 本培養：前培養液を水で 1/10~1/50 希釈し、濁度を計測。必要量（回収時の細胞数が 5×10^6 cells (OD=0.2) になるように) を算出し、5 mL YPAD (2 % Glc)に希釈し、50 mL フラスコで震盪培養した (at 30°C, 4.5 hrs)。
3. 50 mL コニカルチューブに培養液を移し、遠心 (4000 rpm, 30 sec. (Kubota 遠心機)) し、集菌した。上清を除去。
4. Wash：細胞を 1 mL の滅菌水に懸濁後、1.5 mL tube に移し、遠心した (10,000 rpm, 30 sec (Eppendorf 遠心機))。
5. 上清を捨て、細胞を適量の Trafo mix に懸濁し、0.2 mL tube へ移し、目的の DNA を入れた。

cell	5×10^6 cells
Trafo mix	50 μ L
DNA fragments	5 μ L

6. 42 °C で 40 分間保温 (PCR 機)。
7. 軽く遠心し、細胞を回収。10,000 rpm, 10 sec. 程度 (Eppendorf)。
8. 薬剤耐性 (Kan, Hph, Nat) の場合：細胞を 1 mL の YPAD に再懸濁し、振盪培養 (at 30°C, 2 hrs)。細胞を回収 (10,000 rpm, 30 sec) した。
9. 細胞を適量の滅菌水 (or アミノ酸水溶液) に懸濁後、適当な培地にガラスビーズを使って均一に拡げたのち、静置培養 (30°C, 2 o/n)。

↓

形質転換したコロニー出現.

Trafo mix

50 % PEG 4000	2400 μ L
1 M Li-acetate	360 μ L
2 mg/mL ssDNA	500 μ L
Distilled pure water	100 μ L

上記をよく混合し、1.5 mL tube へ分注し、-20°C 保管。

3-5. 同調培養法 (Yeast Synchronized Growth)

1. 前培養：14 mL PP 試験管に 1 mL の YPAGlycerol をいれ、独立のコロニーから少量の細胞を楊枝で突き取り、培養液へ懸濁し、震盪培養した (at 30°C, o/n)。
2. 本培養：前培養液を水で 1/10~1/50 希釈し、濁度を計測。必要量 (同調開始時の細胞数が 1×10^7 cells (OD=0.4) になるように) を算出し、12 mL YPARaff (2 % Raff) に希釈し、50 mL フラスコで震盪培養した (at 30°C)。
* 事前に使用する酵母株の倍加時間を測っておくことで、朝の時点で OD=0.4 前後になるように計算して、細胞を前の日から植えて帰り、朝に α factor 投入から開始した。
3. α factor (40 μ g/mL) を 30 μ L (最終濃度 100 ng/mL) 培地へ添加し、同調させた (30°C, 2.5 hrs)。 (1 doubling time + 30 min 程度)
4. α factor 投入直前に FACS 用サンプルの回収^{*1}をした。
5. 培養液を 4.5 mL に分け、20 % Raffinose or 20 % Galactose を 500 μ L 添加した (この時刻を t= 0 hrs とした)。30°C にて培養を継続した。
6. t= 1, 2, 3 and 4 hrs に、FACS 用と viability 用^{*2,3}を回収した。
7. 次の日以降：FACS 用サンプル処理 (3-6)。

*¹ FACS 用サンプル回収：500 μ L の培養液を 1.5 mL tube にとり、遠心し (10,000 rpm, 1 min) 細胞を回収した。上清を除去し、細胞を 200 μ L の 70 % Ethanol に再懸濁した。 -20°C にて保存。

*² viability 用サンプル回収：10 μ L の培養液を H₂O 990 μ L に加え (=1/100 希釈)、sonication 後、この希釈液 10 μ L を H₂O 990 μ L に加え、よく混ぜた (=1/100 希釈)。この最終的に 1/10000 希釈となったサンプルを YPAD プレートに 200 μ L 撒き、培養した (30 °C, 2 o/n)。コロニー形成後、それをカウントし、生存率を算出した。

*³ Galactose を添加した方の培養液から採取したサンプルは、t=0 は、1/10000 希釈したものは 200 μ L、プレートへ撒いた。複製誘導開始後の t=1 は、1/100 希釈後 sonication したものを 10 μ L + H₂O 180 μ L、t=2, 3 and 4 hrs のサンプルは、20 μ L + H₂O 180 μ L をプレートに撒いた。

3-6. フローサイトメトリー (FACS : Fluorescence Activated Cell Sorting)

1. 前項の同調培養法で回収した FACS 用の細胞を遠心し (10,000 rpm, 30 sec)、上清 (Ethanol) を除去した。

- 200 μ L の FACS 用 RNase A 溶液 (0.25 μ g/mL RNase A in 50 mM Na-citrate (pH 7.4)) に細胞を再懸濁した。50 °C に 1 時間おいた。
- 100 μ L の Proteinase K 溶液 (0.5 mg/mL Proteinase K in 50 mM Na-citrate (pH 7.4)) を加え、よく混ぜたのち、さらに 50 °C で 1 時間保温した。
- 300 μ L の Propidiumiodide (PI) (4 μ g/mL PI in 50 mM Na-citrate (pH 7.4)) を加え、Sonication した。
- 96 deep well plate へ 4 を 200 μ L ずつ移した (残りは 4 °C 保管)。
- Flow Cytometer にかかけ、DNA 含量を計測した。
条件は、Threshold : FSC 60,000 & FL2H 150, plot : PE-A (X-6000, Y-3000)
- 得られた解析データは、eps 形式で出力し、Adobe Illustrator でまとめた。

3-7. Chromosome DNA Preparation in Agarose Plug for CHEF

- シングルコロニーから少量の細胞を 1 mL の YPAD へ懸濁。震盪培養 (30 °C , o/n)。
- OD 測定。1 plug あたり必要な細胞は OD=0.4 とし、必要量を算出。必要量を 1.5 mL tube に取り、集菌 (cfg : 10000~15000 rpm, ~30 sec) 後、上清を完全に除去。
- 細胞ペレット (~10 μ L) に 53 μ L の Lysis buffer (w/ Sorbitol 52 μ L, +Enz* 1 μ L) と 37 μ L の 2 % Low Melt Agarose (Bio-Rad's certified Low Melt Agarose #161-3111, melt in H₂O and kept on 60 °C block) を加え、固まる前にピペティングでよく混合し、plug mold に注いだ。

Lysis Buffer (w/ Sorbitol)	per 50 ml	(final conc.)
0.5M EDTA	10.0 mL	(100 mM)
1 M Tris-Cl (7.5)	0.5 mL	(10 mM)
sorbitol	5.47 g	(0.6 M)
2-Mercaptoethanol	100 μ L	(0.2 %)
H ₂ O	35.5 mL	(to 50 mL)

* Enzyme: 20 mg/ml Zymolyase 100T in H₂O, 1 μ L for 1 plug

- cell-agarose mix を注いだプラグを固まらせた (4 °C, >30 min) .
- plugs を 500 μ L の Lysis buffer (w/o sorbitol) 内でインキューベート (37 °C, 4 hrs ~ o/n)。

Lysis Buffer (w/o Sorbitol)	per 50 ml	(final conc.)
0.5M EDTA	10.0 mL	(100 mM)
1 M Tris-Cl (7.5)	0.5 mL	(10 mM)
2-Mercaptoethanol	100 μ L	(0.2 %)
H ₂ O	39.4 mL	(to 50 mL)

6. Lysis buffer を抜いて、500 μ L の ProK buffer (containing 0.5 mg/ml Proteinase K) に置換し、50 $^{\circ}$ C で o/n インキュベートした。

ProK Buffer (w/ Sorbitol)	per 1.0 ml	(final conc.)
0.5M EDTA	200 μ L	(100 mM)
1 M Tris-Cl (8.0)	10 μ L	(10 mM)
10% Na-N-Lauroyl Sarcosine	100 μ L	(1 %)
20 mg/ml Proteinase K	25 μ L	(0.5 mg/ml)
H ₂ O	665 μ L	(to 1.0 mL)

7. PFGE による染色体解析 (3-8)。サンプル plug は 4 $^{\circ}$ C にて保管。

3-8. パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE : Pulsed-Field Gel Electrophoresis)

1. 0.5x TBE を 2.3 L 作製した*。
2. そのうち 120 mL を用いて 0.8 % Agarose Gel (PFGE certified agarose, Bio-Rad) を作製、残りは泳動用バッファとして使用した。
3. 1/3 に切ったサンプルプラグ (3-7) をウェルに挿入し、隙間を 0.8 % アガロースで固めた。
4. 泳動 (Bio-Rad CHEF-DR-II, 設定は 6 V/cm, 50-90 sec_22 hrs, 14 $^{\circ}$ C)。
5. 染色 : 0.3 x GelRed in 100 mL used 0.5x TBE.

*中ゲルの場合、0.5x TBE を 2.2L 作製し、そのうちの 80 mL で 0.8% Agarose Gel を作製した。

3-9. PFGE にかけたゲルのバンド定量

BIO-RAD Image Lab 6.0.1 ソフトウェアを使用して、マニュアルでゲルの写真のバンドからピーク抽出をした。

アプリでゲルの写真を開き、「Lane and Bands」→マニュアルでサンプルレーンに枠を合わせる→「Adjust background...」→ Lane Profile が表示される。「Scale to fit graph」にチェックを入れてピークの高さをグラフに合わせ、Disk size (閾値) =9.0 に設定した。→各レーンのピークをスクリーンショットし、photo shop で編集した。

それぞれ Control と #1~30 までのピークを Photoshop で並べて、ゲルの写真と見比べて染色体異常が確認できたところにチェックをつけた。

染色体異数性→青矢印、GCR→黄色矢印

3-10. 蛍光観察

1. 前培養：14 mL PP 試験管に 1 mL の YPAGlycerol をいれ、少量の細胞を楊枝で突き取り、培養液へ懸濁し、震盪培養した (at 30°C, o/n)。
2. 同調培養実験 (SG) (3-5) の 2~6 と同様の操作をし、SGt= 1, 2, 3 に、FACS 用と viability 用を回収した。
3. Bottom dish 35 mm(内径：14 mm) へ、レクチンを 80 μ L 滴下し、数秒で回収し、乾燥させてコーティングした。
4. SGt=3 で、培養液を 50 mL コニカルチューブに回収して遠心した (10,000 rpm, 1 min)。SC 培養液を 2 mL 加え、vortex し、再度集菌 (wash cells x2 times)。よく洗えば、SC 培養液を 3 mL 加え (OD=0.4)、30°C で振盪培養を再開した。(t=0 min)
5. t=0 min の細胞 (SC 培養液) を 1.5 mL tube に 500 μ L 回収し、sonication した。
6. 5 の細胞を 20 μ L (2.0×10^5 cells) をレクチンでコーティングした bottom dish に滴下した。1 min ほど静置し、上から SC 培養液を 2 mL 加えた。
7. 蛍光観察した。(30°C incubate, ON)
8. t= 120 min にも 500 μ L ずつサンプルを回収し、5~7 と同様の操作をした。
9. 次の日以降：FACS 用サンプル処理 (3-6)。

3-11. その他の方法

研究室標準プロトコル通りに行った。

4. 結果

4-1. DNA 過剰複製は DSB を生じる

本研究で使用した、G1 期に Cdc45^{JET1} と Sld2-11D を同時に発現させることで、G1 期に時期尚早な複製を誘導できる系(Tanaka et al., 2007)で、実際に、G1 期停止させた Cdc45^{JET1} 細胞で Sld2-11D 発現させて過剰複製を誘導すると、G1 期停止からリリースした後に CDK 活性の上昇に伴い起きる本来の S 期を通過した辺りから、チェックポイントクランプと呼ばれ、ダメージ応答シグナルを伝える 9-1-1 複合体の集積や、Rad53 活性化の目安であるリン酸化が起きることが報告されている(Tanaka and Araki, 2011)。このことは、予想通り、過剰複製後の細胞では DSB が生じていることを示している。そこで、DSB 修復経路に関わる因子が過剰複製後の細胞において、生存率の維持にどう影響しているのかをまず検討することとした。

出芽酵母においては、ほとんどの DSB は HR 経路で修復されると考えられているが、非相同末端結合 (non-homologous end joining: NHEJ) の経路も存在しており、一定の役割を果たしていることから (図 2b)、この経路についても解析対象とした。

図 2b に示したように、HR では Rad51、Rad52、NHEJ では Yku70 が必須な役割を果たす。そこで、これらの欠損株ならびに、*RAD53* 欠損株を作製し、過剰複製誘導後に表現型の顕著な差を示すかどうかを調べてゆくこととした。まず、作製した欠損株でも過剰複製誘導後に、野生型株同様に DSB が生じているかどうかを Ddc1 の集積 (Ddc1-GFP の focus=輝点形成) を指標として解析したところ、G1 期停止させた状態で複製開始誘導 3 時間経過後 (図 3) からリリースし、2 時間経過時の細胞において Ddc1 の集積が見られた (図 4)。以上より、HR、NHEJ、DNA ダメージチェックポイント欠損は、過剰複製の誘導とその後の DSB 形成には影響しないことがわかった。

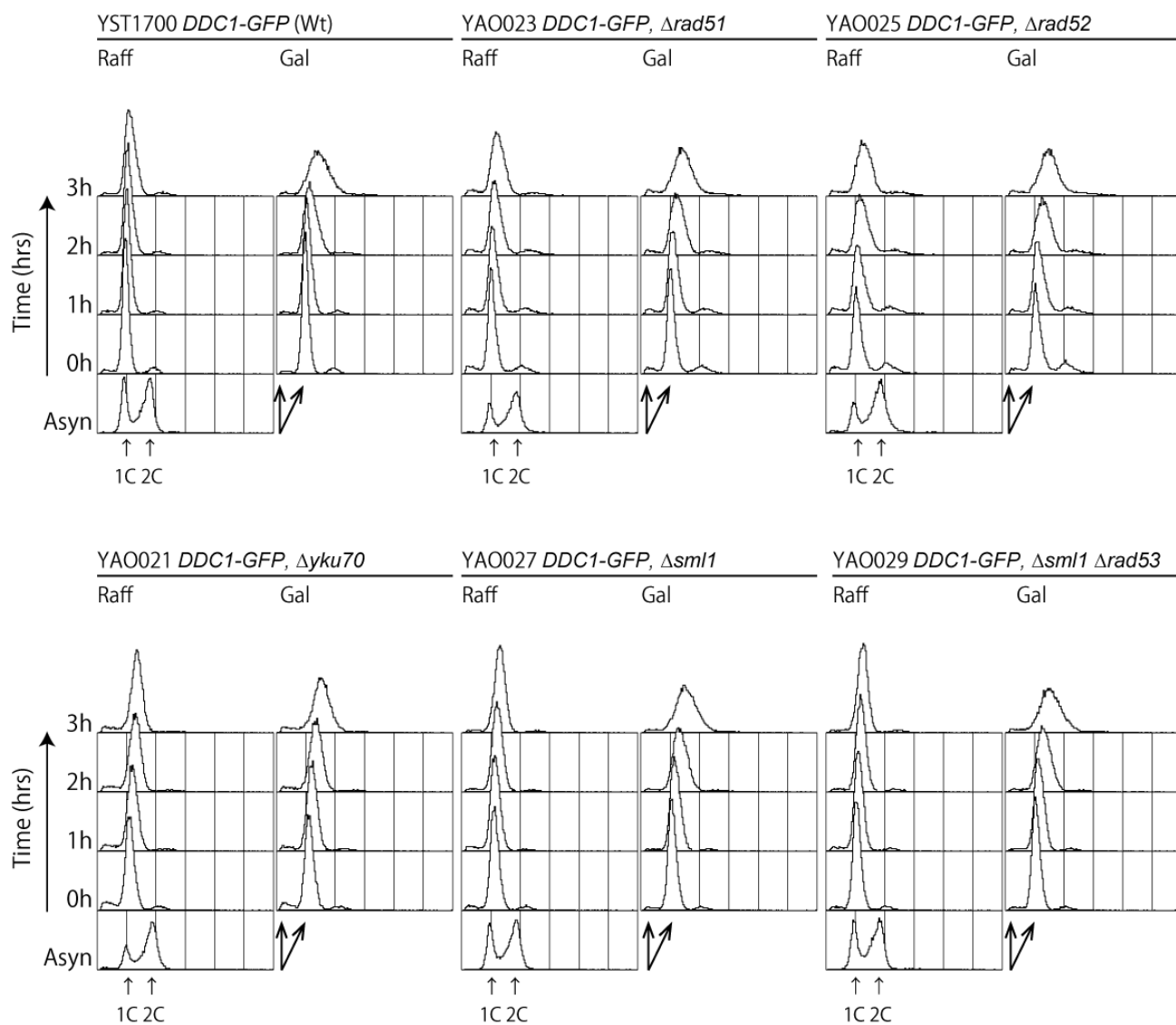


図 3. Ddc1-GFP 蛍光観察に用いた各欠損株における G1 期複製誘導.

野生型, $\Delta rad51$, $\Delta rad52$, $\Delta yku70$, $\Delta sml1$, $\Delta sml1 \Delta rad53$ 細胞を、YPARaff で対数増殖期初期まで培養し (Asyn)、 α ファクターを添加して G1 期停止させ、その培養液に raffinose (Raff) or galactose (Gal) を添加して (t=0 h) 培養を続けた。その後、1 時間おきにサンプリングし (t=1, 2, 3h)、細胞の DNA 含量をフローサイトメーターで計測した。縦軸は細胞数、横軸は DNA 含量を示す。
(210203 Synchronized Growth & microscopy, 210304 FACS)

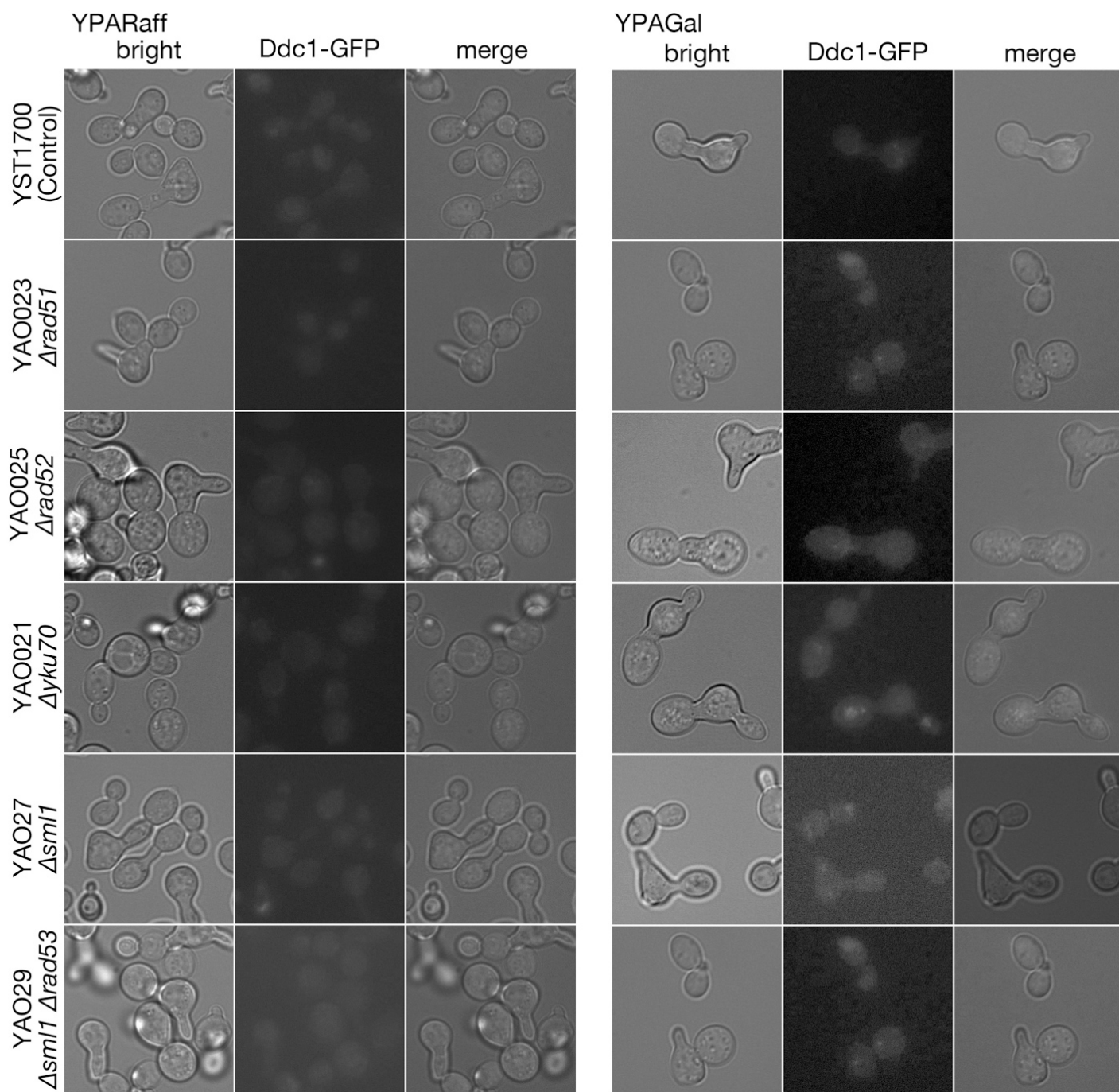


図 4. $\Delta rad51$, $\Delta rad52$, $\Delta yku70$, $\Delta rad53$ 細胞においても過剰複製誘導後の細胞では DSB が生じる。
 図 3 に示した複製誘導後 3 時間 (t=3h) の細胞を G1 期停止から SC 培地にリリースし、2 時間後の細胞を撮影した。左右のパネルは、それぞれリリース前に YPARaff、YPAGal で培養した細胞。
 (210203 microscopy)

4-2. DSB 修復経路欠損株の生存率は過剰複製誘導後と一般的な DSB 誘導後で異なる

DSB 修復経路である HR の必須因子である *RAD51* および *RAD52*、NHEJ の必須因子である *YKU70* を欠損した細胞においても、野生型細胞同様に過剰複製の誘導とその後の DSB 形成が起きていたことより、これらの細胞を用いて、DSB 修復経路の欠損が過剰複製誘導後の細胞生存率に与える影響を解析した。この目的で、これらの細胞を様々な寒天培地上で生育させ、表現型を比較した (図 5)。DSB を引き起こす Zeocin や、複製フォークの進行阻害を引き起こす Hydroxyurea (HU) の存在下では、すでに知られている通り、 $\Delta rad51$ 、 $\Delta rad52$ 株はこれらの薬剤に対して高い感受性を、また、 $\Delta yku70$ 株は Zeocin に対して高い感受性を、HU に対してはごく弱い感受性を示した (図 5a)。

一方、過剰複製を誘導した場合、過剰複製が起きる *JET1 sld2-11D* 株では、コロニー形成が不良となった (図 5b、YPAGal 最上段)。この際、*JET1 sld2-11D* の $\Delta rad51$ 、 $\Delta yku70$ は野生型 (何も欠損していない *JET1 sld2-11D*) と同程度の生育不良であった (図 5b、YPAGal 1,2,4 段目)。すなわち、過剰複製に対する感受性が上がったとは言えない結果となった。*JET1 sld2-11D* の $\Delta rad52$ は *JET1 sld2-11D* の野生型よりもかなり生育が悪くなったが、図 5a ほどではなかった。これらの結果は、過剰複製により DSB が生じているはずであるにもかかわらず、HR、NHEJ という DSB 修復経路が過剰複製後の細胞生存率に寄与

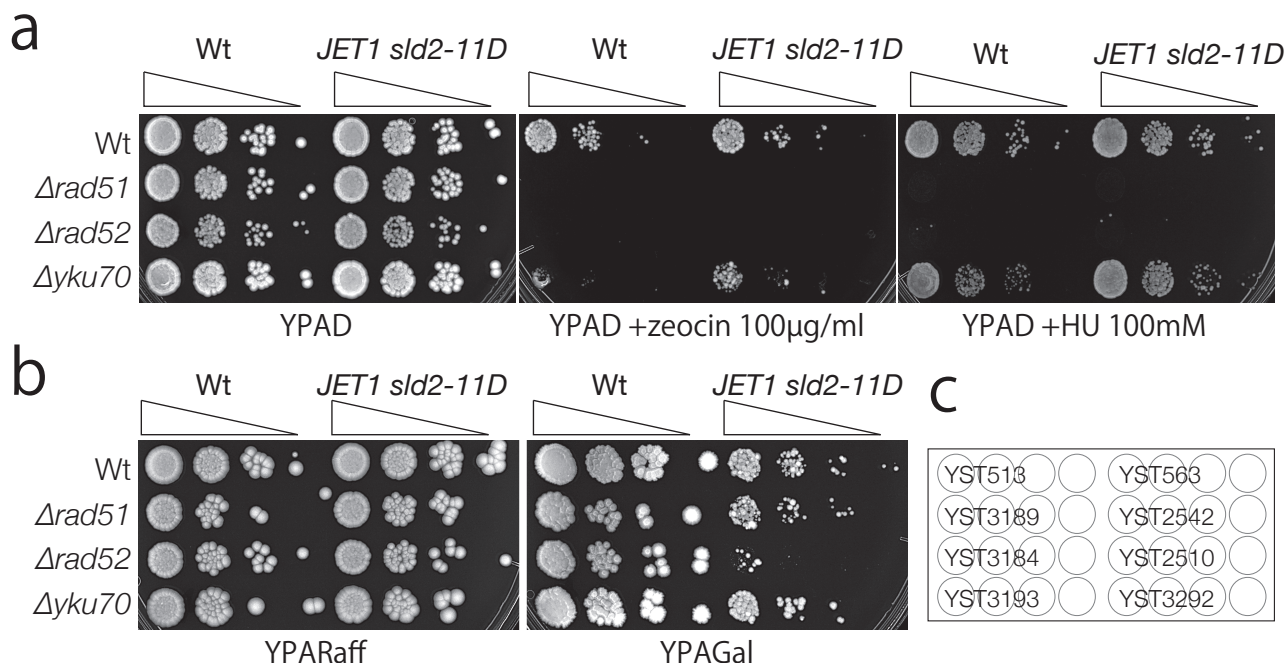


図 5. 修復因子を欠損した株は過剰複製を誘導しても、顕著な生存率の低下を示さない。

(a, b) c に示した各株を終夜培養したものから 10 倍希釈系列を作製し、下に示した各組成のプレートヘスポートし、30°C で 4 日間培養した。上部に示した Wt バックグラウンドは YST513 (*CDC45^{wt} GALp* vector)、*JET1 sld2-11D* バックグラウンドは YST563 (*CDC45^{JE11} GALp-sld2-11D*)。 (c) スポットした株名を示す。

していないということを示唆する。

4-3. DSB 修復経路は過剰複製後の細胞生存率に寄与しない

DSB 修復経路が過剰複製後の細胞生存率に寄与しないということを示唆する結果が得られたため (図 5b)、同調培養を用いてより詳細な解析を行った。また、以前の結果より、過剰複製後に生き残ってコロニー形成したサバイバークローンではゲノム不安定化が高頻度に見られること (Tanaka and Araki, 2011)、HR と NHEJ ではその DSB 修復様式が大きく異なることから、欠損株の生存率をモニターすると同時に、サバイバークローンについて、その染色体構成をパルスフィールドゲル電気泳法 (PFGE) で解析し、ゲノム不安定化パターンに対しての影響の有無も検討することとした。

4-3-1. HR 欠損株

野生型、*Δrad51*, *Δrad52* の独立な 3 クローンを G1 期停止させ、DNA 複製を誘導し、時間毎の細胞生存率を計測した。いずれの株も全てのクローンで同様に DNA 含量が増加していた (図 6)。過剰複製誘導後の各時間あたりの生存率を比較すると (図 7、左グラフ)、野生型株よりも欠損株の方が高い生存率を示した。この実験では、DNA 含量の増加に伴い生存率が低下していることが明らかであったが、各株の DNA 含量増加の程度には明確な違いがあった (図 6)。そこで、時間ごとの DNA 含量の増加率を計算し (図 6、Gal/Raff)、この値を横軸として、生存率をプロットした (図 7、右グラフ)。この DNA 含量の増加率に対する生存率においても HR 欠損株の方が高い生存率を示した。以上の結果より、DNA 過剰複製によって生じる生存率低下に関して、HR 経路は寄与できないどころか、むしろその存在が逆効果であると結論した。

HR の欠損が DNA 過剰複製後の細胞に与える影響について、さらなる知見を得るために、各株についての複製誘導後 3-4 時間のサンプルより得られたサバイバークローンの染色体構成について、PFGE で解析した (図 8~35)。各株から得たサバイバーをそれぞれ 100 クローン以上 PFGE で解析し、染色体の本数が増加したもの (異数性) や、本来とは違う長さになったもの (転座・欠失に代表される gross chromosome rearrangement: GCR) を検出した。異常を示した染色体の全数を母数として、染色体異数性と GCR を示したものの割合を比較した結果、野生型、*Δrad51*, *Δrad52* 株での GCR の割合はそれぞれ 23.1, 12.2, 12.5% であり、*Δrad51*, *Δrad52* とともに GCR を示す染色体の割合が低い傾向が見られた (図 36)。

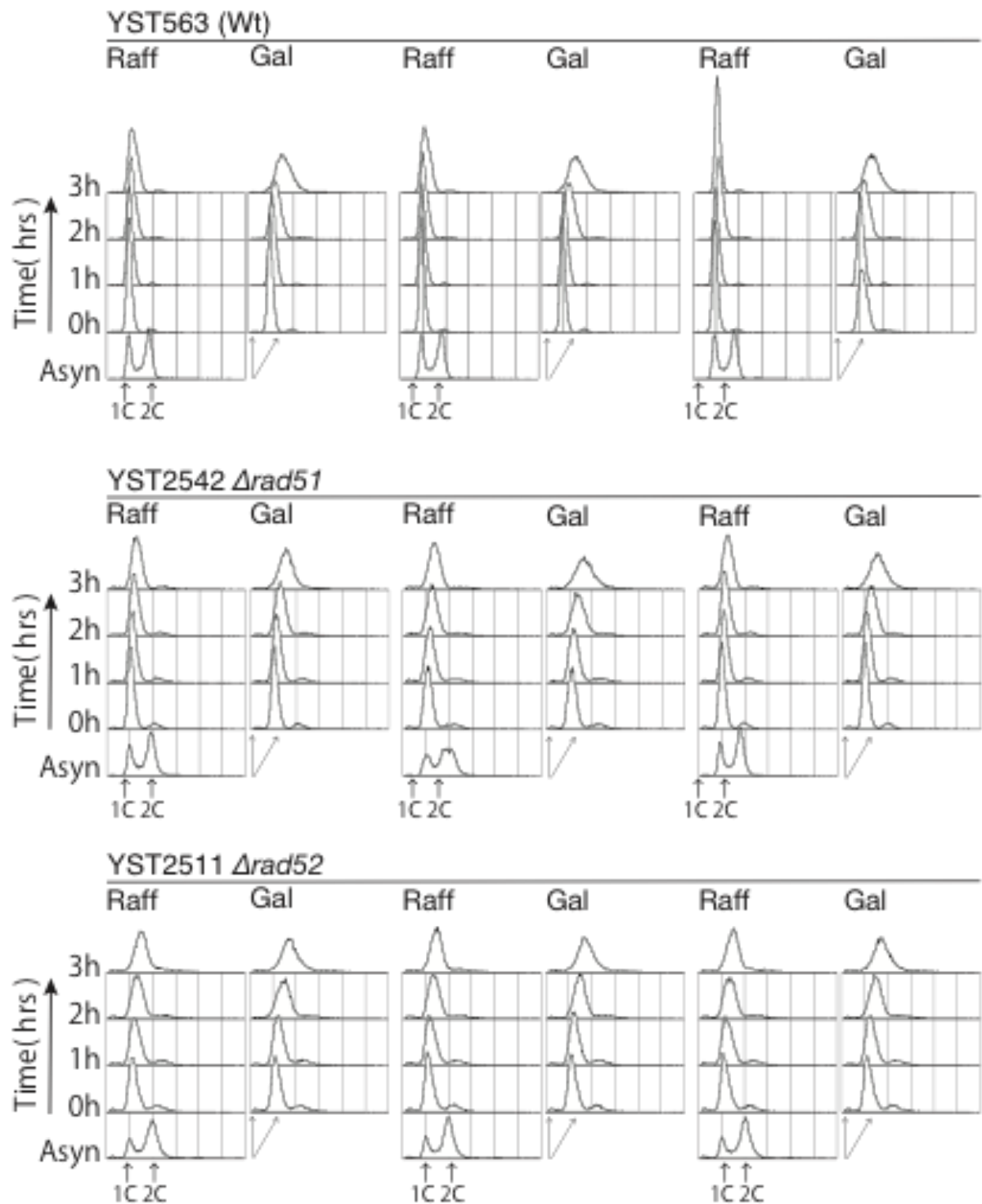


図6. HR 欠損株を G1 期停止させ、複製誘導を行なった時の DNA 含量増加の様子。

野生型、 $\Delta rad51$ 、 $\Delta rad52$ の独立な 3 クロームを YPA-raffinose で培養後、 α ファクターで G1 期停止させた後に 2 つに分け、一方はそのまま (Raff)、もう片方には、galactose を添加し (Gal) ($t=0$)、培養を続け、1 時間おきにサンプリングしたものの DNA 含量をフローサイトメーターで計測した。各時間の Raff, Gal それぞれの DNA 含量の平均値より求めた DNA 増加率 (Ga/Raff) を右側に示した。
(191130 & 1224 Synchronized Growth)

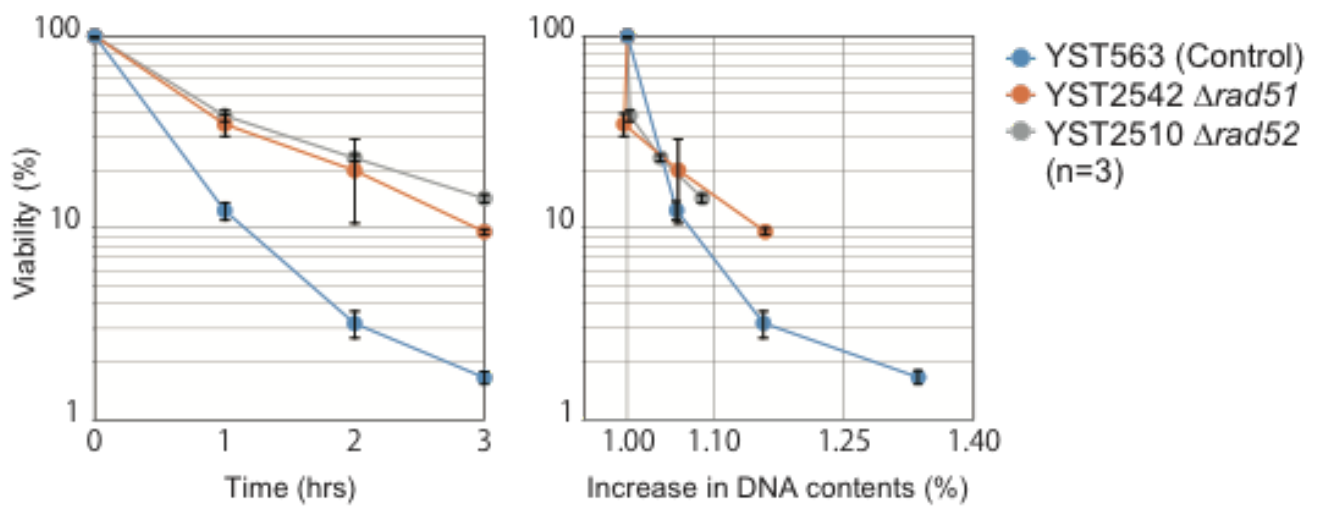


図 7. HR 欠損細胞は過剰複製誘導後に野生型細胞よりも高い生存率を示す。

図 6 に示した実験の各時間よりサンプリングした細胞を YPAD プレートへ撒き、30°C で 2 日間培養し、出現したコロニーの数から生存率を算出した。左は各時間あたりの生存率、右は DNA 含量の増加率あたりの生存率を示す。(error bar: SD?SE?)

(191130 & 1224 Synchronized Growth)

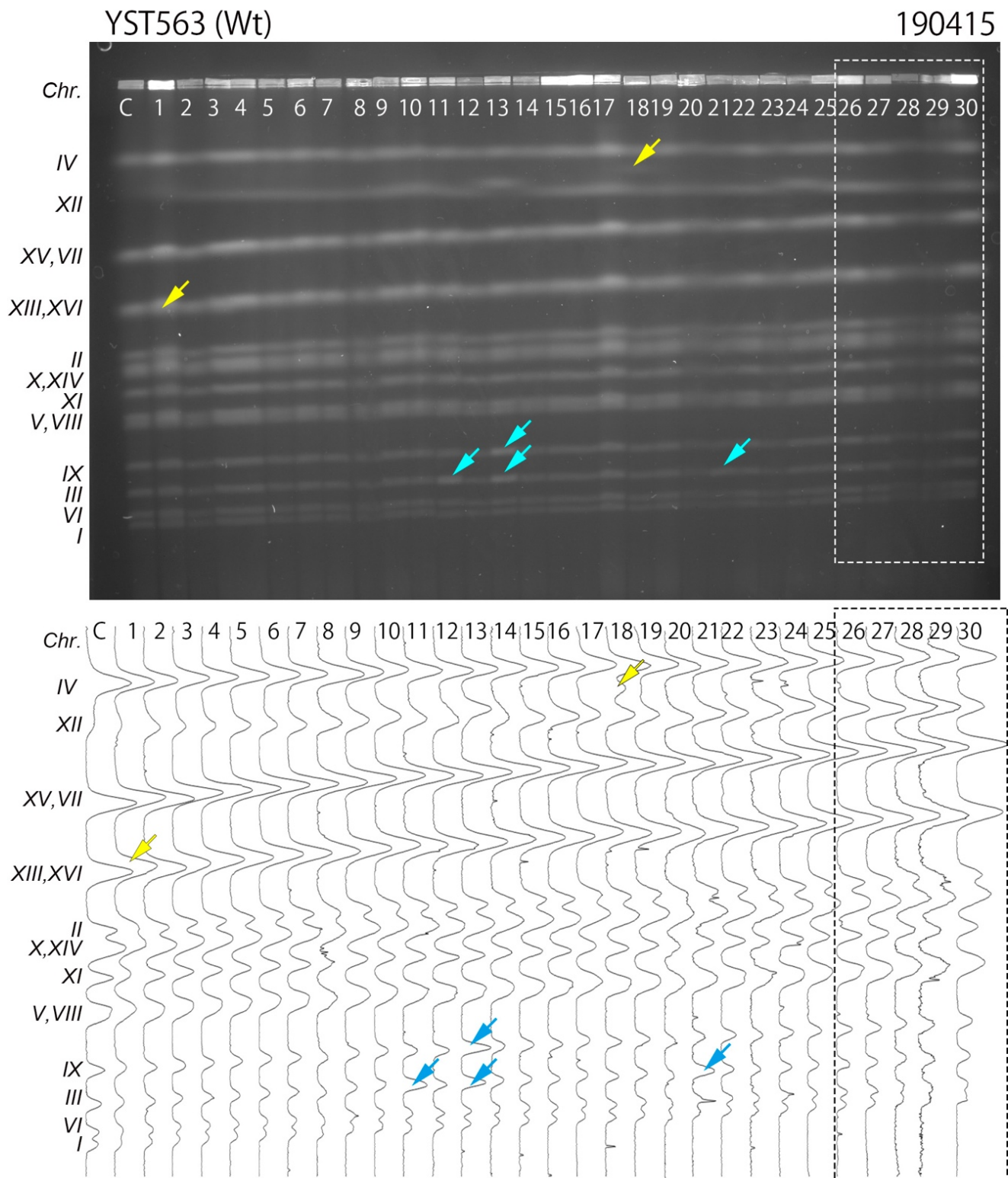


図8. *JET1 GALp-sld2-11D*野生型株由来のサバイバークロンの染色体構成 (その1) .

図6に示したのと同様の実験を行い、*JET1 GALp-sld2-11D*野生型株 (YST563) で過剰複製誘導後3時間後にサンプリングしたものから得たサバイバー25クロンの泳動像 (レーン1-25)。その生存率は6.10%。過剰複製誘導していない方からも5クロン抽出し解析している (レーン26-30、生存率: 90.80%)。上側に実際の泳動像を、下側には、泳動像から各レーンのバンドシグナルの強度を定量化したものを示した。左側のローマ数字は染色体の番号を示す。異数性、GCRを示すと判断した染色体をそれぞれ青色と黄色の矢印で示す。第XII番染色体は自然にコピー数変動するリボソームDNAリピートを含むため、このマーキングからは除外している。

(Control→ YST563 (Wt), lane #1-25→ Gal plate #1- 3h, #26-30→ Raff plate #1- 3h)

(190409 Synchronized growth, 190415 PFGE)

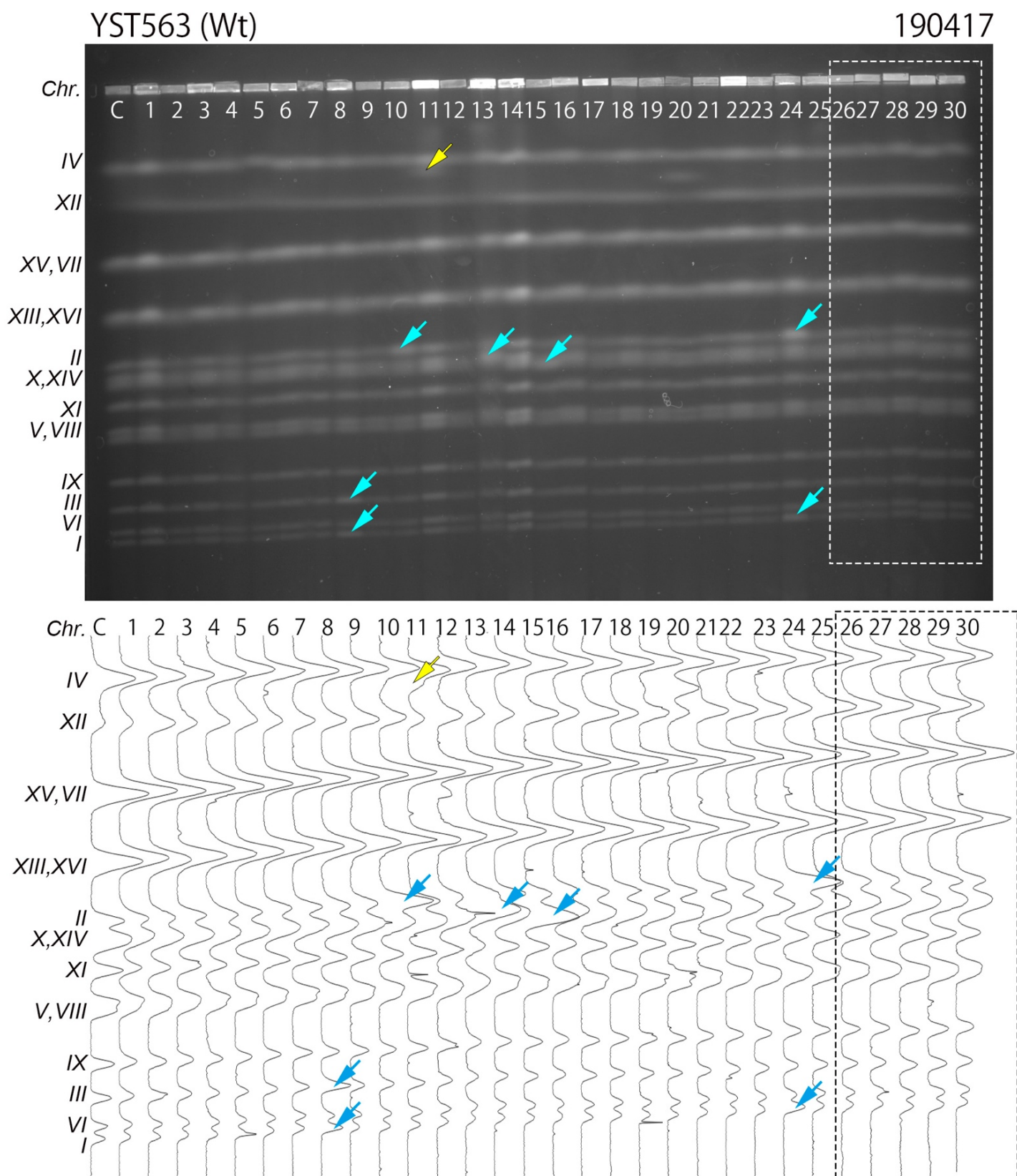


図9. *JET1 GALp-sld2-11D*野生型株由来のサバイバークローンの染色体構成（その2）。

図8と同じ実験から得たサバイバークローンの染色体像。

(Control→ YST563 (Wt), lane #1-25→ Gal plate #2- 3h, #26-30→ Raff plate #2- 3h)

(190409 Synchronized growth, 190417 PFGE)

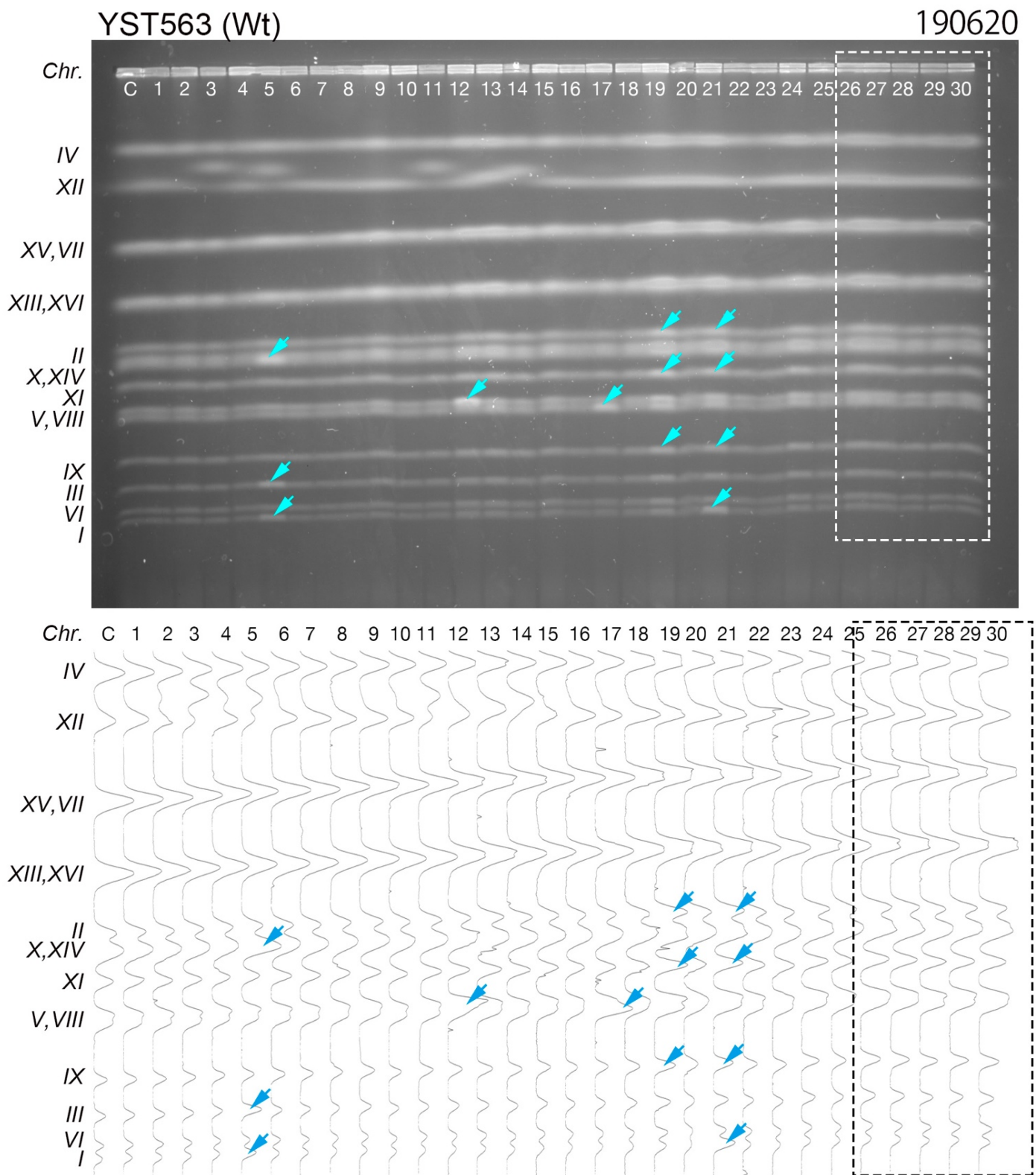


図 10. *JET1 GALp-sld2-11D* 野生型株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 3) .

図 6 と同様に行った実験で、過剰複製誘導後 3 時間後にサンプリングしたものから得たサバイバークローンの染色体像 (レーン 1-25、生存率は 8.85%)。レーン 26-30 は過剰複製誘導していない方由来のもの (生存率: 103.80%)。

((Control→ YST563 (Wt), lane #1-25→ Gal plate #1- 3h, #26-30→ Raff plate #1- 3h)

(190528 Synchronized growth, 190620 PFGE)

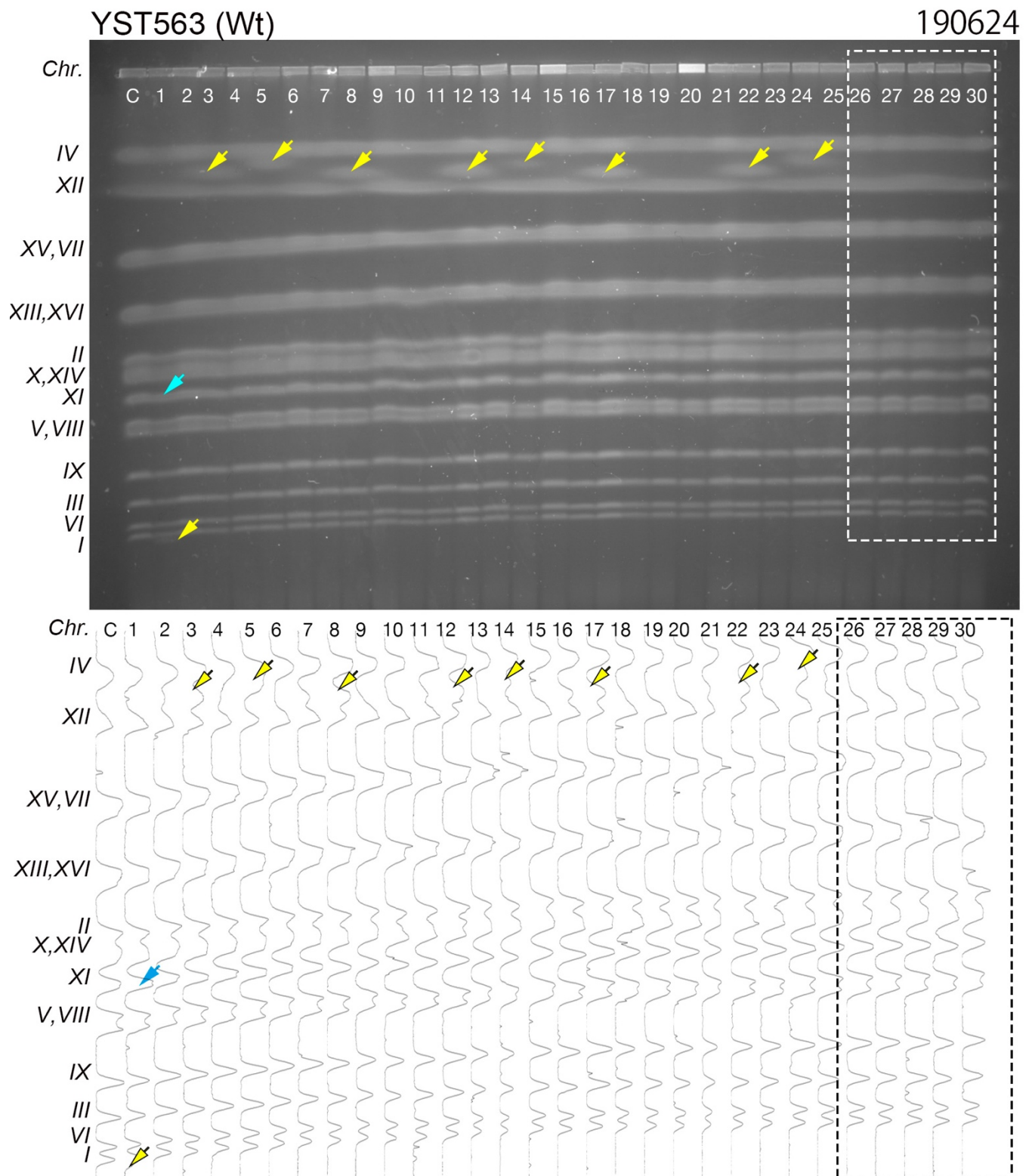


図 11. *JET1 GALp-sld2-11D* 野生型株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 4) .

図 10 と同じ実験から得た、別のサバイバークローンの解析結果。

(Control→ YST563 (Wt), lane #1-25→ Gal plate #2- 3h, #26-30→ Raff plate #2- 3h)

(190528 Synchronized growth, 190624 PFGE)

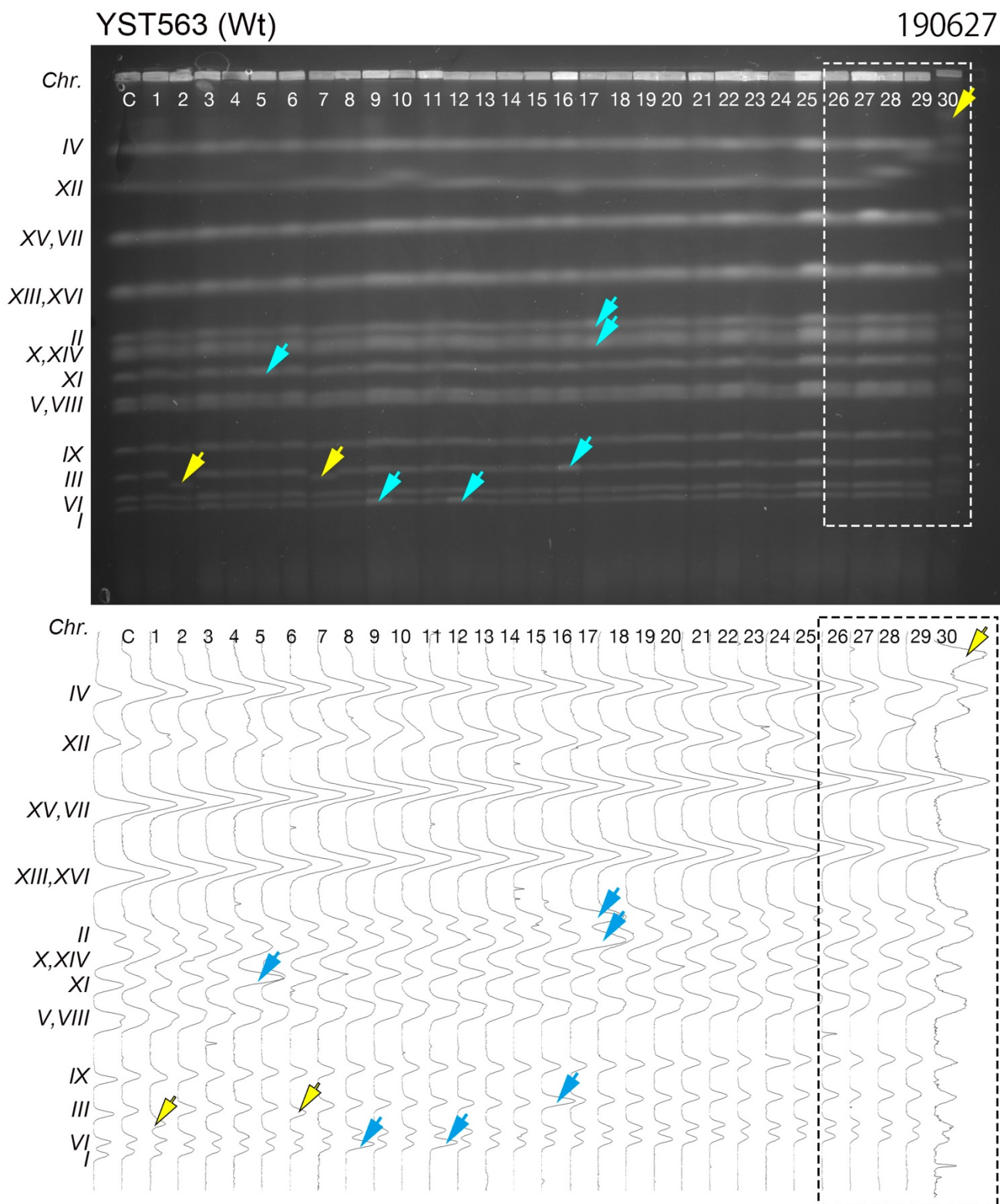


図 12. *JET1 GALp-sld2-11D* 野生型株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 5) .

図 6 と同様に行った実験で、過剰複製誘導後 3 時間後にサンプリングしたものから得たサバイバークローンの染色体像 (レーン 1-25、生存率は 20.23%)。レーン 26-30 は過剰複製誘導していない方由来のもの (生存率: 89.60%)。

(Control→ YST563 (Wt), lane #1-25→ Gal plate #1- 3h, #26-30→ Raff plate #1- 3h)

(190531 Synchronized growth, 190627 PFGE)

YST563 (Wt)

190701

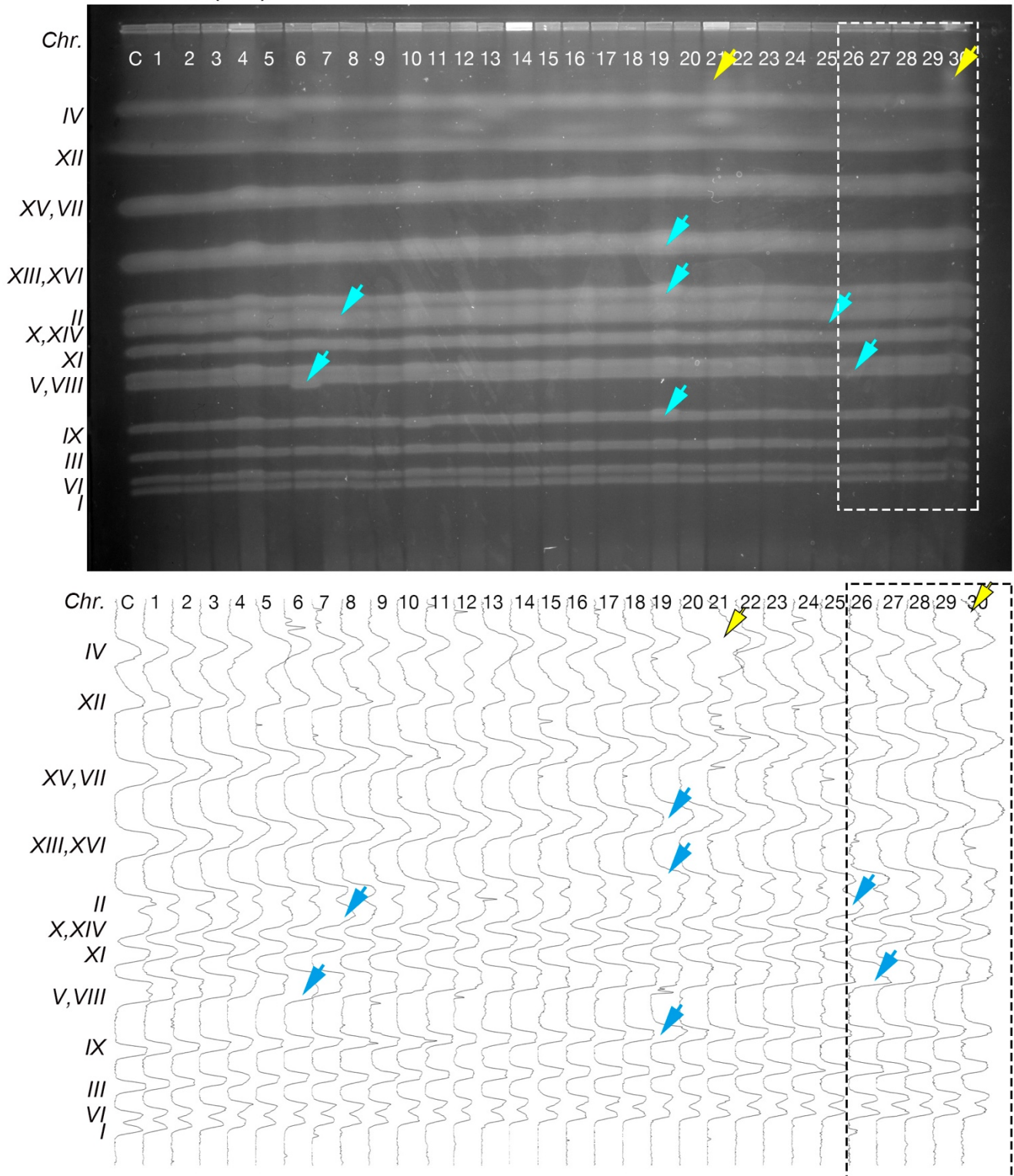


図 13. *JET1 GALp-sld2-11D* 野生型株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 6) .

図 12 と同じ実験から得た、別のサバイバークローンの解析結果。

(Control→ YST563 (Wt), lane #1-25→ Gal plate #2- 3h, #26-30→ Raff plate #2- 3h)

(190531 Synchronized growth, 190701 PFGE)

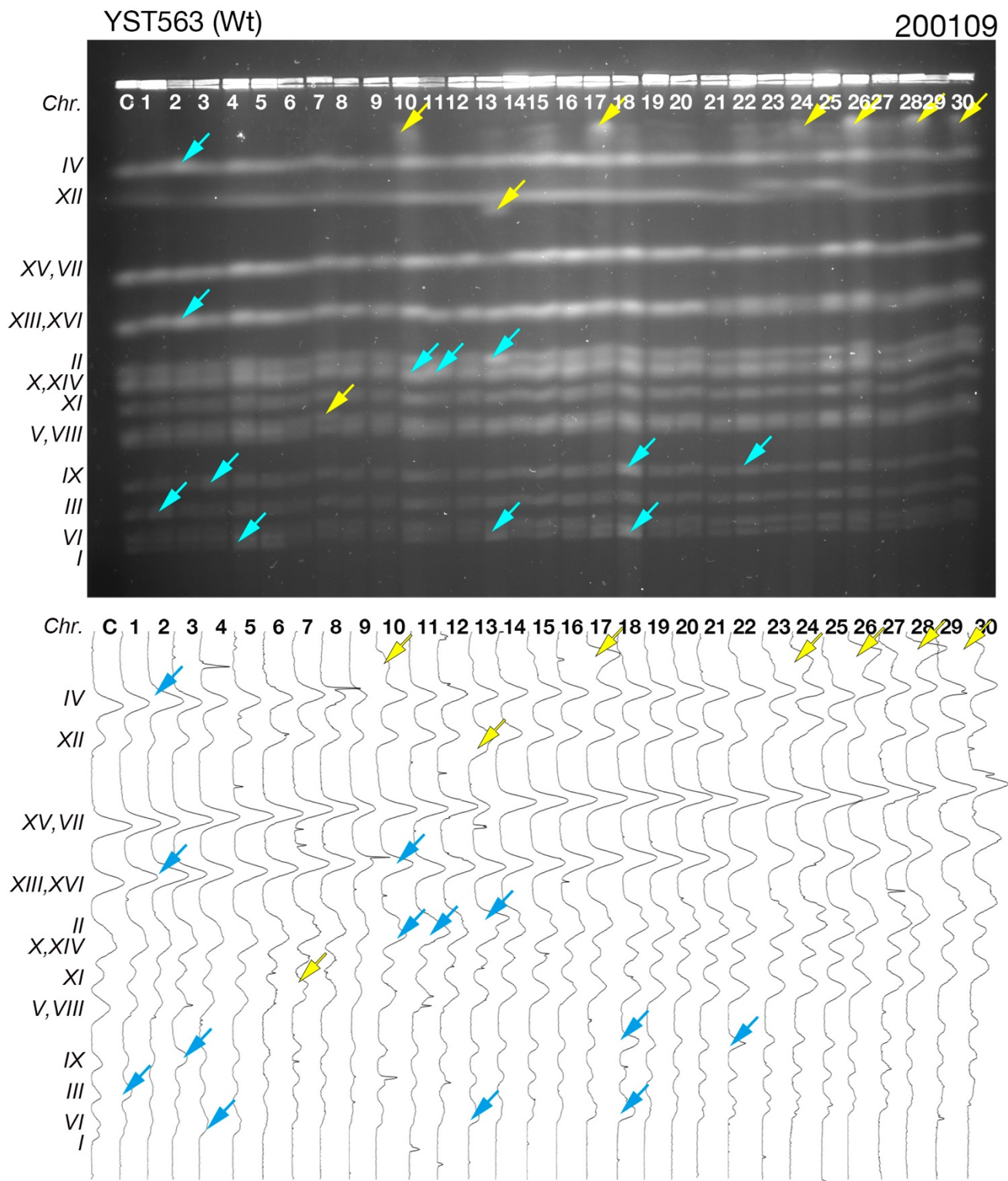


図 14. *JET1 GALp-sld2-11D* 野生型株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 7) .

図 6 と同様にを行った実験で、過剰複製誘導後 3 時間後にサンプリングしたものから得たサバイバークローンの染色体像 (レーン 1-30、生存率は 1.66%)。

(Control → YST563 (Wt), lane #1-30 → Gal plate #1- 3h)

(191130 Synchronized growth, 200109 PFGE)

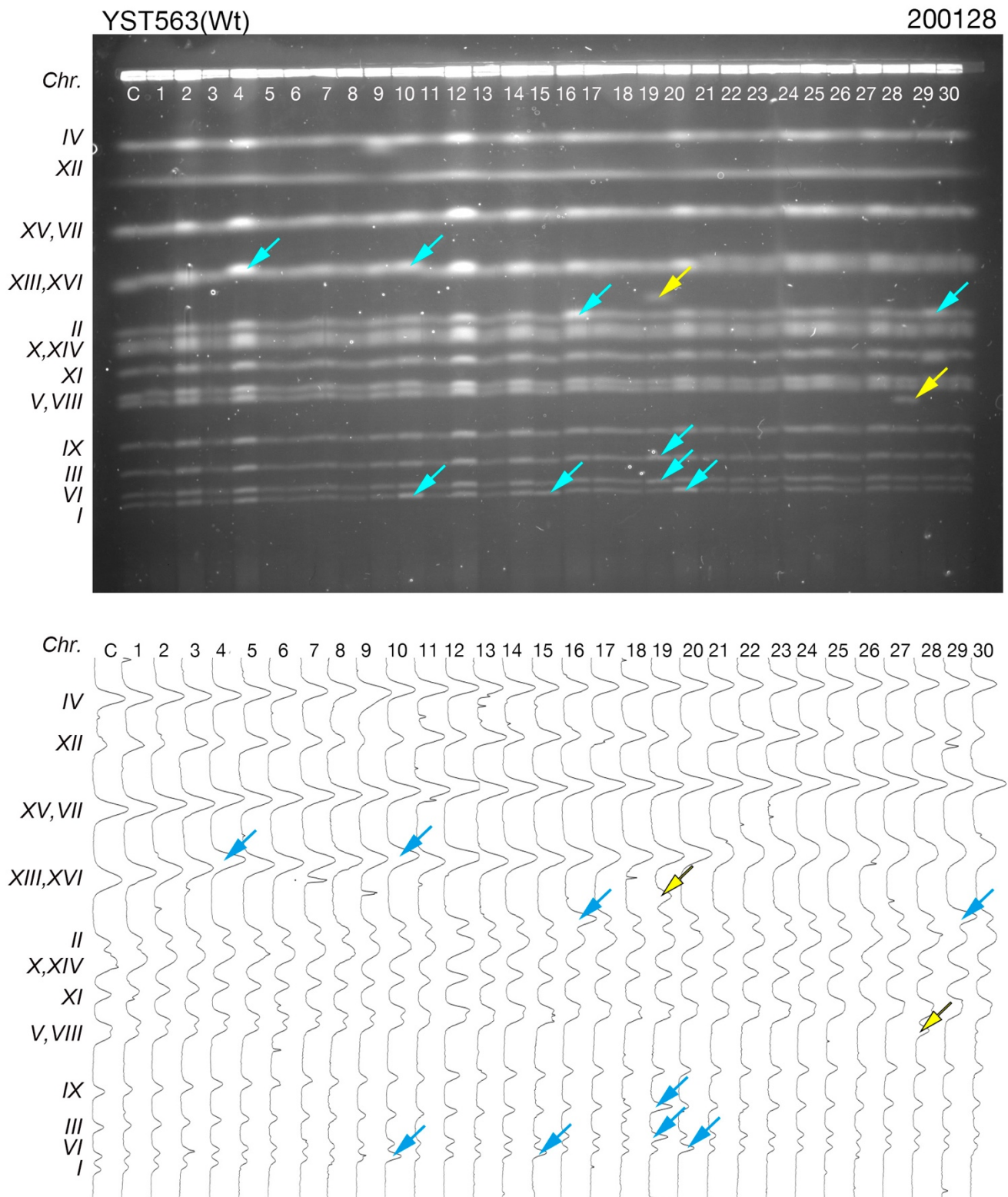


図 15. *JET1 GALp-sld2-11D* 野生型株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 8) .

図 14 と同じ実験で、過剰複製誘導後 1 時間後にサンプリングしたものから得たサバイバークローンの染色体像 (レーン 1-30、生存率は 12.32%)。

(Control→ YST563 (Wt), lane #1-30→ Gal plate #1- 1h)

(191130 Synchronized growth, 200128 PFGE)

YST563 (Wt)

200129

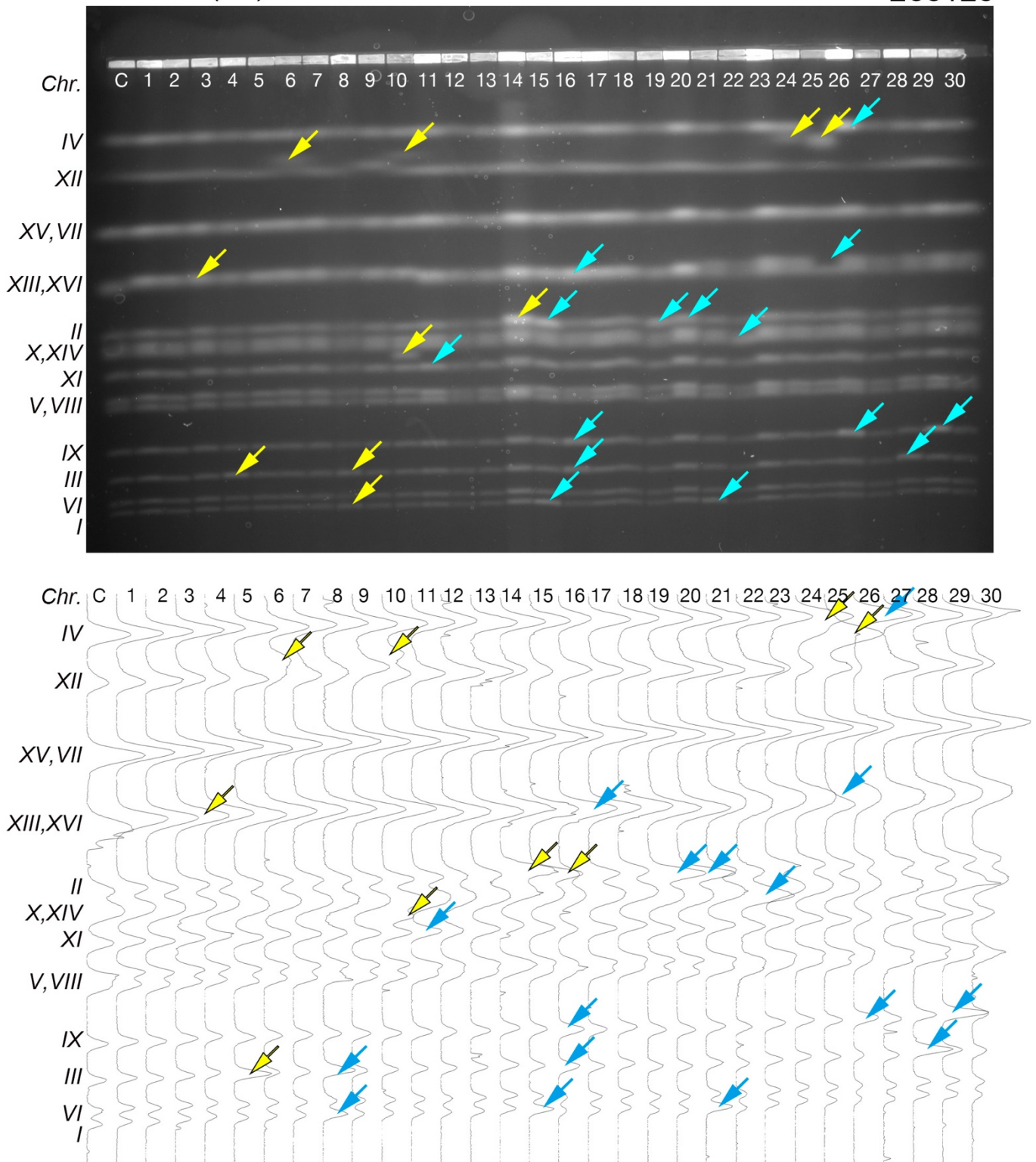


図 16. *JET1 GALp-sld2-11D* 野生型株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 9) .

図 14 と同じ実験で、過剰複製誘導後 2 時間後にサンプリングしたものから得たサバイバークローンの染色体像 (レーン 1-30、生存率は 3.18%)。

(Control→ YST563 (Wt), lane #1-30→ Gal plate #1- 2h)

(191130 Synchronized growth, 200129 PFGE)

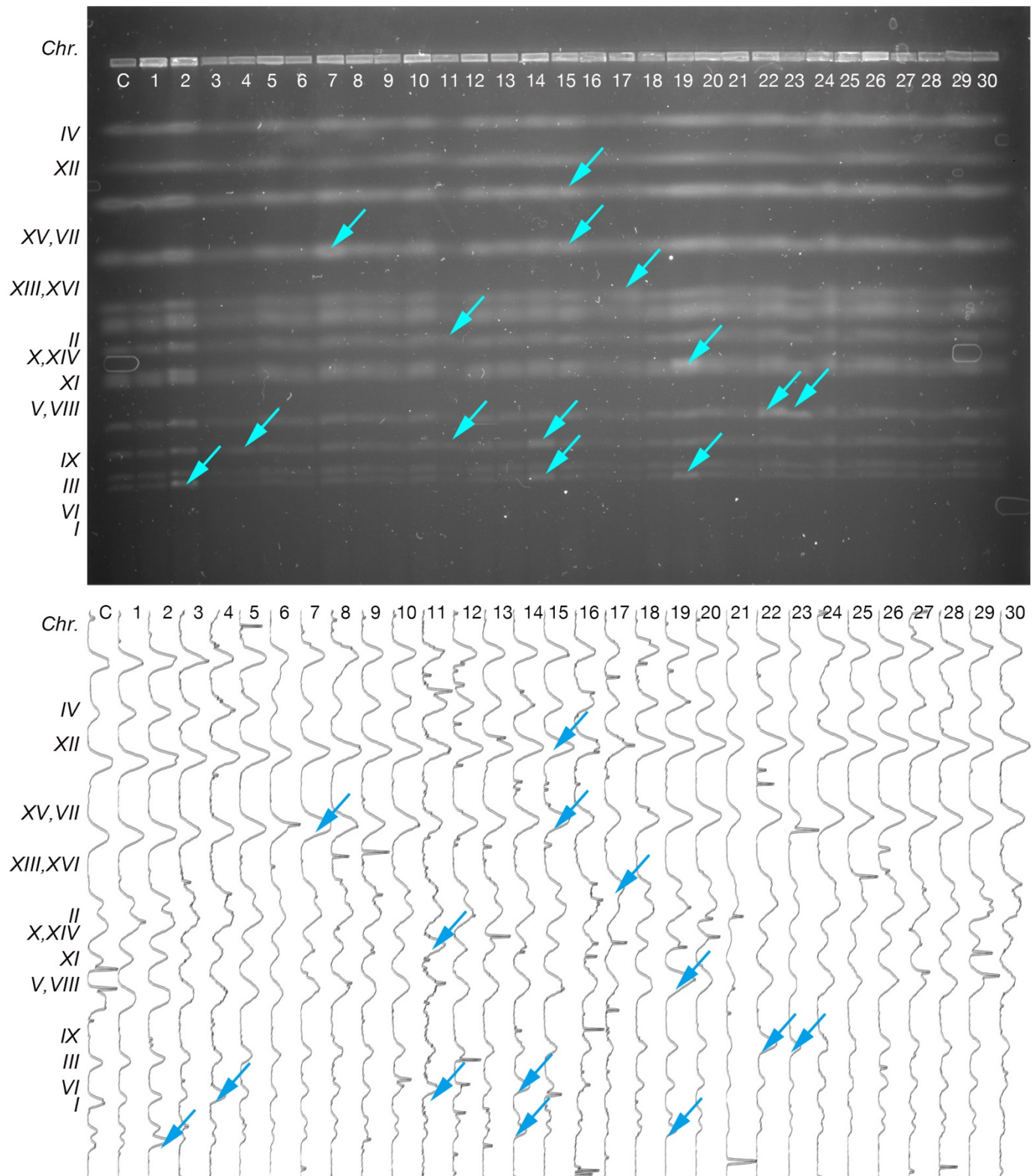


図 17. *JET1 GALp-sld2-11D* 野生型株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 10) .

図 6 と同様に行った実験で、過剰複製誘導後 3, 4 時間後にサンプリングしたものから得たサバイバークローンの染色体像 (3h: レーン 1-15、生存率は 4.5%, 4h: レーン 16-30、生存率は 2.7%)。

(Control→ YST563 (Wt), lane #1-15→ Gal plate #1- 3h, #16-30→ Gal plate #1- 4h)

(201116 Synchronized growth, 201130 PFGE)

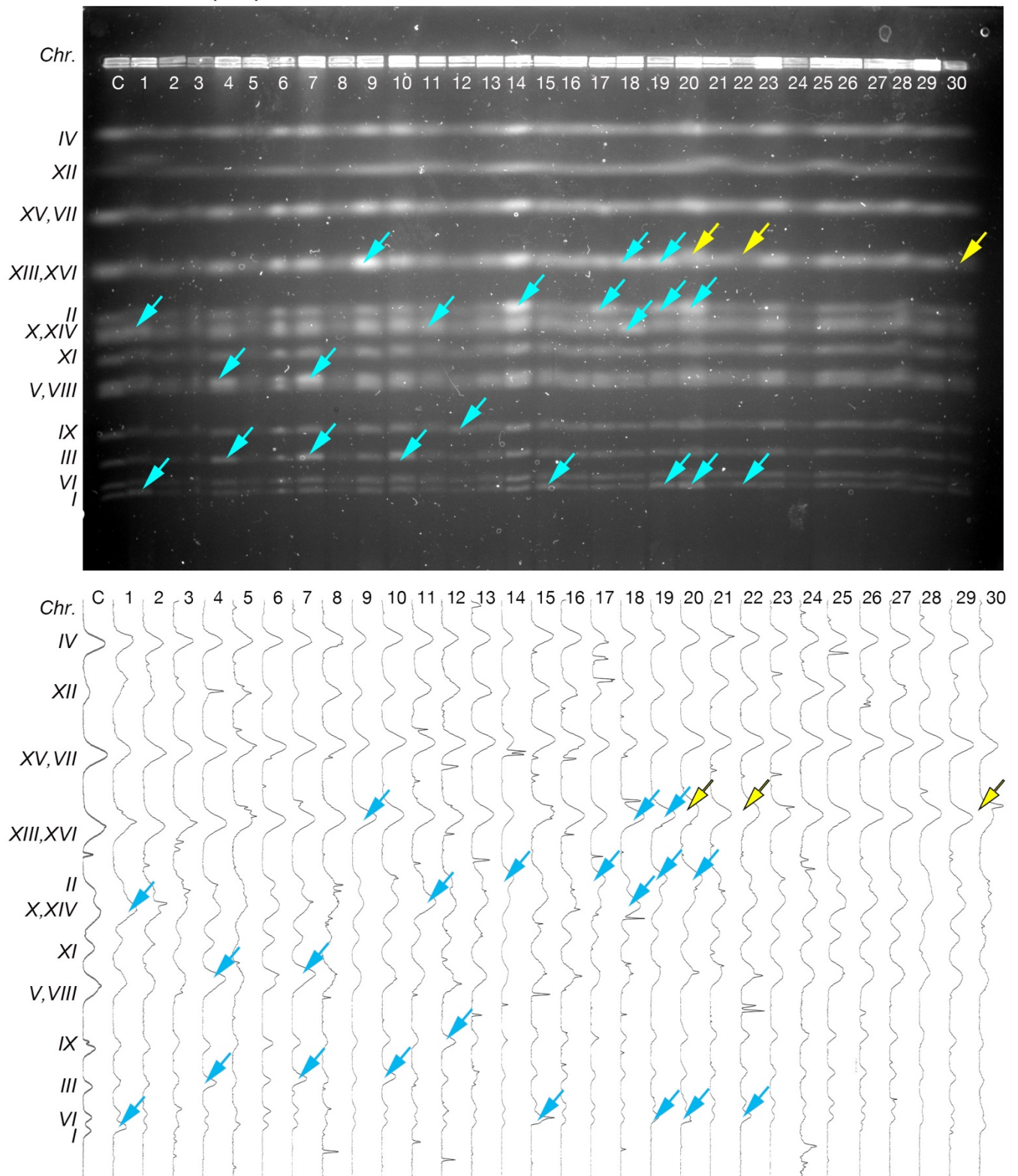


図 18. *JET1 GALp-sld2-11D* 野生型株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 11) .

図 17 と同じ実験から得たサバイバークローンの染色体像。

(Control→ YST563 (Wt), lane #1-15→ Gal plate #2- 3h, #16-30→ Gal plate #2- 4h)

(201116 Synchronized growth, 201201 PFGE)

YST563 (Wt)

201221

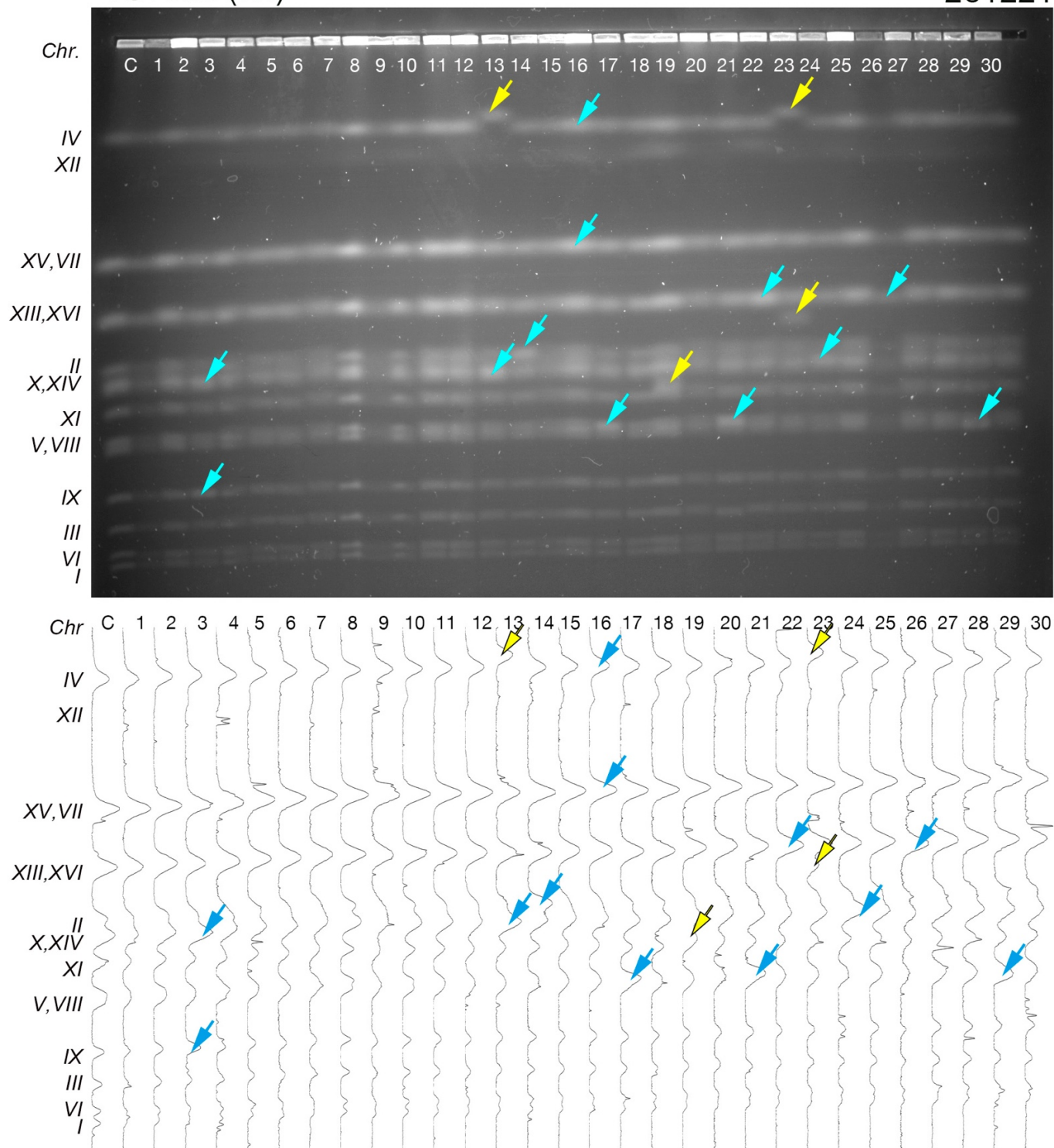


図 19. *JET1 GALp-sld2-11D* 野生型株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 12) .

図 17 と同じ実験から得たサバイバークローンの染色体像。

(Control→ YST563 (Wt), lane #1-15→ Gal plate #3- 3h, #16-30→ Gal plate #3- 3h)

(201116 Synchronized growth, 201221 PFGE)

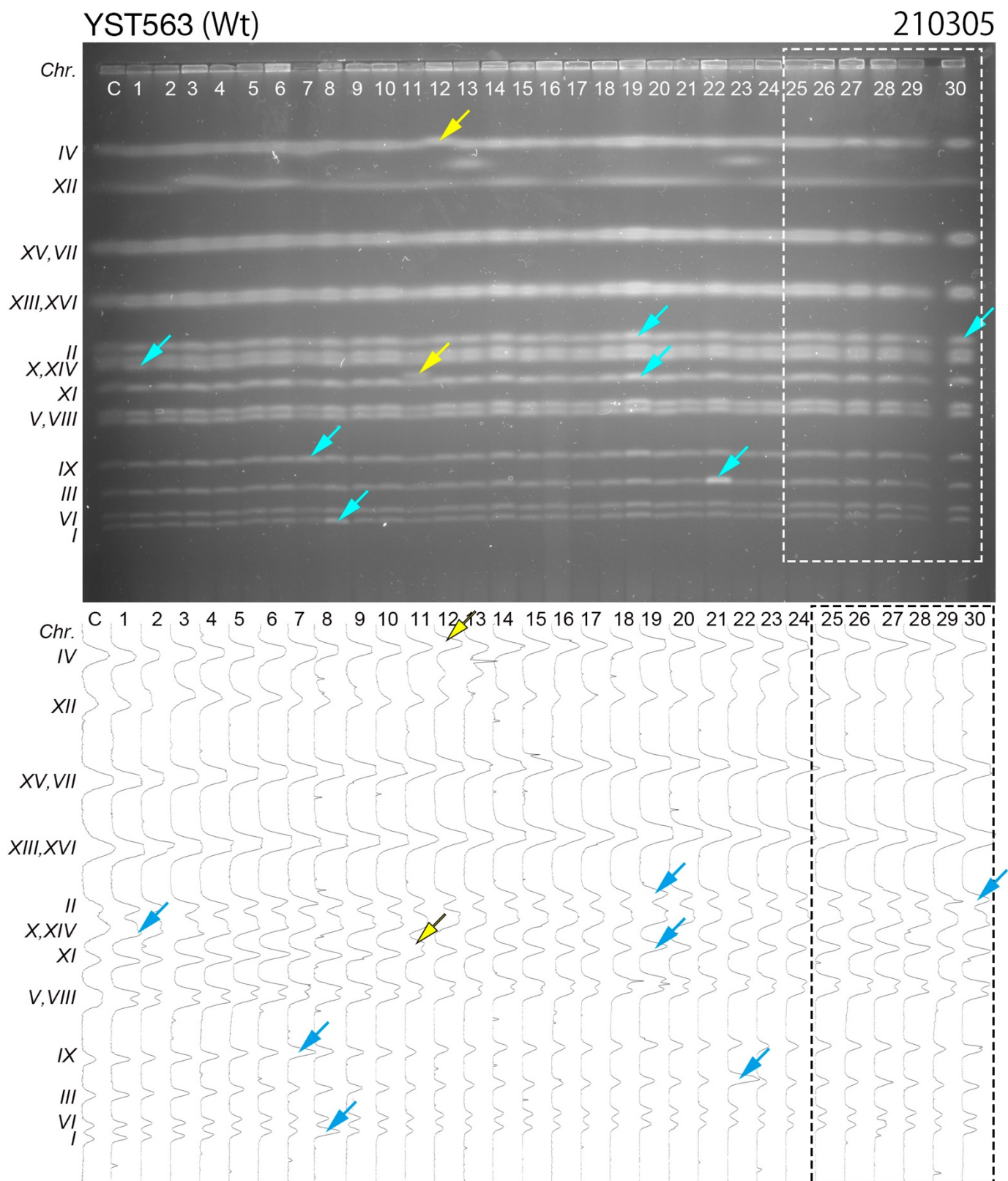


図 20. *JET1 GALp-sld2-11D* 野生型株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 13) .

図 6 と同様に行った実験で、過剰複製誘導後 3, 4 時間後にサンプリングしたものから得たサバイバークローンの染色体像 (3h: レーン 1-12、生存率は 2.4%, 4h: レーン 13-24、生存率は 2.2%)。レーン 25-30 は過剰複製誘導していない方由来のもの (生存率: 168.2%)。

(Control→ YST563 (Wt), lane #1-12→ Gal plate - 3h, #13-24→ Gal plate - 4h, #25-30→ Raff plate - 4h)

(210121 Synchronized growth, 210305 PFGE)

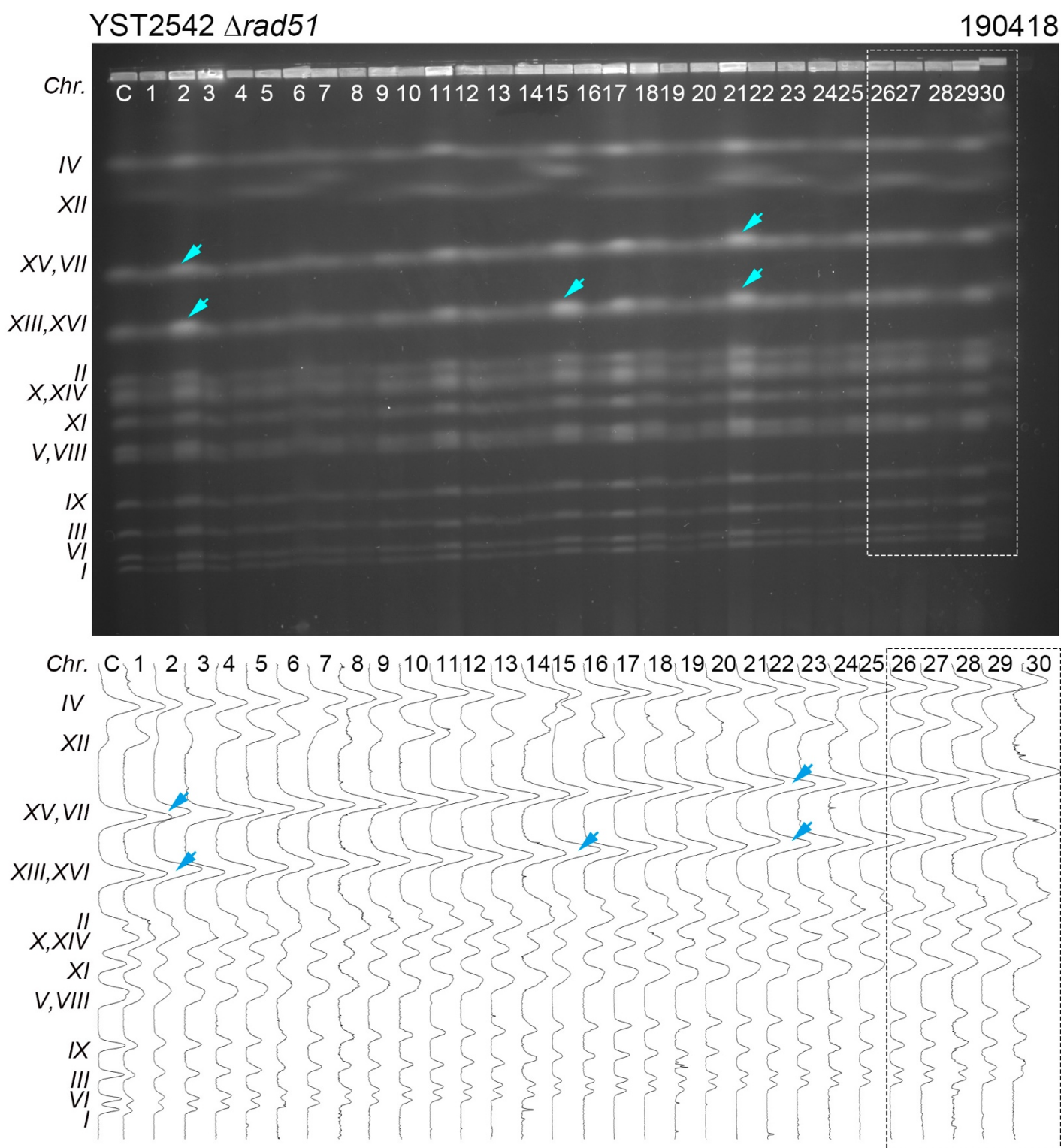


図 21. $\Delta rad51$ 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 1) .

図 6 と同様に行った実験で、過剰複製誘導後 3 時間後にサンプリングしたものから得たサバイバークローンの染色体像 (レーン 1-25、生存率は 12.4%)。レーン 26-30 は過剰複製誘導していない方由来のもの (生存率: 77.1%)。

(Control→ YST563 (Wt), lane #1-25→ Gal plate #1- 3h, #26-30→ Raff plate #1 - 3h)

(190409 Synchronized growth, 190418 PFGE)

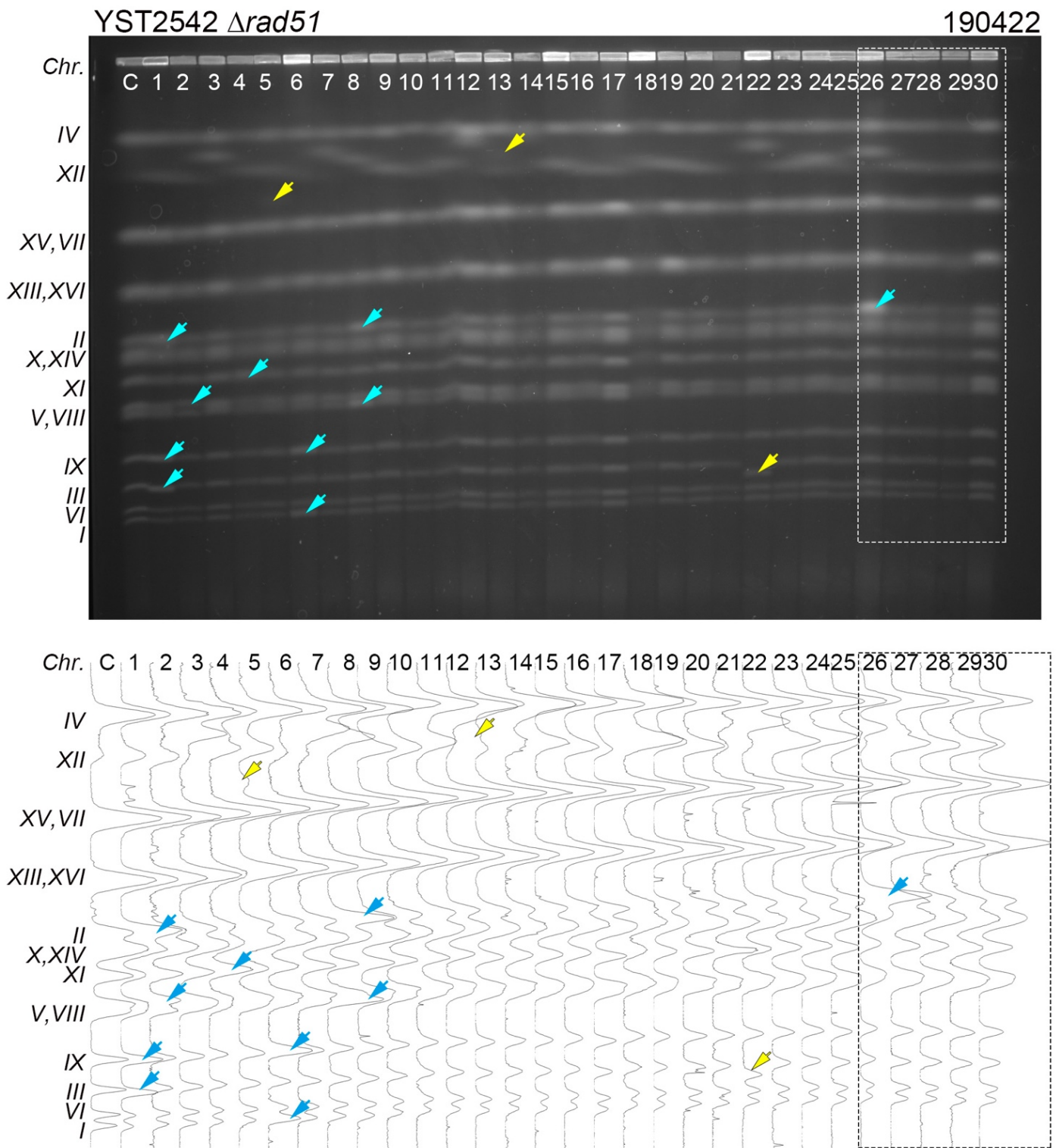


図 22. $\Delta rad51$ 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 2) .

図 21 と同じ実験から得た、別のサバイバークローンの解析結果。

(Control→ YST563 (Wt), lane #1-25→ Gal plate #2 - 3h, #26-30→ Raff plate #2 - 3h)

(190409 Synchronized growth, 190422 PFGE)

YST2542 $\Delta rad51$

190703

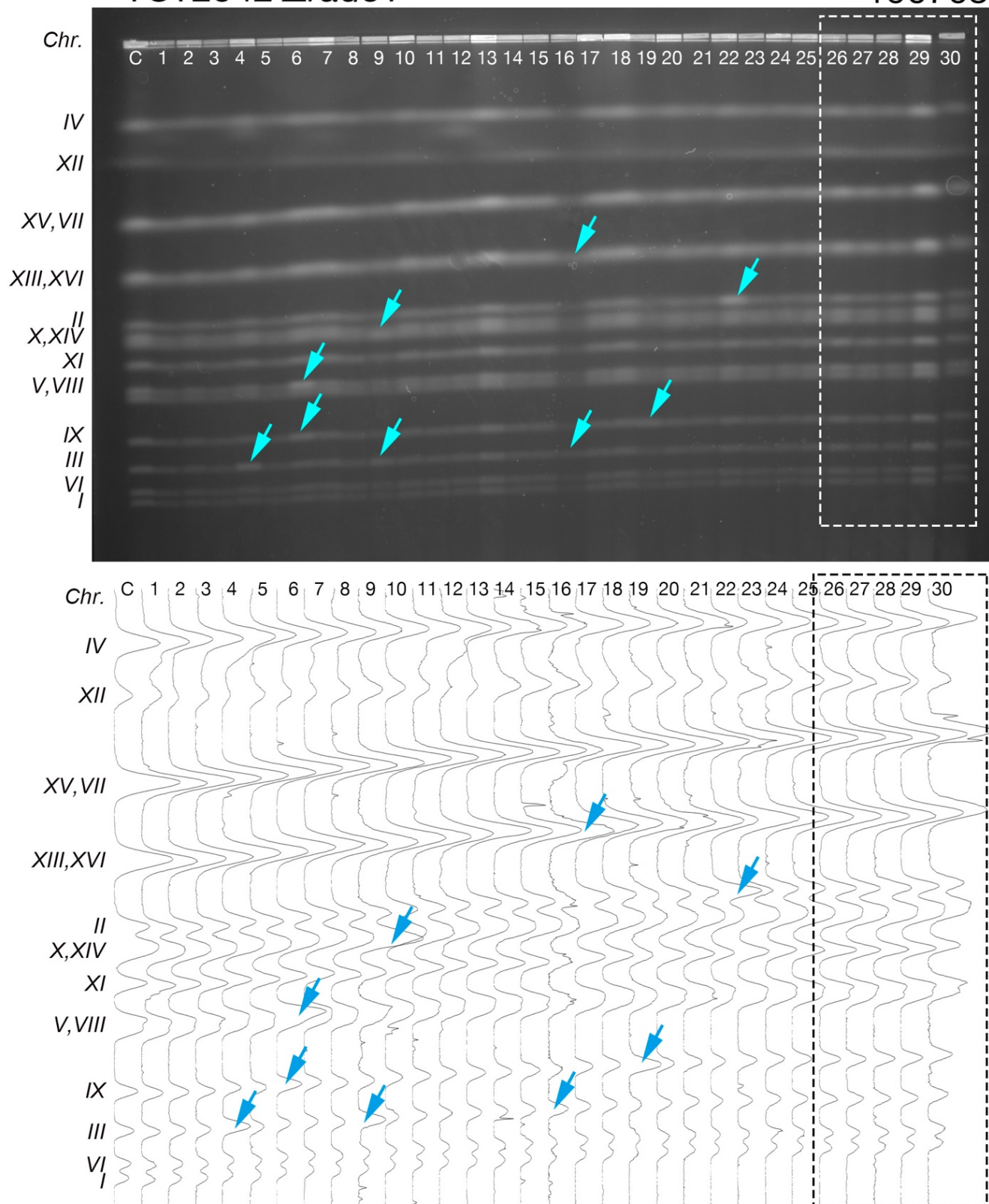


図 23. $\Delta rad51$ 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 3) .

図 6 と同様に行った実験で、過剰複製誘導後 3 時間後にサンプリングしたものから得たサバイバークローンの染色体像 (レーン 1-25、生存率は 27.7%)。レーン 26-30 は過剰複製誘導していない方由来のもの (生存率: 105.7%)。

(Control → YST563 (Wt), lane #1-25 → Gal plate #1- 3h (#1-25), #26-30 → Raff plate #1 - 3h (#1-5))

(190531 Synchronized growth, 190703 PFGE)

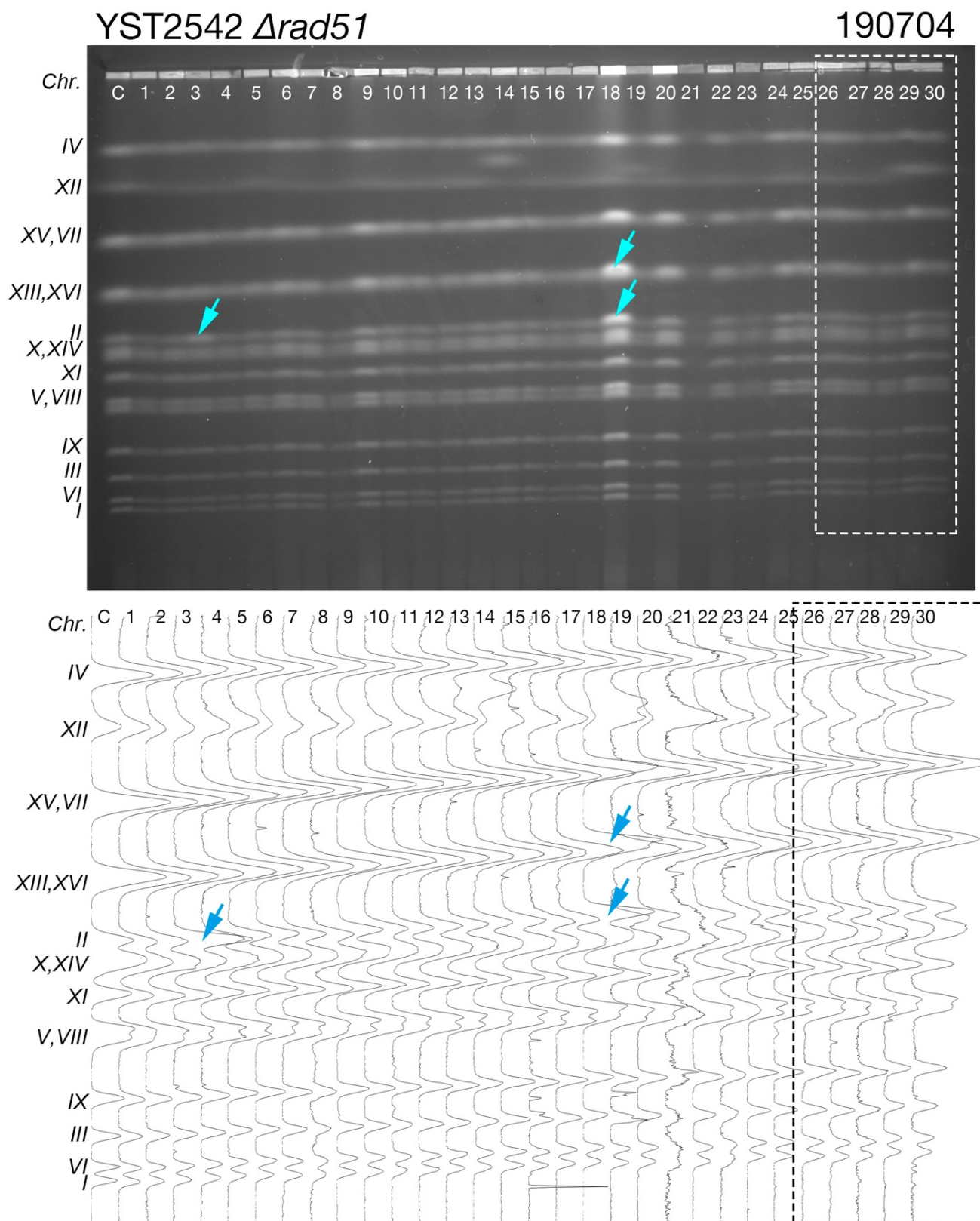


図 24. $\Delta rad51$ 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 4) .

図 23 と同じプレートから得た、別のサバイバークローンの解析結果。

(Control→ YST563 (Wt), lane #1-25→ Gal plate #1- 3h (#26-50), #26-30→ Raff plate #1 - 3h (#6-10))

(190531 Synchronized growth, 190704 PFGE)

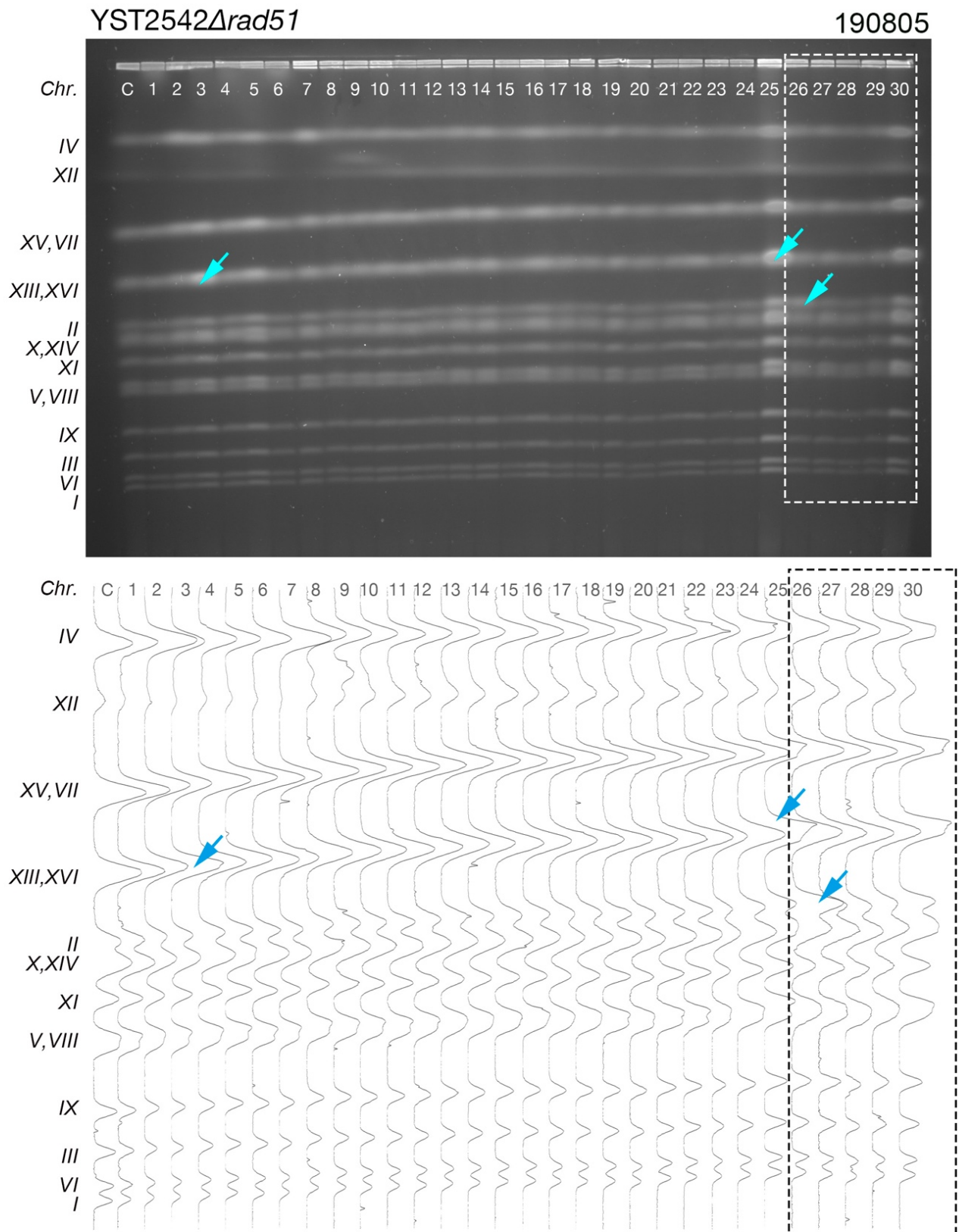


図 25. Δ rad51 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 5) .

図 6 と同様に行った実験で、過剰複製誘導後 3 時間後にサンプリングしたものから得たサバイバークローンの染色体像 (レーン 1-25、生存率は 22.0%)。レーン 26-30 は過剰複製誘導していない方由来のもの (生存率: 95.4%)。

(Control→ YST563 (Wt), lane #1-25→ Gal plate #1- 3h, #26-30→ Raff plate #1 - 3h)
(190528 Synchronized growth, 190805 PFGE)

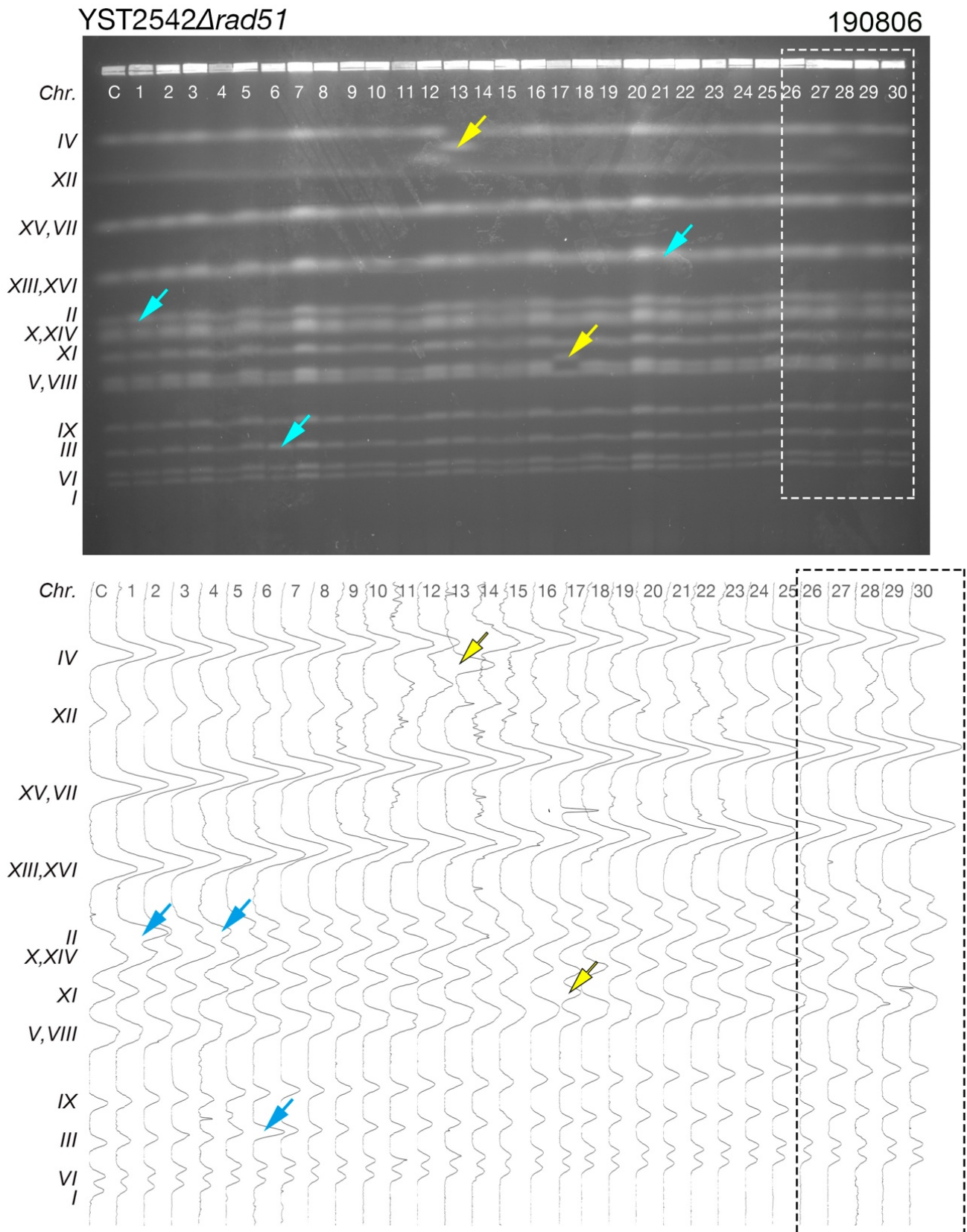


図 26. Δ rad51 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 6) .

図 25 と同じ実験から得た、別のサバイバークローンの解析結果。

(Control→ YST563 (Wt), lane #1-25→ Gal plate #2- 3h, #26-30→ Raff plate #2 - 3h)
(190528 Synchronized growth, 190806 PFGE)

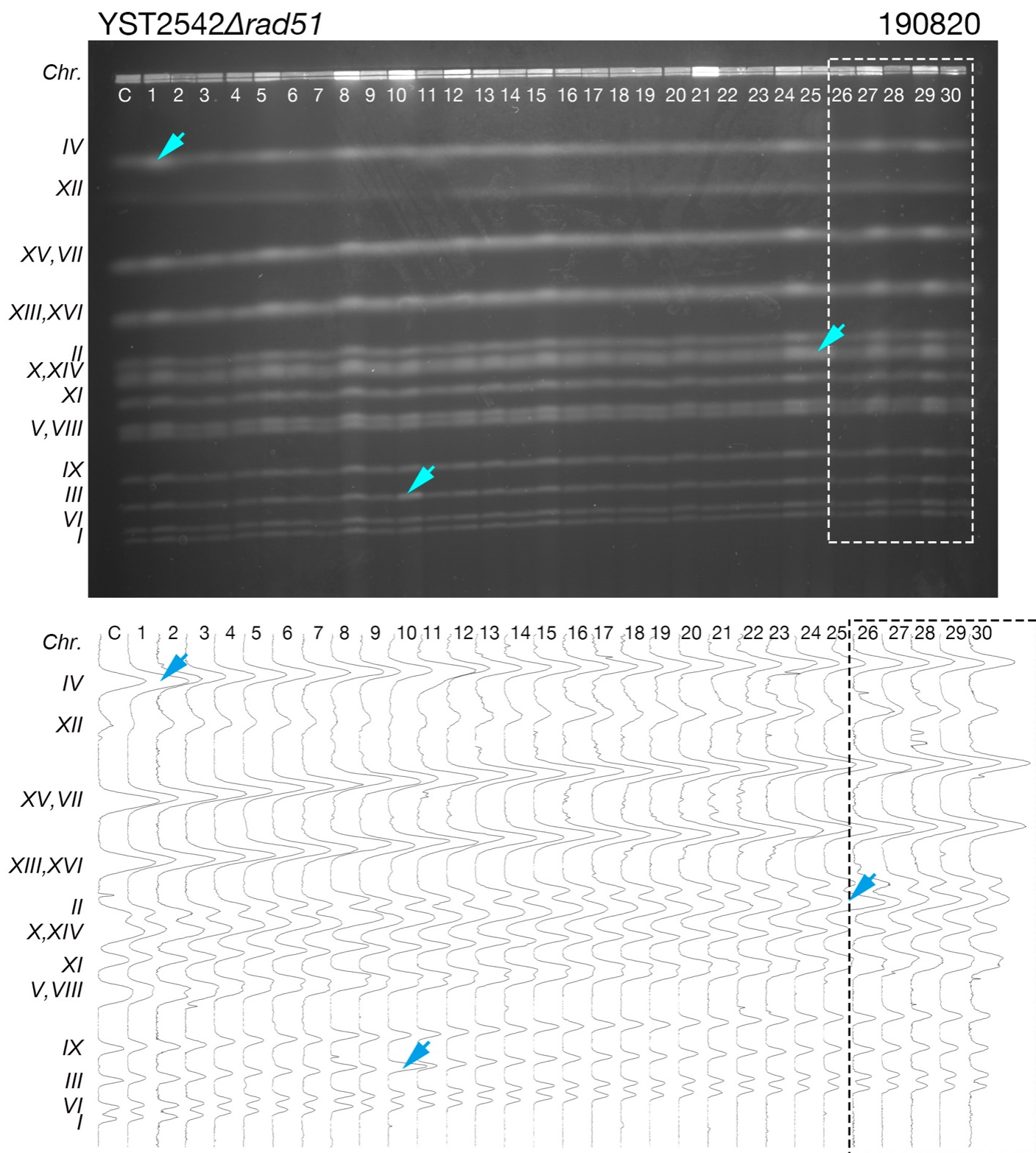


図 27. $\Delta rad51$ 株由来のサバイバークローンの染色体構成（その 7）。

図 23 と同じ実験から得た、別のサバイバークローンの解析結果。

(Control→ YST563 (Wt), lane #1-25→ Gal plate #2- 3h (#1-25), #26-30→ Raff plate #2 - 3h (#1-5))

(190531 Synchronized growth, 190820 PFGE)

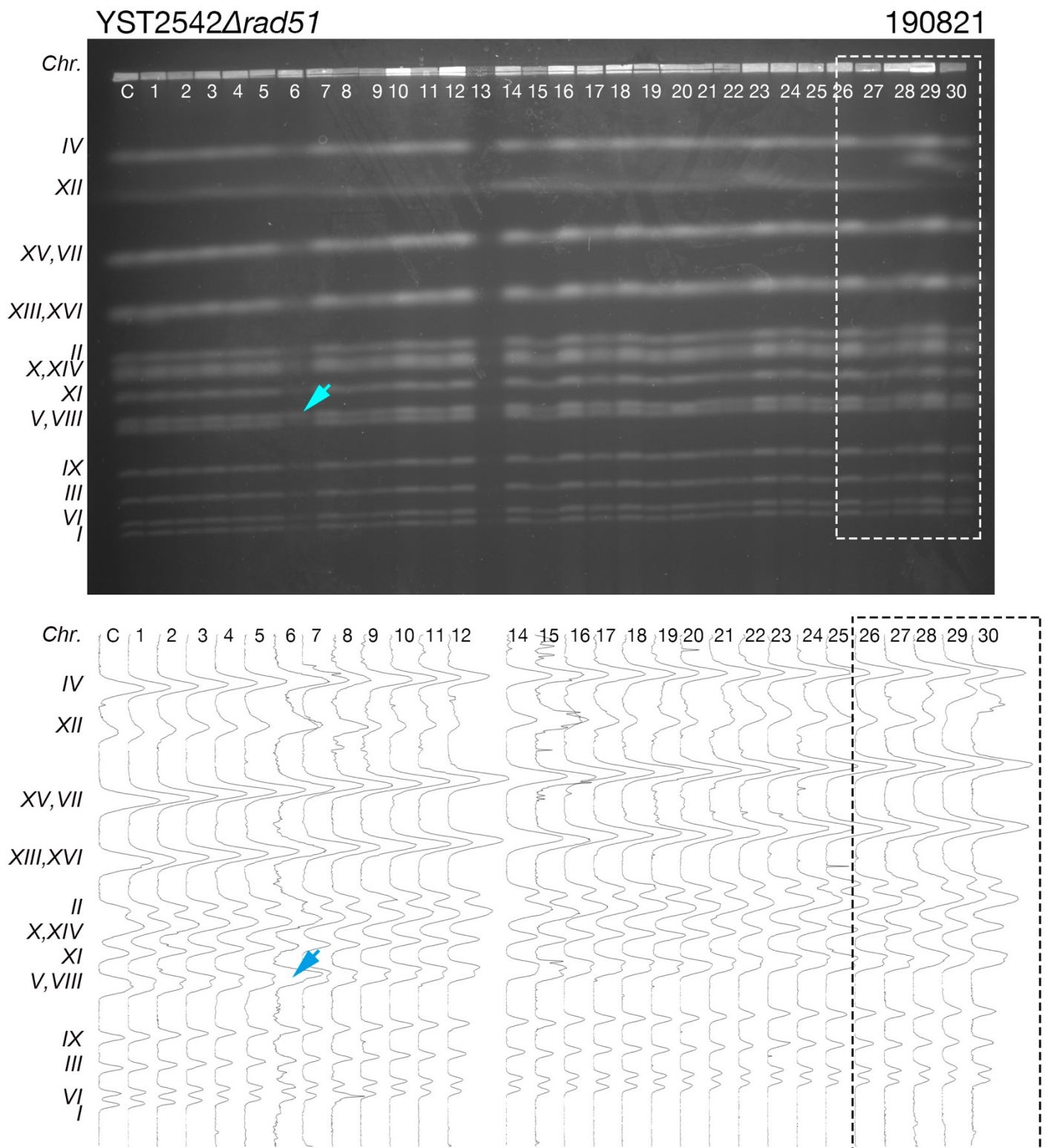


図 28. Δ rad51 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 8) .

図 27 と同じプレートから得た、別のサバイバークローンの解析結果。

(Control→ YST563 (Wt), lane #1-25→ Gal plate #2- 3h (#26-50), #26-30→ Raff plate #2 - 3h (#6-10))

(190531 Synchronized growth, 190820 PFGE)

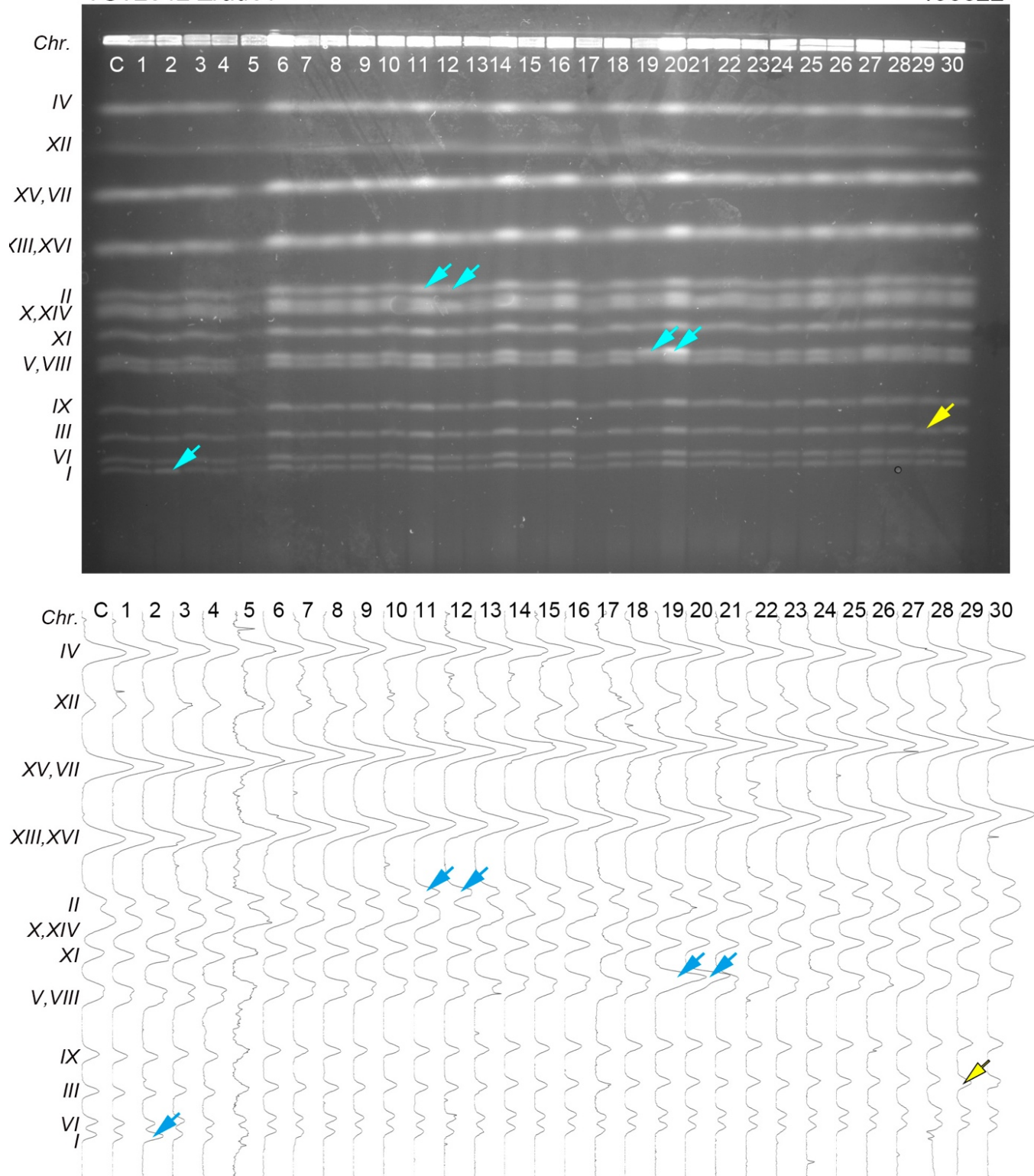


図 29. $\Delta rad51$ 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 9) .

図 23 と同じ実験から得た、別のサバイバークローンの解析結果。

(Control→ YST563 (Wt), lane #1-25→ Gal plate #3- 3h (#1-25), #26-30→ Raff plate #3 - 3h (#1-5))

(190531 Synchronized growth, 190822 PFGE)

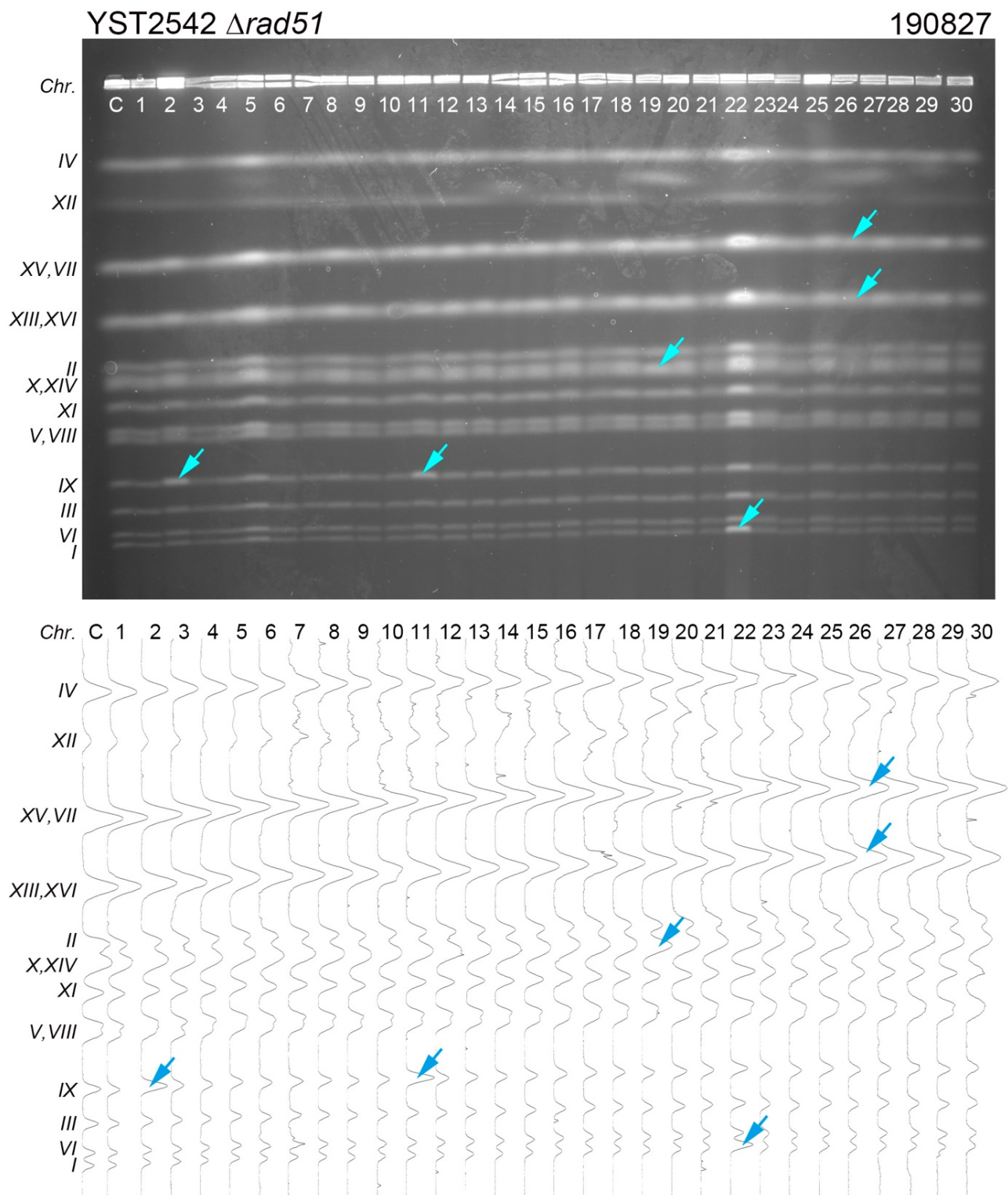


図 30. $\Delta rad51$ 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 10) .

図 29 と同じプレートから得た、別のサバイバークローンの解析結果。

Control → YST563 (Wt), lane #1-25 → Gal plate #3- 3h (#26-50), #26-30 → Raff plate #3 - 3h (#6-10))

(190531 Synchronized growth, 190827 PFGE)

YST2510 $\Delta rad52$

190424

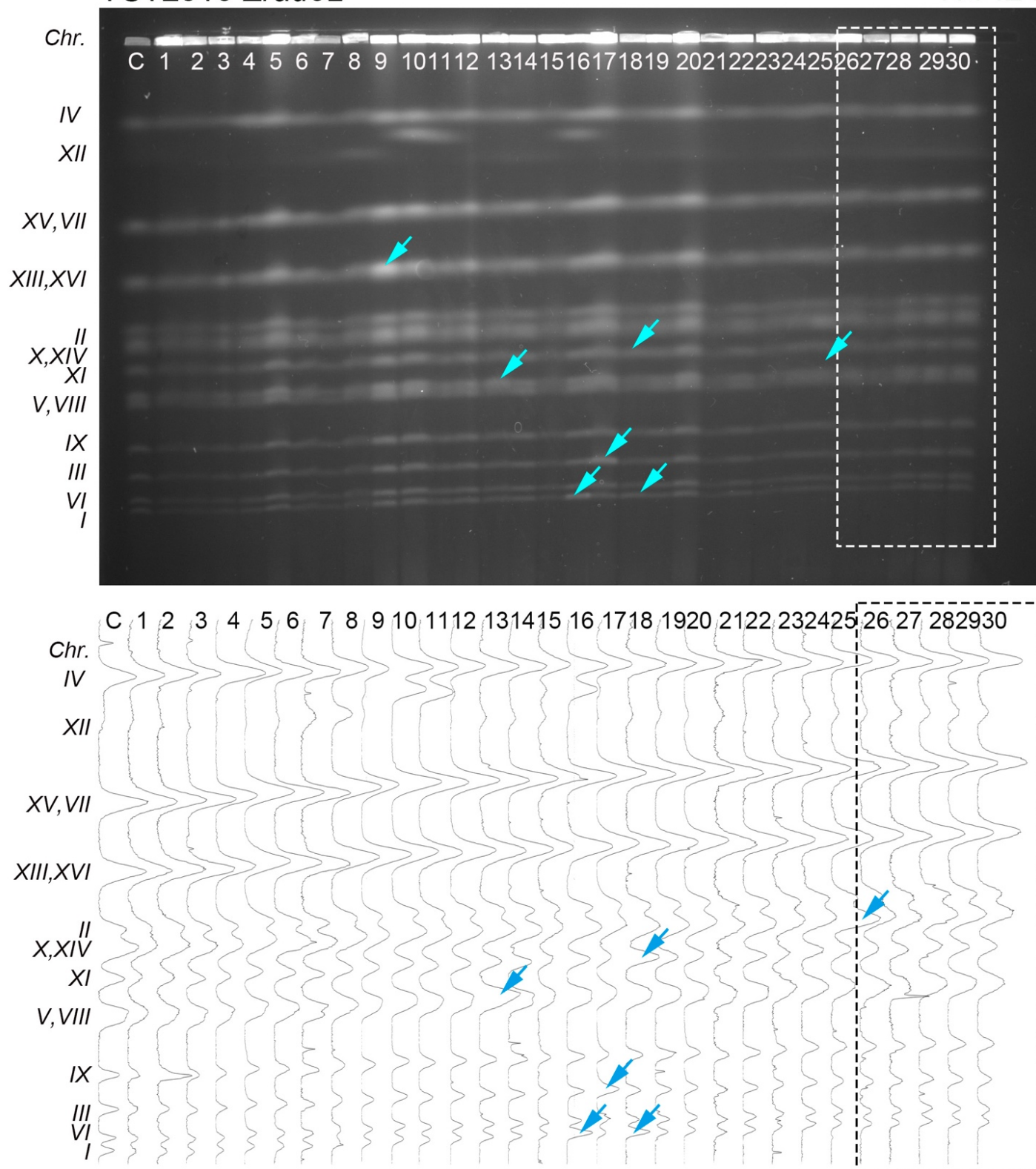


図 31. $\Delta rad52$ 株由来のサバイバークローンの染色体構成（その 1）。

図 6 と同様に行った実験で、過剰複製誘導後 3 時間後にサンプリングしたものから得たサバイバークローンの染色体像（レーン 1-25、生存率は 30.4%）。レーン 26-30 は過剰複製誘導していない方由来のもの（生存率：40.2%）。

(Control → YST563 (Wt), lane #1-25 → Gal plate #1 - 3h, #26-30 → Raff plate #1 - 3h)
(190409 Synchronized growth, 190424 PFGE)

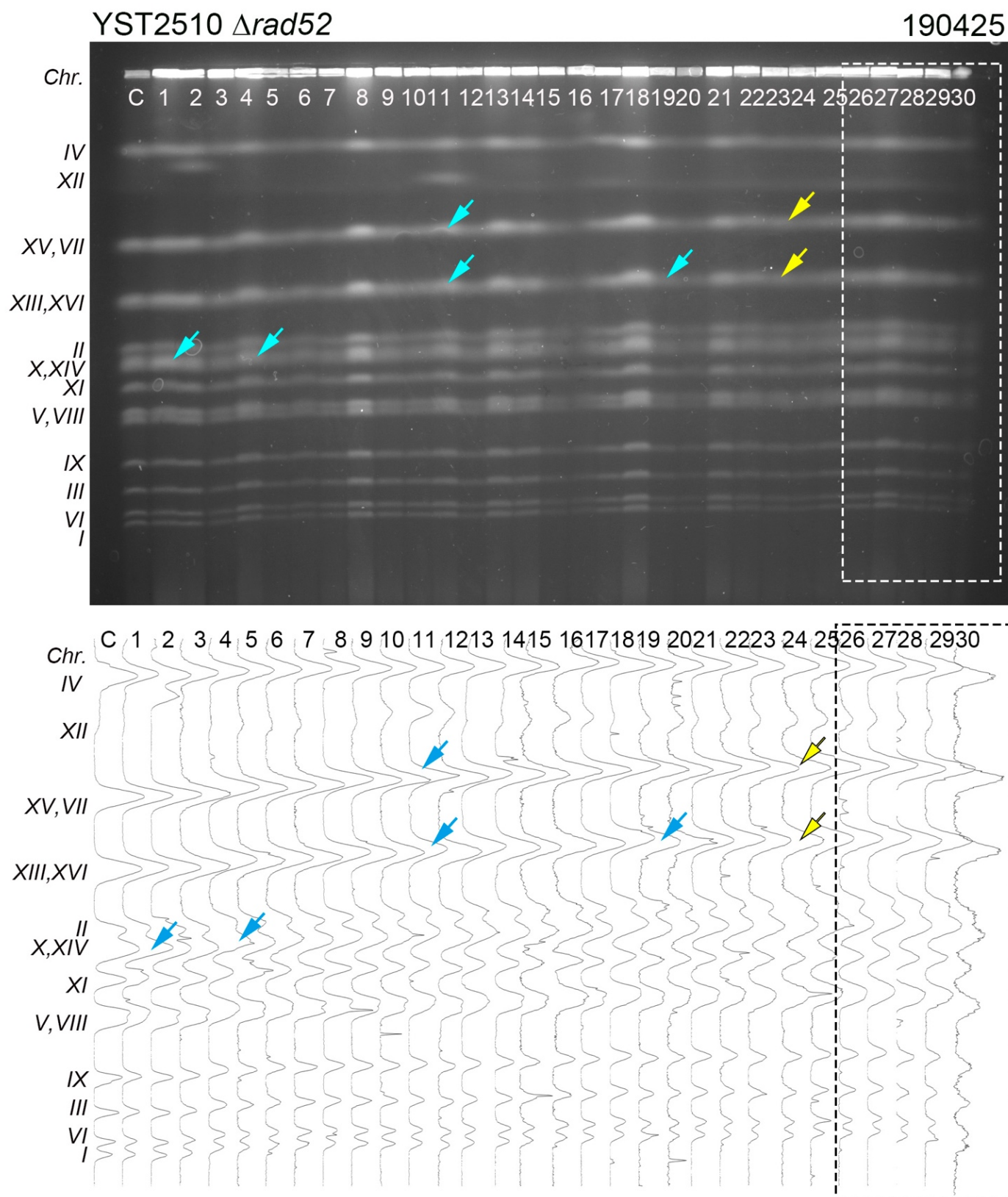


図 32. $\Delta rad52$ 株由来のサバイバークローンの染色体構成（その 2）。

図 31 と同じ実験から得た、別のサバイバークローンの解析結果。

(Control → YST563 (Wt), lane #1-25 → Gal plate #2 - 3h, #26-30 → Raff plate #2 - 3h)

(190409 Synchronized growth, 190425 PFGE)

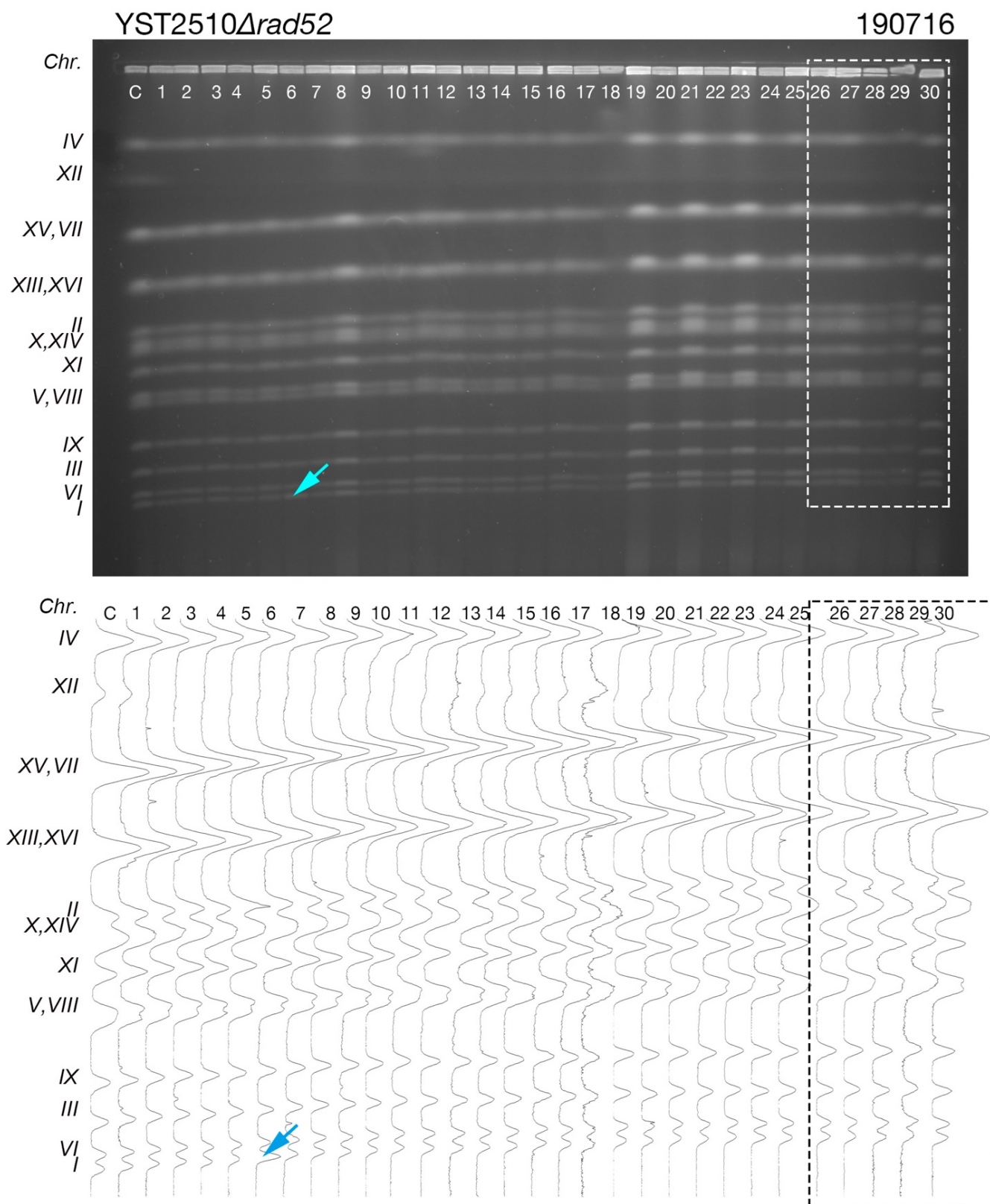


図 33. Δ rad52 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 3) .

図 6 と同様に行った実験で、過剰複製誘導後 3 時間後にサンプリングしたものから得たサバイバークローンの染色体像 (レーン 1-25、生存率は 28.1%)。レーン 26-30 は過剰複製誘導していない方由来のもの (生存率: 67.8%)。

Control→ YST563 (Wt), lane #1-25→ Gal plate #2- 3h, #26-30→ Raff plate #2 - 3h)
(190605 Synchronized growth, 190716 PFGE)

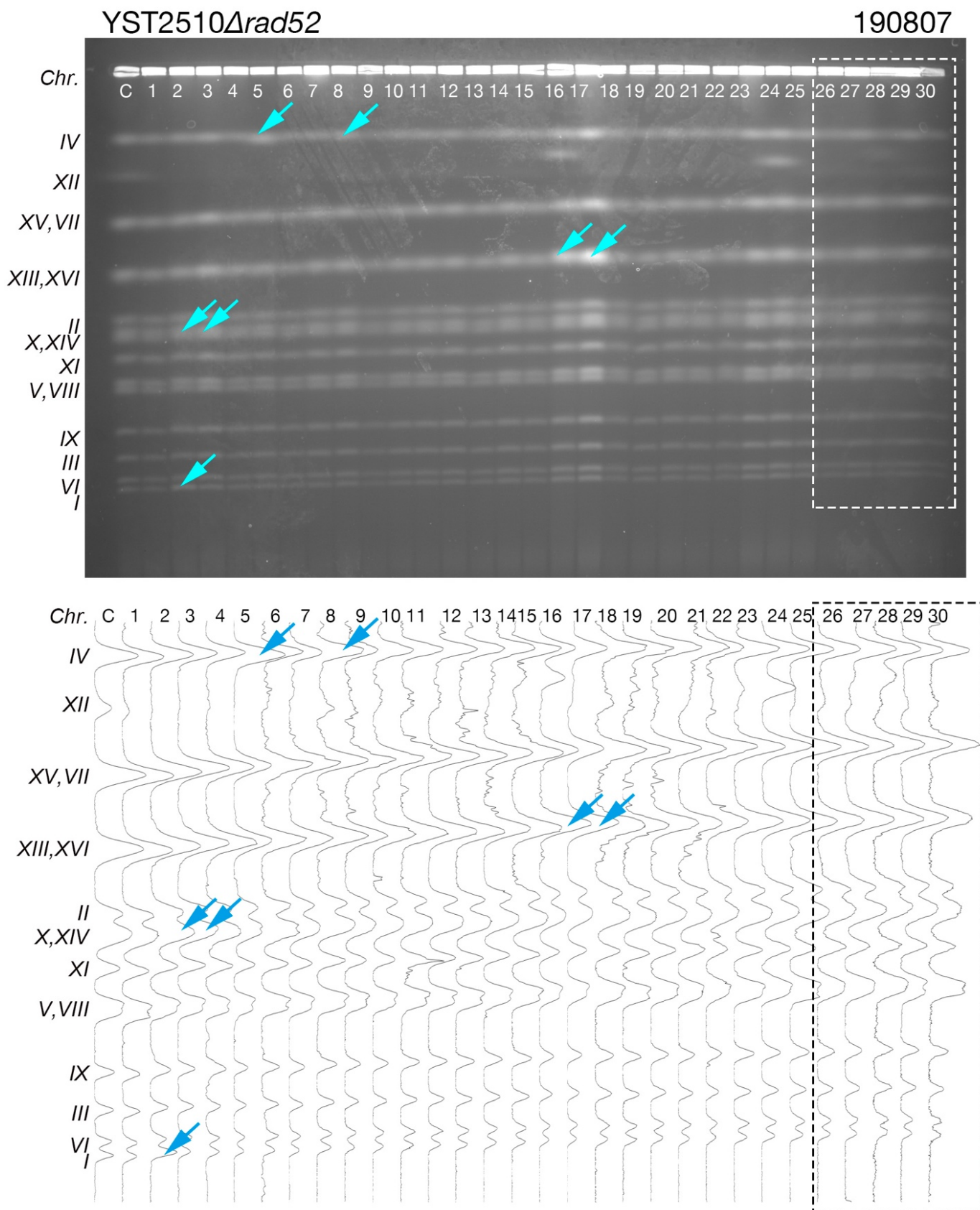


図 34. Δ rad52 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 4) .

図 33 と同じ実験から得た、別のサバイバークローンの解析結果。

Control→ YST563 (Wt), lane #1-25→ Gal plate #2- 3h, #26-30→ Raff plate #2 - 3h)
(190605 Synchronized growth, 190807 PFGE)

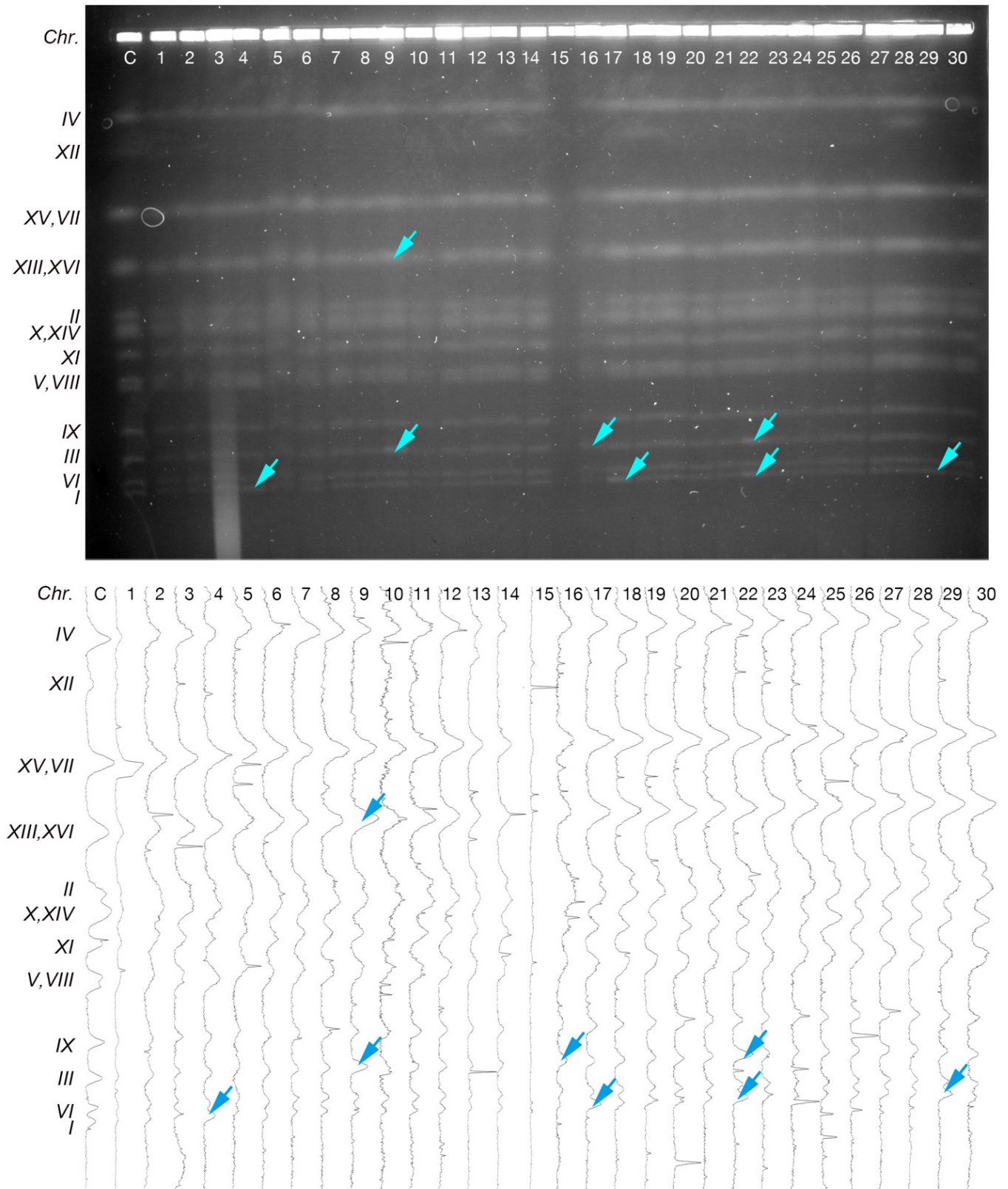


図 35. $\Delta rad52$ 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 5) .

図 6 と同様に行った実験で、過剰複製誘導後 3 時間後にサンプリングしたものから得たサバイバークローンの染色体像 (レーン 1-25、生存率は 14.3%)。レーン 26-30 は過剰複製誘導していない方由来のもの (生存率: 102.6%)。

(Control → YST563 (Wt), lane #1-10 → Gal plate #1 - 3h, #11-20 → Gal plate #2 - 3h, #21-30 → Gal plate #3 - 3h)

(191224 Synchronized growth, 200910 PFGE)

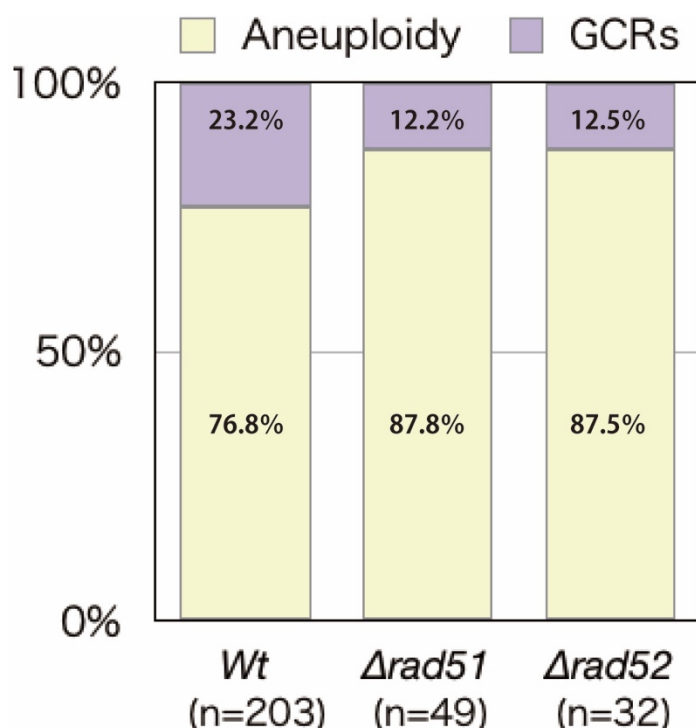


図 36. HR 欠損株サバイバーでは GCR タイプの以上染色体の出現頻度が低下する。

図 8-35 に示した PFGE 解析結果から、各株について、異常があった染色体の全数 (n) を母数として、異数性と GCR 発生の割合を比較した。

4-3-2. $\Delta yku70$ 株 (NHEJ 欠損)

NHEJ で中心的に働く Yku70 について、前項 (4-3-1) で述べた HR 因子： $\Delta rad51$ 、 $\Delta rad52$ の欠損株と同様の解析を行った (図 37)。この場合も、 $\Delta rad51$ 、 $\Delta rad52$ の欠損株と同様に、 $\Delta yku70$ 株の生存率が野生型株を下回ることはなかった。この結果は、過剰複製が起きた細胞において、HR 経路同様、NHEJ 経路も、細胞生存のためにはむしろ機能しない方がいいということを示している。また、過剰複製誘導後に得られた $\Delta yku70$ サバイバークローンの染色体構成について PFGE 解析を行った (図 38-43)。 $\Delta yku70$ 株では、DNA 過剰複製を誘導する前からその染色体構成が異常となっている細胞が生じていたと思われるケースが多くあった。そのため、染色体異常が過剰複製により誘導されたものかどうかの見極めが難しく、確定的な結論を得るための十分な数が得られなかったと判断した。しかし、解析後の印象としては、GCR の割合が多い傾向があった。この印象が正しいとすれば、HR 欠損株の結果とは逆の傾向である。

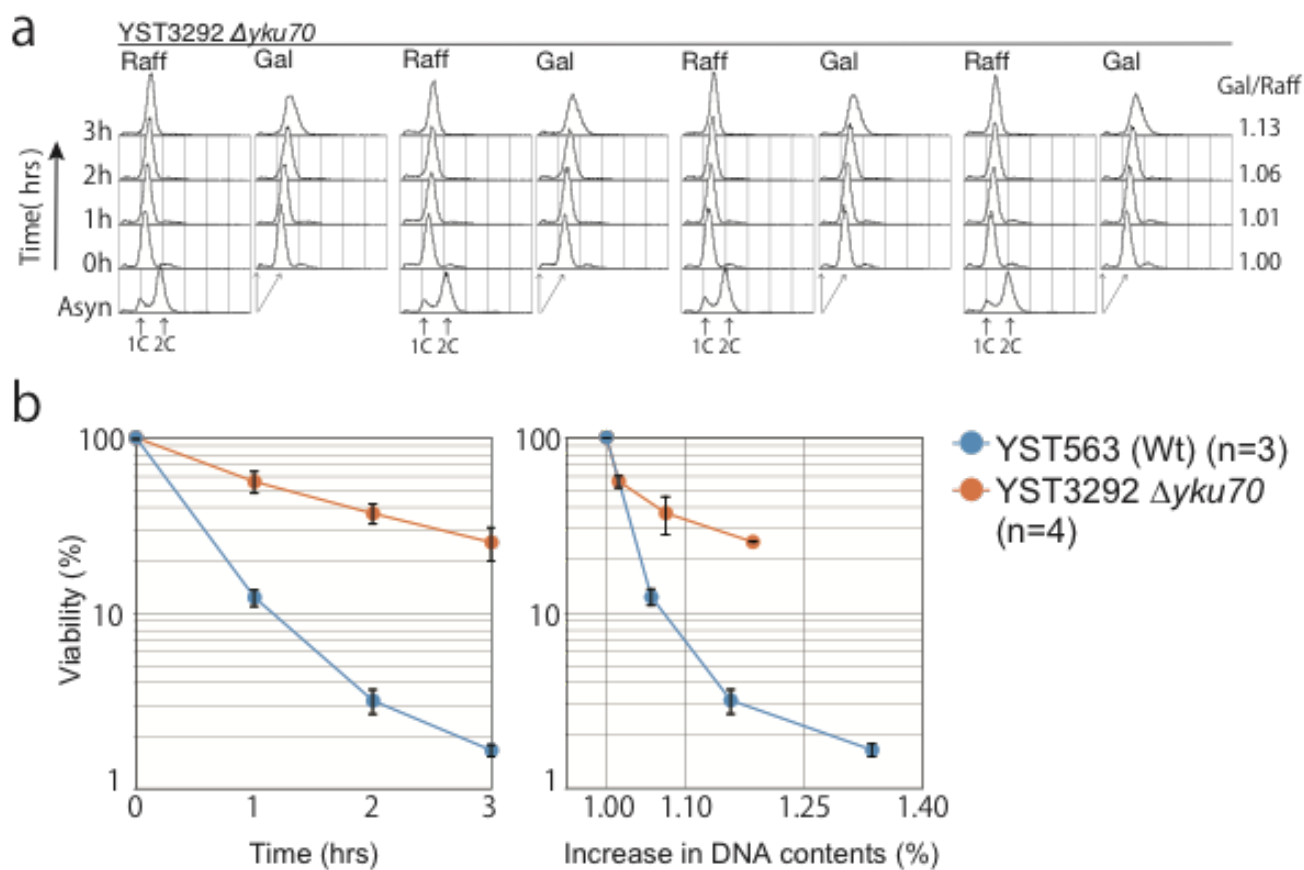


図 37. $\Delta yku70$ 株は、過剰複製誘導後に $YKU70$ 野生型株よりも高い生存率を示す。

(a) $\Delta yku70$ の独立な 4 コロニーを図 6 同様に培養し、その DNA 含量をフローサイトメーターで計測した。各時間の Raff, Gal それぞれの DNA 含量の平均値より求めた DNA 増加率 (Ga/Raff) を右側に示した。(b) a の各時間における生存率を図 7 同様に算出した。野生型株のデータは図 7 のものを使用。Error bar: SD.

(191224 Synchronized Growth, 191226 Flow Cytometry)

YST3292 $\Delta yku70$

190507

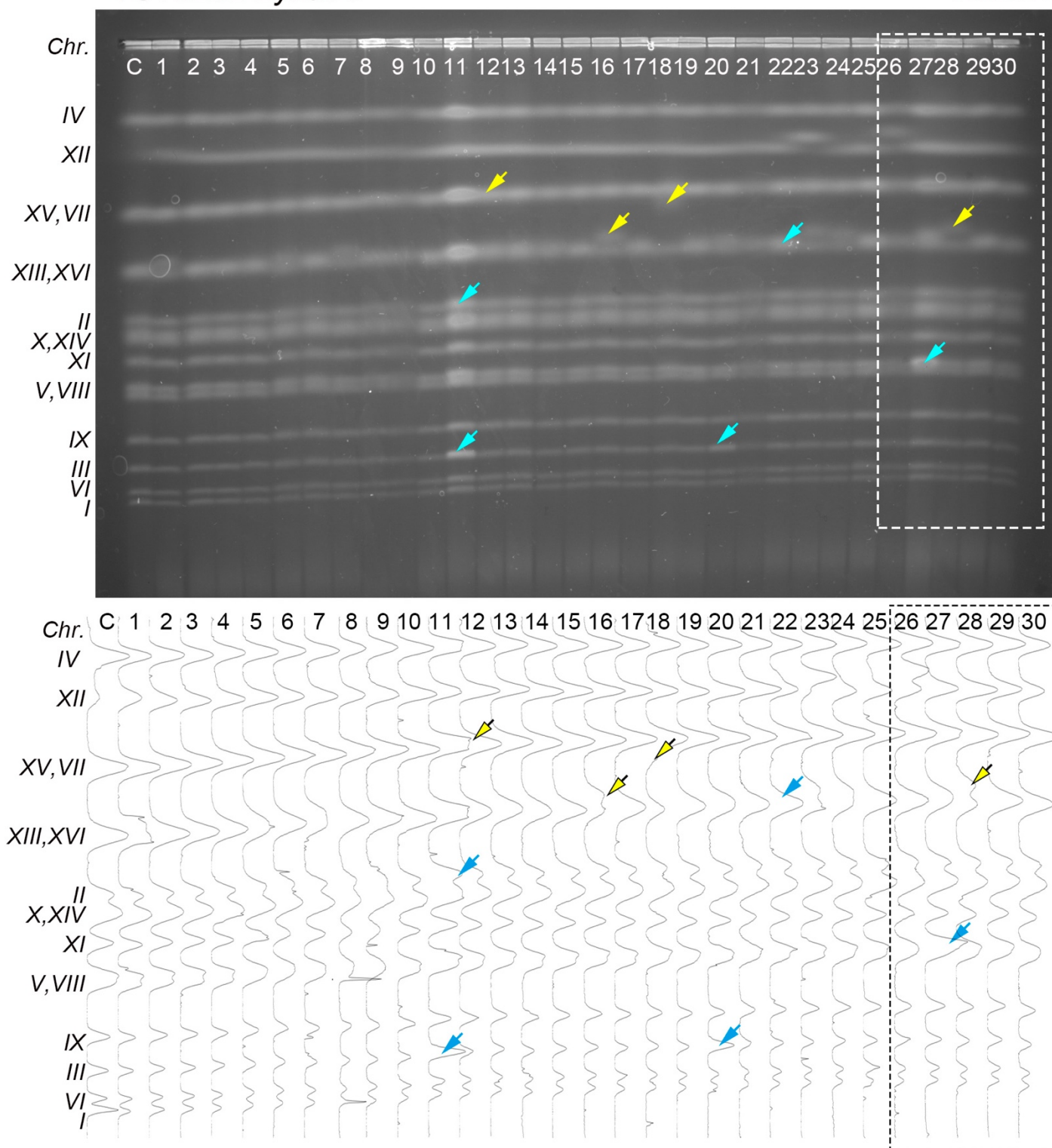


図 38. $\Delta yku70$ 株由来のサバイバークローンの染色体構成（その 1）。

図 6 と同様に行った実験で、過剰複製誘導後 3 時間後にサンプリングしたものから得たサバイバークローンの染色体像（レーン 1-25、生存率は 24.3%）。レーン 26-30 は過剰複製誘導していない方由来のもの（生存率：45.3%）。

(Control→ YST563 (Wt), lane #1-25→ Gal plate #1- 3h, #26-30→ Raff plate #1 - 3h)

(190409 Synchronized growth, 190507 PFGE)

YST3292 $\Delta yku70$

190509

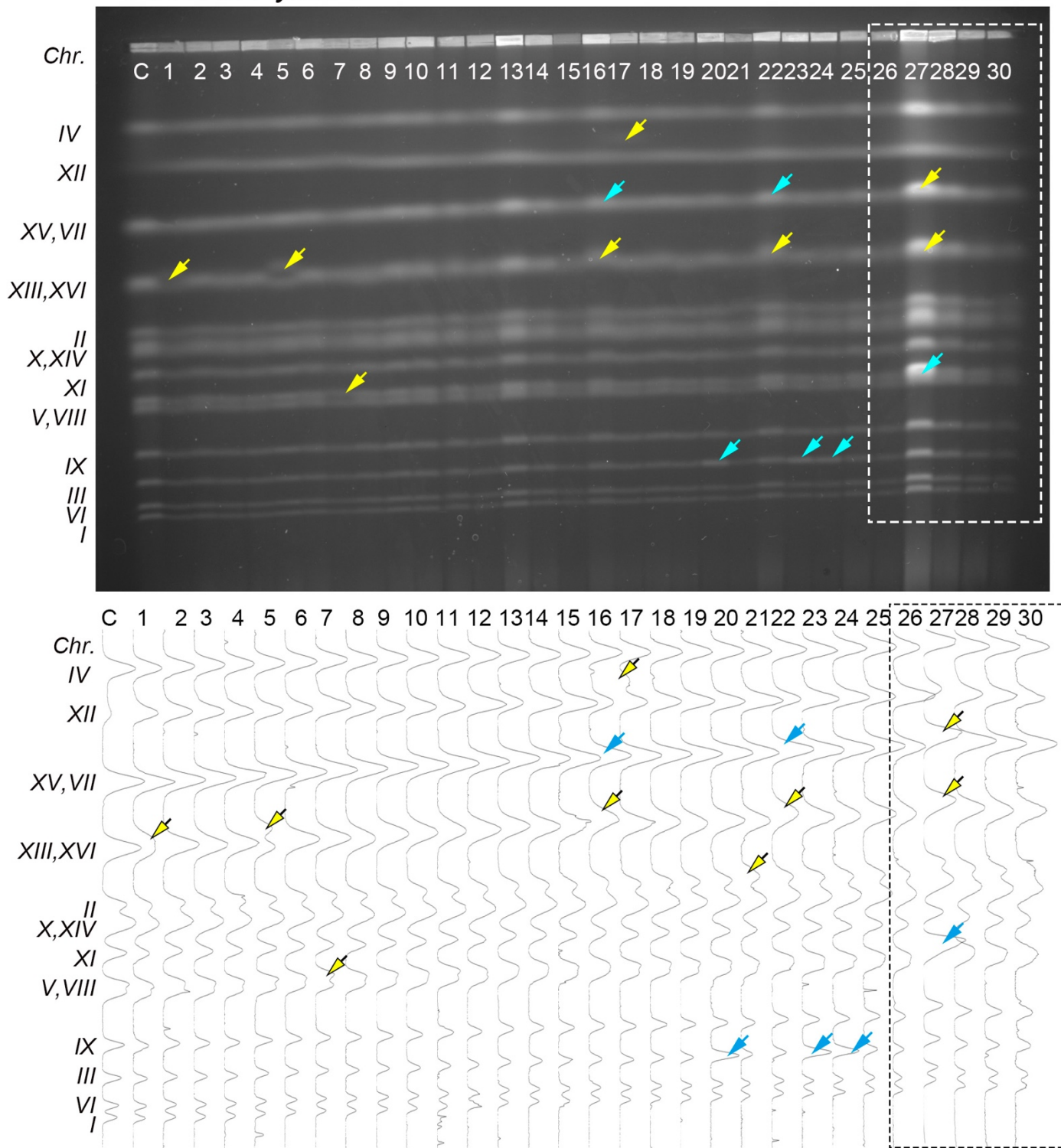


図 39. $\Delta yku70$ 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 2) .

図 38 と同じ実験から得た、別のサバイバークローンの解析結果。

(Control → YST563 (Wt), lane #1-25 → Gal plate #2- 3h, #26-30 → Raff plate #2 - 3h)

(190409 Synchronized growth, 190509 PFGE)

YST3292 $\Delta yku70$

190722

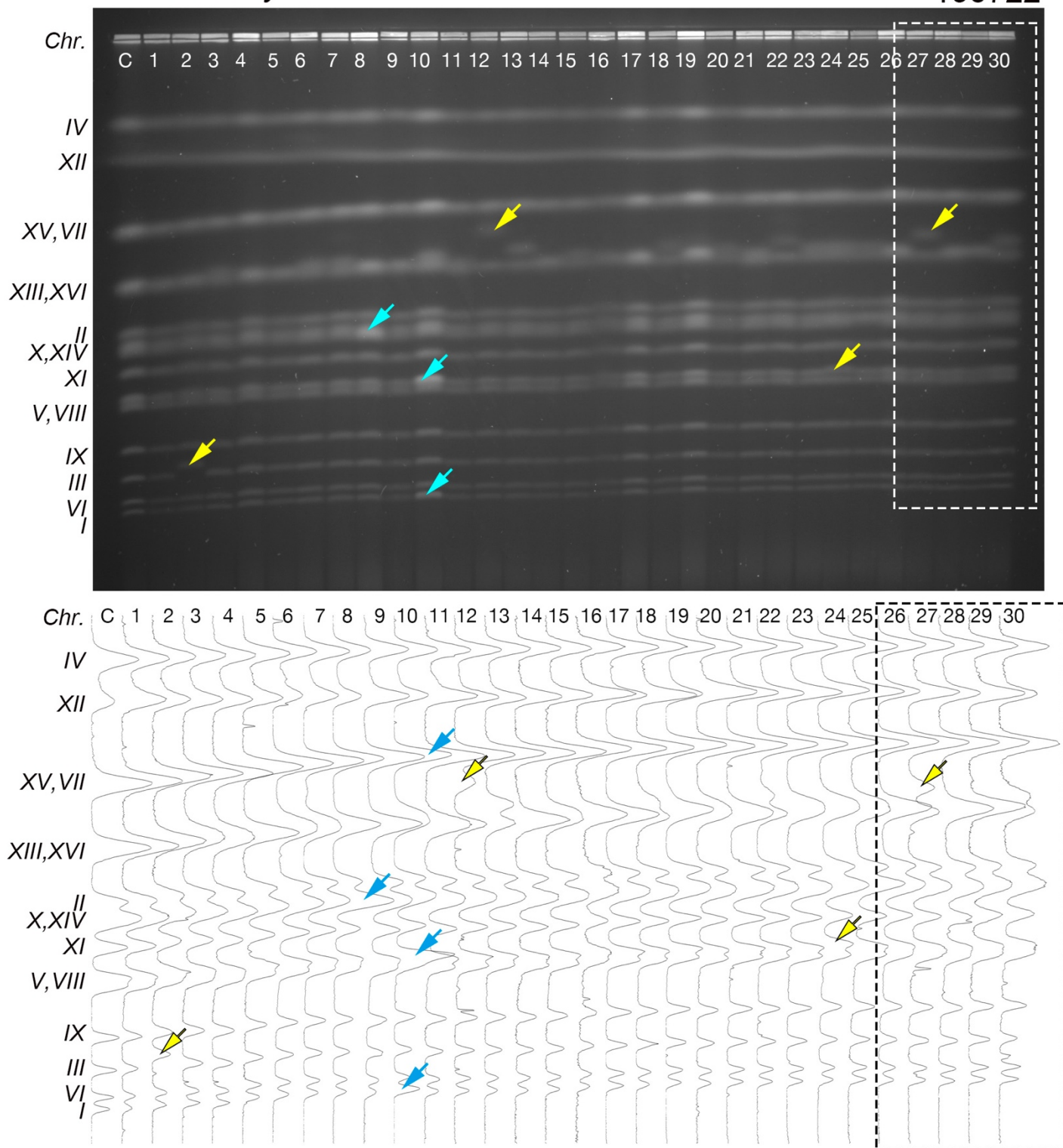


図 40. $\Delta yku70$ 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 3) .

図 6 と同様に行った実験で、過剰複製誘導後 3 時間後にサンプリングしたものから得たサバイバークローンの染色体像 (レーン 1-25、生存率は 48.4%)。レーン 26-30 は過剰複製誘導していない方由来のもの (生存率: 41.7%)。

(Control → YST563 (Wt), lane #1-25 → Gal plate #1 - 3h, #26-30 → Raff plate #1 - 3h)
(190605 Synchronized growth, 190722 PFGE)

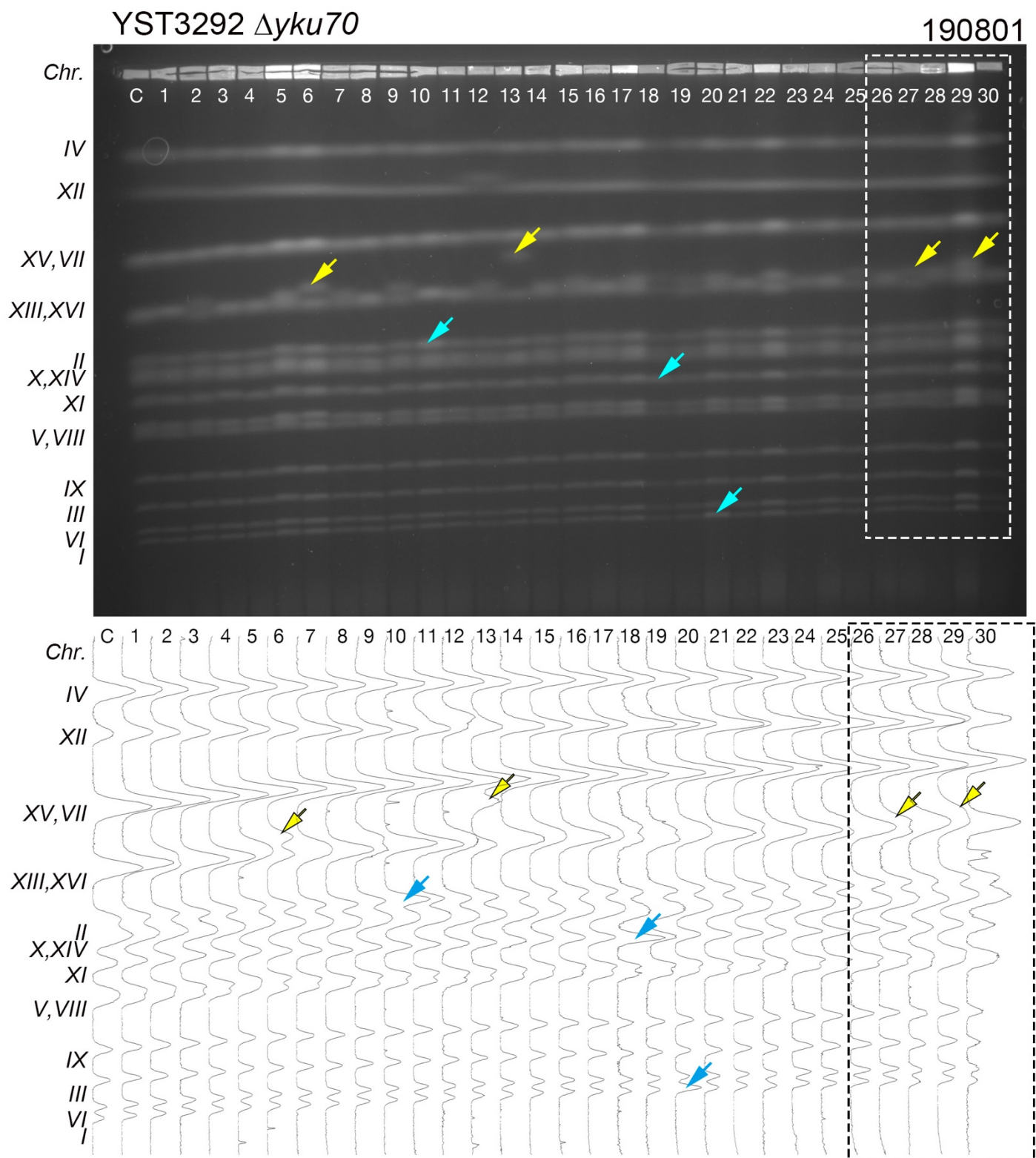


図 41. $\Delta yku70$ 株由来のサバイバークローンの染色体構成（その 4）。

図 40 と同じ実験から得た、別のサバイバークローンの解析結果。

(Control→ YST563 (Wt), lane #1-25→ Gal plate #2- 3h, #26-30→ Raff plate #2 - 3h)

(190605 Synchronized growth, 190801 PFGE)

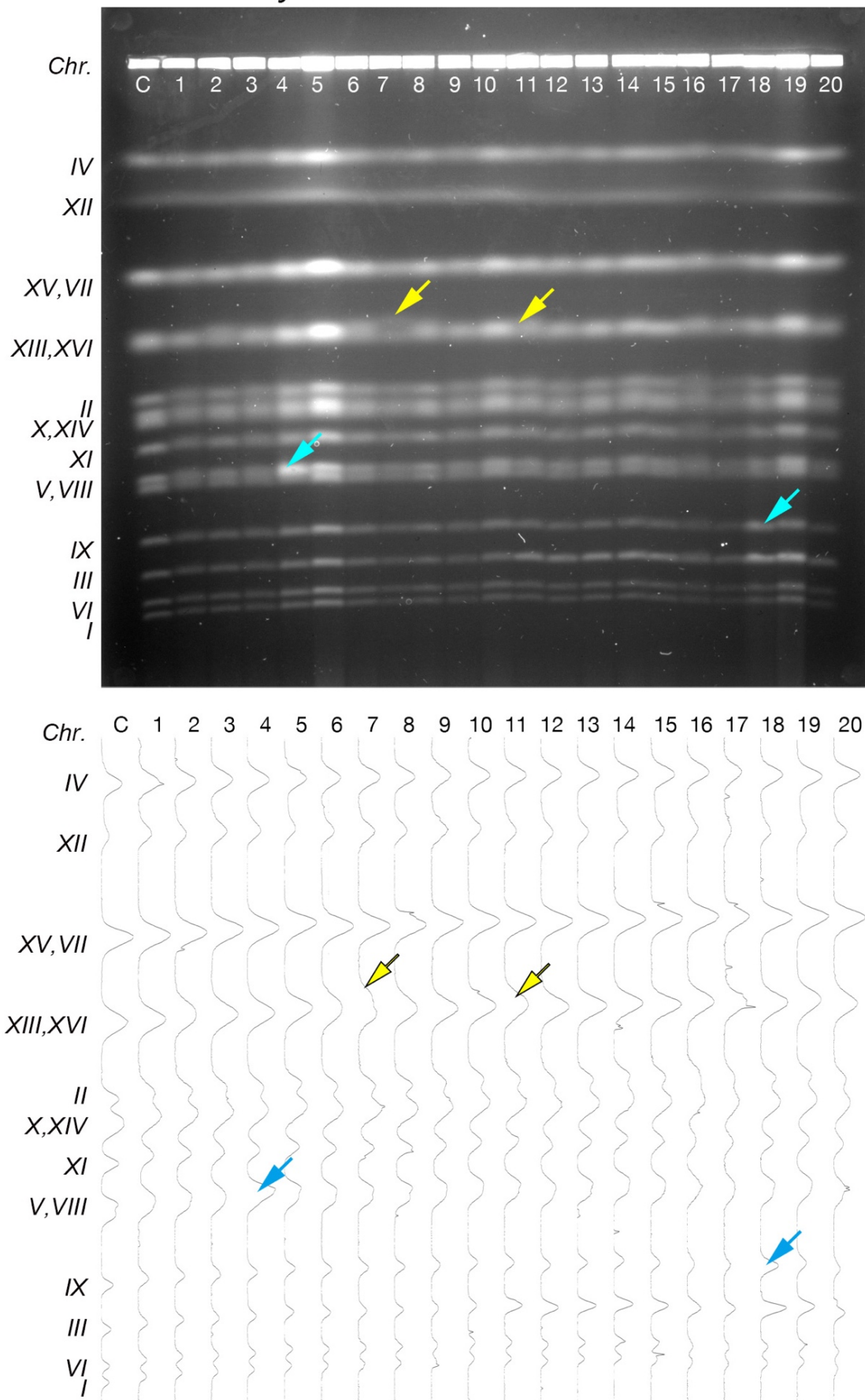


図 42. $\Delta yku70$ 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 5) .

図 6 と同様に行った実験で、過剰複製誘導後 3 時間後にサンプリングしたものから得たサバイバークローンの染色体像 (レーン 1-20、生存率は 25.4%)。

(Control → YST563 (Wt), lane #1-10 → Gal plate #1 - 3h, #11-20 → Gal plate #2 - 3h)

(191224 Synchronized growth, 200914 PFGE)

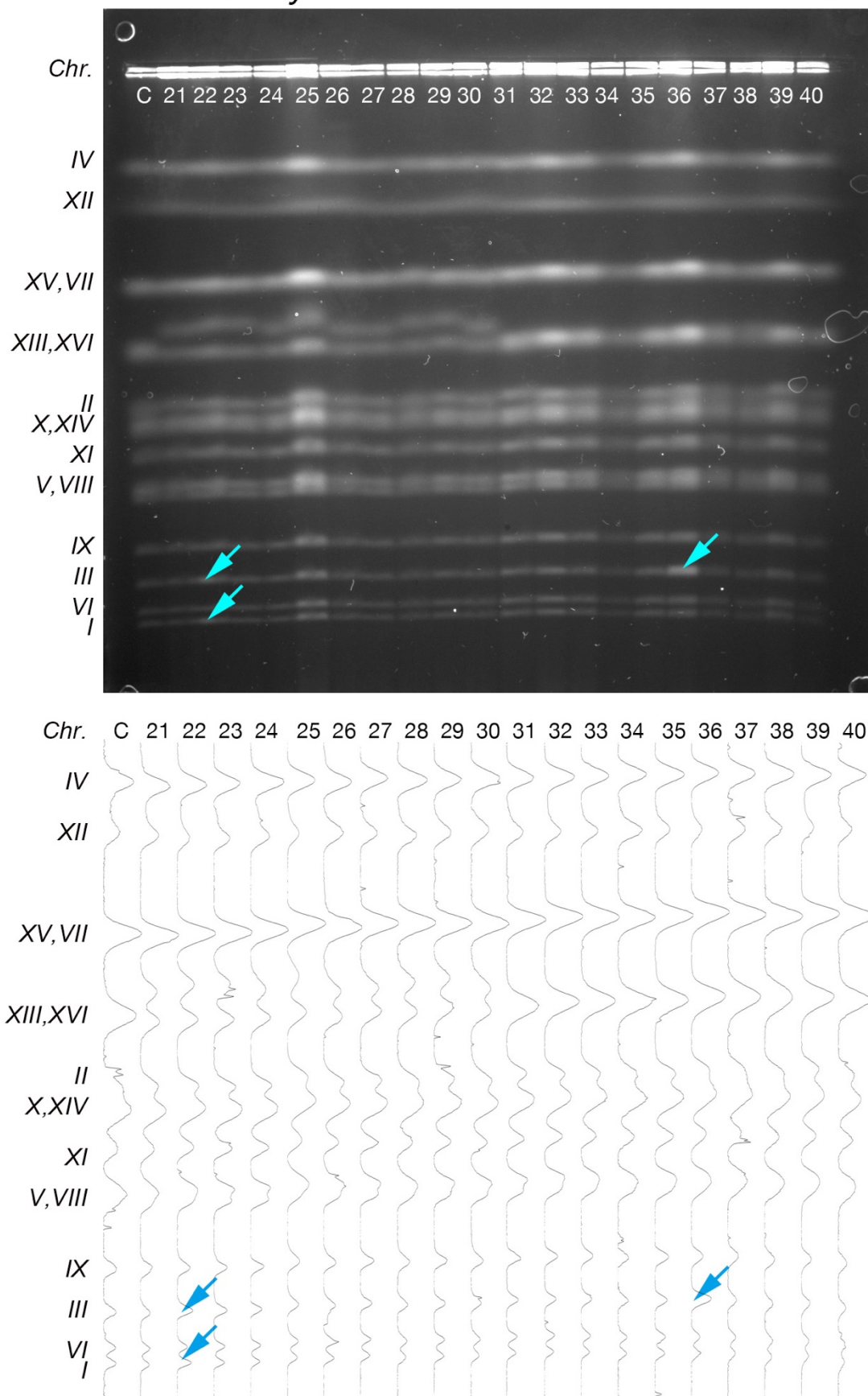


図 43. $\Delta yku70$ 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 6) .

図 42 と同じ実験から得た、別のサバイバークローンの解析結果。

(Control→ YST563 (Wt), lane #21-30→ Gal plate #1- 3h, #21-40→ Gal plate #2 - 3h)
(191224 Synchronized growth, 200929 PFGE)

4-4. DNA ダメージチェックポイント制御因子 Rad53 は過剰複製後の細胞生存率に寄与しない

前項で、DNA 過剰複製後の細胞において、DSB 修復経路は細胞の生存率に寄与していないという驚くべき結果が得られた。そこで、他の DNA ダメージ応答経路についても解析を進めることとした。そこでまず、DNA ダメージチェックポイント経路で中心的な役割を果たす Rad53 について解析を行った。*RAD53* は必須遺伝子であるが、リボヌクレオチドリダクターゼ (Rnr) の阻害タンパクである Sml1 を欠損した $\Delta sml1$ バックグラウンドを用いることで欠損株を作製できる (Zhao et al., 1998)。そこで、ここでは、 $\Delta sml1$ 株を野生型コントロールとして用いた。 $\Delta sml1 \Delta rad53$ 株は生育が遅く、生存細胞数を揃えることが難しかったため、異なる希釈倍率の培養液希釈系列を複数作製し、さまざまな培地にスポットし、その生育を見た。 $\Delta sml1$ 株は、*SML1* 野生型株と比較し、その生育に差は認められなかった。一方、 $\Delta sml1 \Delta rad53$ 株（以下単に $\Delta rad53$ と表記）は、広く知られている通り、zeocin や HU に対し、強い感受性を示した。また、過剰複製誘導可能なバックグラウンドにおいても、過剰複製誘導後にコロニー形成能の低下を示した (図 44)。

Rad53 欠損の過剰複製後の細胞への影響をさらに詳しく知るため、同調培養による解析を行なった。*Asm11*、*4rad53*ともに3つの独立したクローンを用いて解析を行なったが、

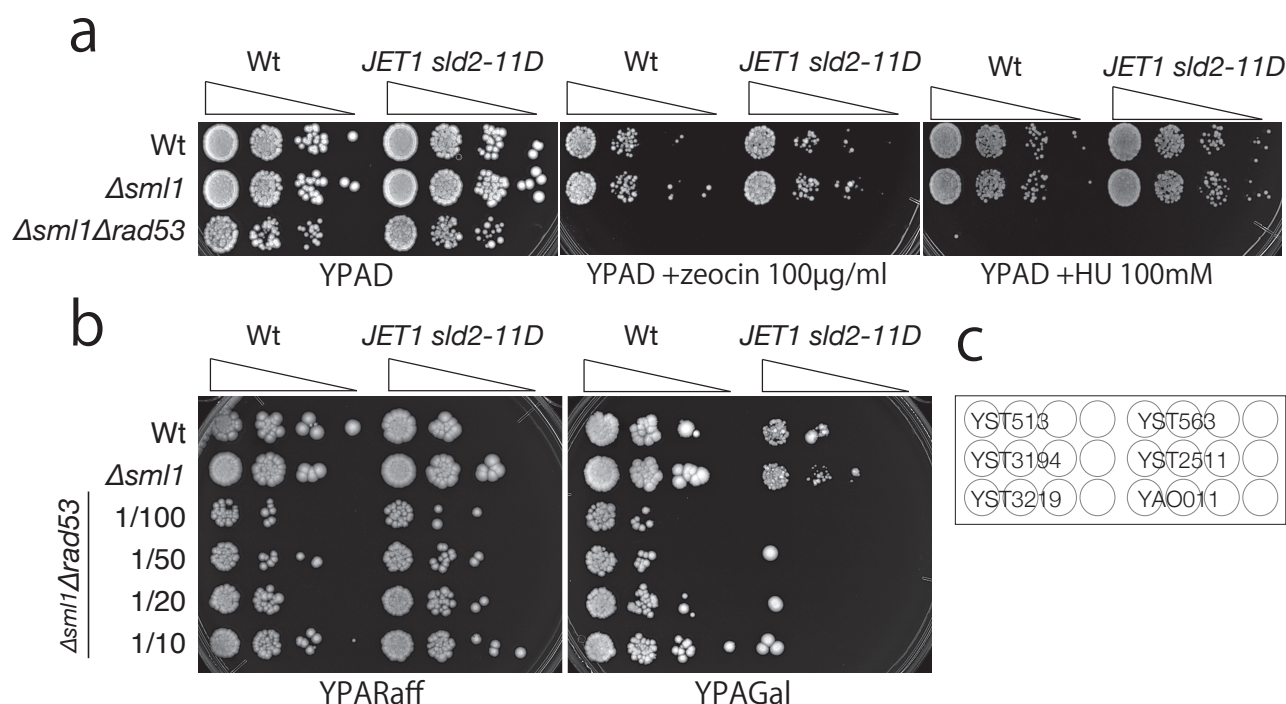


図 44. Rad53 欠損細胞は過剰複製誘導後に、生育が悪くなる。

(a, b) c に示した各株を終夜培養したものから 1/10~1/100 の希釈培養液を作製し、そこから 10 倍希釈系列を作製し、下に示した各組成のプレートへスポットし、30°C で 4 日間培養した。上部に示した Wt バックグラウンドは YST513 (*CDC45^{wt} GALp* vector)、*JET1 sld2-11D* バックグラウンドは YST563 (*CDC45^{JE11} GALp-sld2-11D*)。 (c) スポットした株名を示す。

(a: 201011 spot, 201015 photography, b: 201223 spot, 201227 photography)

Flow cytometer による DNA 含量の計測の結果 (図 45a)、*Δrad53* の 1 つのクローン (#3) が明らかに異常であったため、このクローンより得たデータはその後の解析より除外した。*Δrad53* 株の過剰複製後の細胞生存率は、*Δsml1* 株に比べて変わらないという結果となった (図 45b)。この結果はスポットアッセイの結果 (図 44) とは異なる傾向である。

Δrad53 株についてもサバイバークローンの染色体構成について解析を行った (図 46-50)。*Δsml1* 株と *Δrad53* 株で、DNA 含量の増加率・生存率は同程度であったが、サバイバーの染色体構成をみると、*Δrad53* 株では異常のある染色体構成を示したサバイバーの割合が少なかった (*Δsml1* 株：35/52 クローン、*Δrad53* 株：20/60 クローン)。

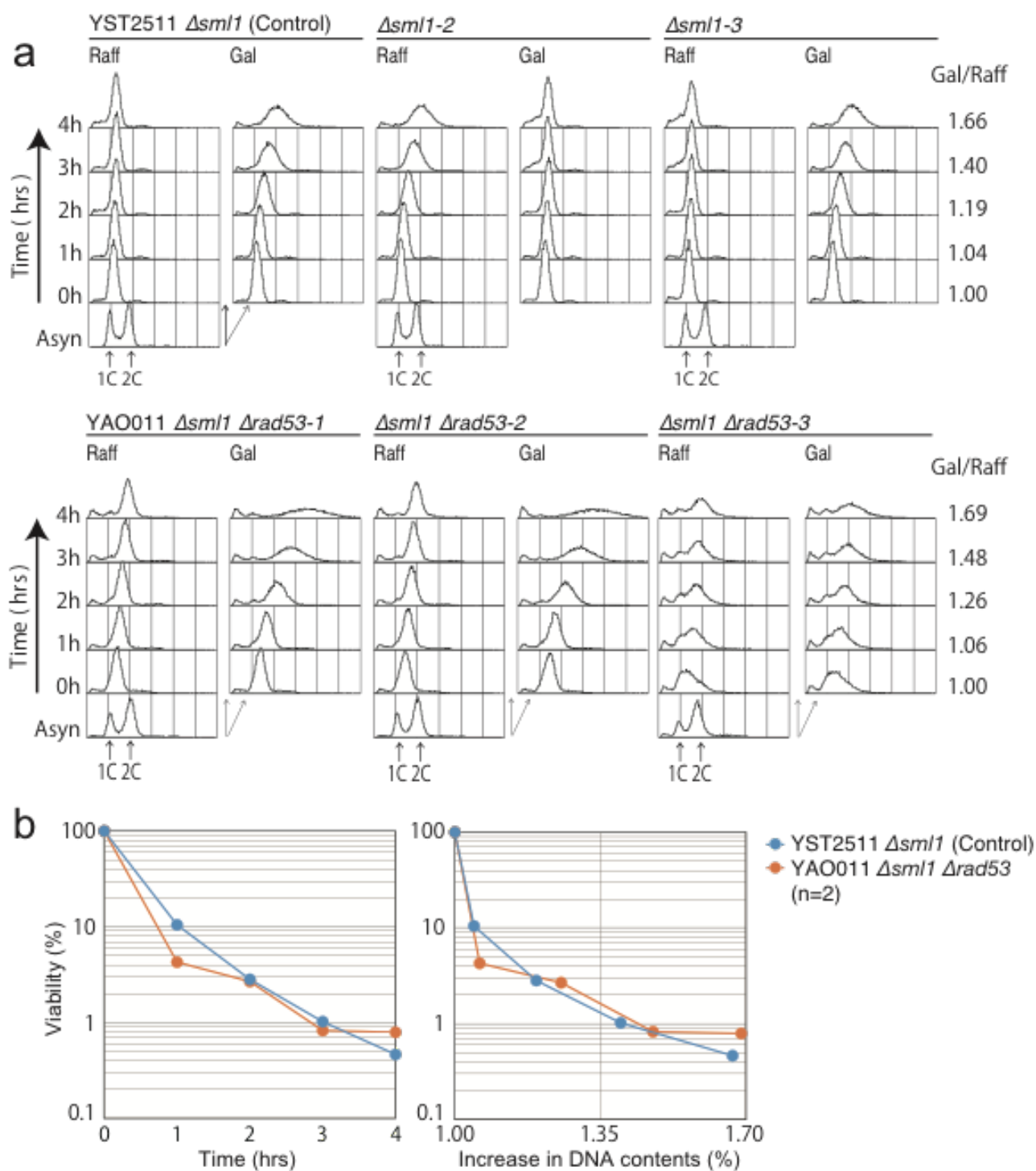


図 45. $\Delta rad53$ 株の過剰複製誘導後の生存率は野生型株と変わらない。

(a) $\Delta sml1$ 、 $\Delta rad53$ の独立な 3 コロニーを図 6 同様に培養し、その DNA 含量をフローサイトメーターで計測した。各時間の Raff, Gal それぞれの DNA 含量の平均値より求めた DNA 増加率 (Ga/Raff) を右側に示した。(b) a の各時間における生存率を図 7 同様に算出した。

(201021 Synchronized Growth, 201022 Flow Cytometry)

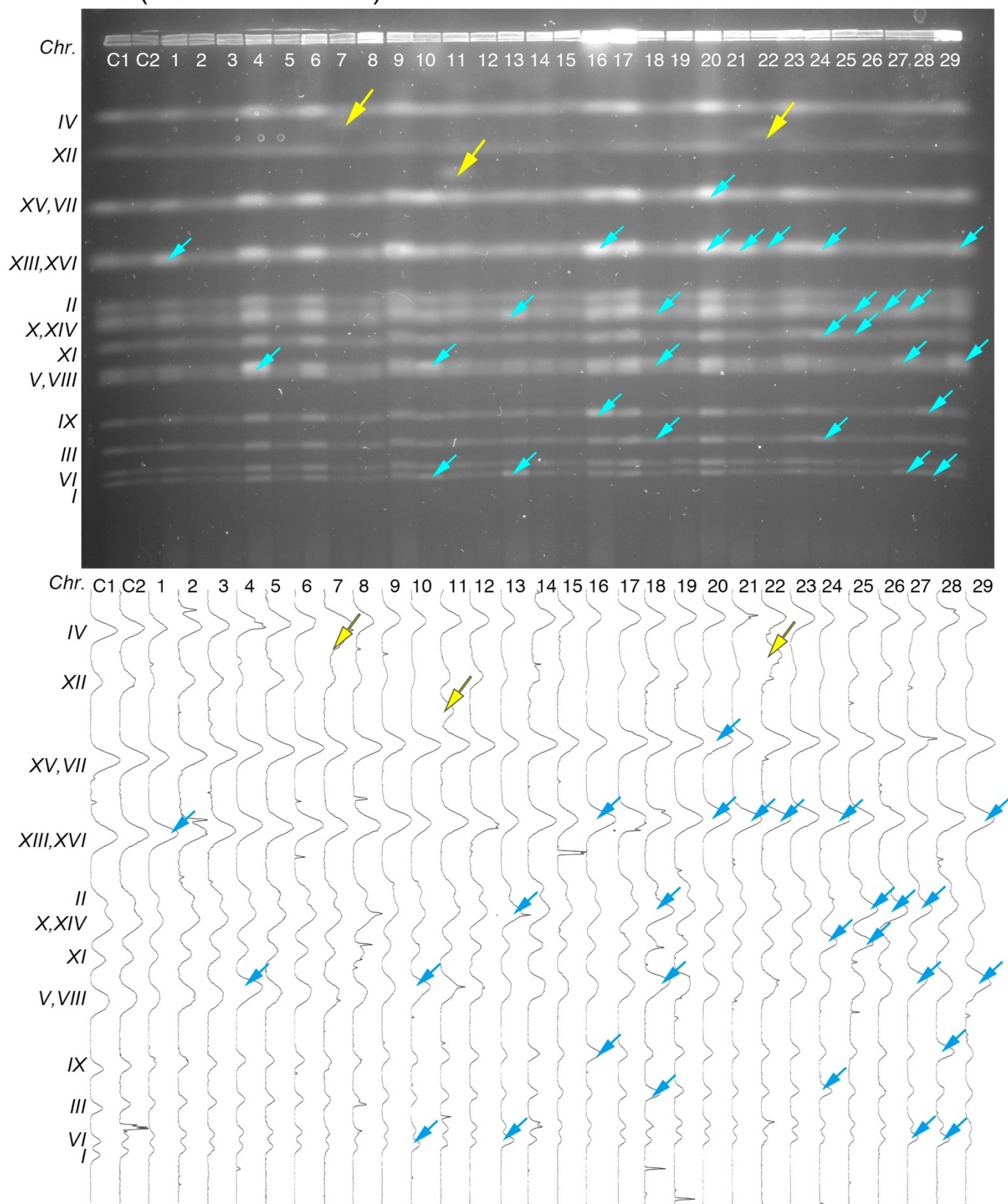


図 46. $\Delta sml1$ 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 1) .

図 6 と同様に行った実験で、過剰複製誘導後 3, 4 時間後にサンプリングしたものから得たサバイバークローンの染色体像 (3h: レーン 1-16, 25-29、生存率は 0.93%, 4h: レーン 17-23、生存率は 1.06%)。

(Control #1→YST563 (Wt), Control#2→YST2511 $\Delta sml1$ (Wt), lane #1-16 → plate#1- 3h, #17-23 → plate#1- 4h, #25-29 → plate#2 - 3h)

(201021 Synchronized growth, 201109 PFGE)

Wt (YST2511 $\Delta sml1$)

201110

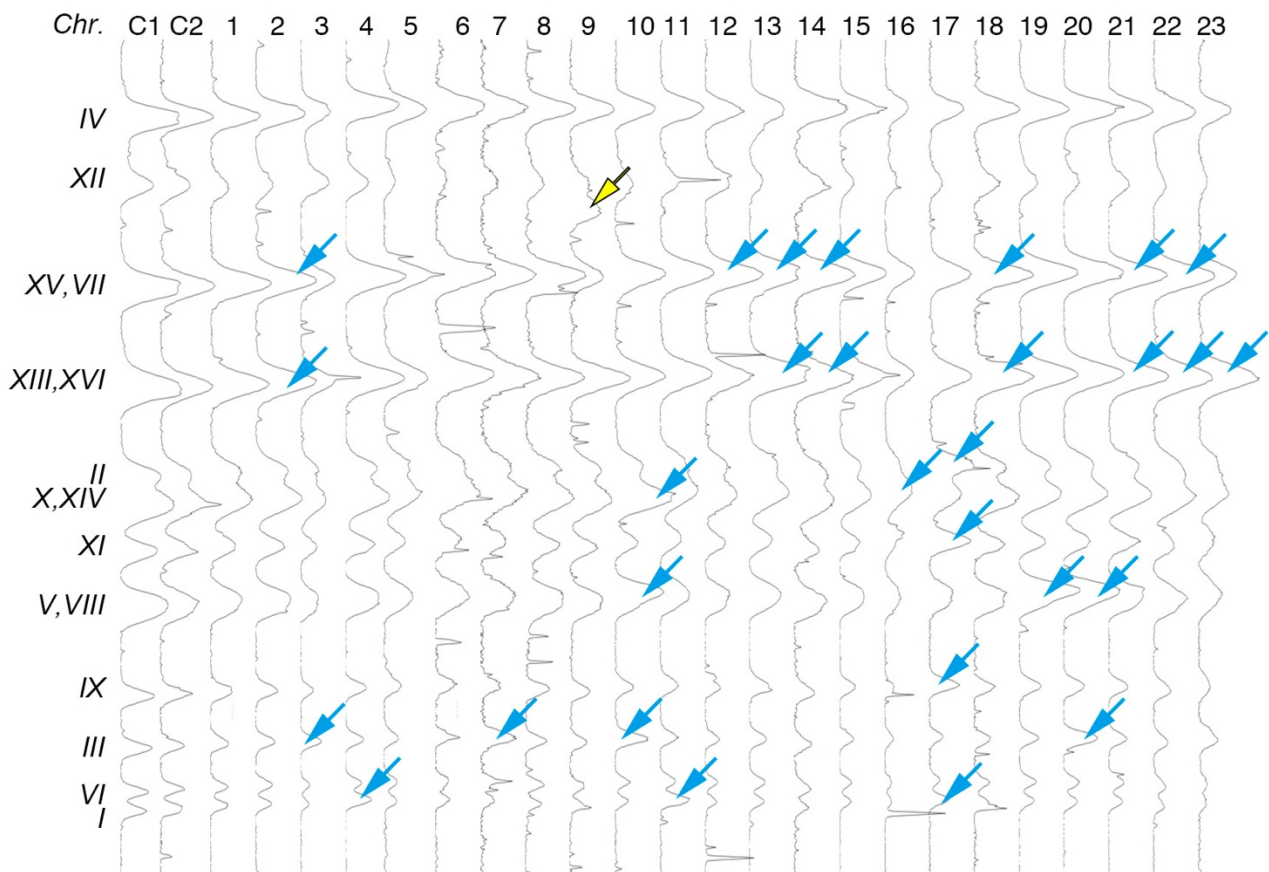
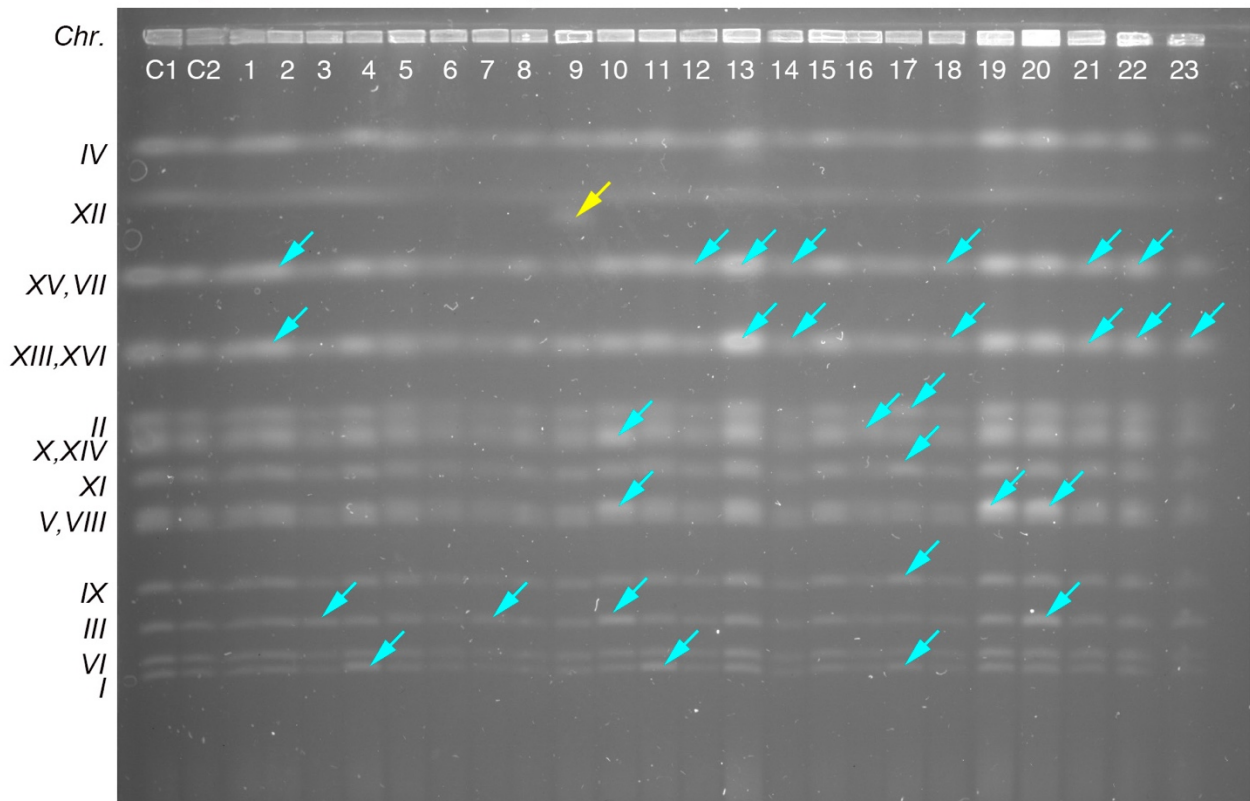


図 47. $\Delta sml1$ 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 2) .

図 46 と同じ実験から得た、別のサバイバークローンの解析結果。

(Control #1→YST563 (Wt), Control#2→YST2511 $\Delta sml1$ (Wt), lane #1-12 → plate#2- 3h, #13-23 → plate#2 - 4h)

(191021 Synchronized growth, 201110 PFGE)

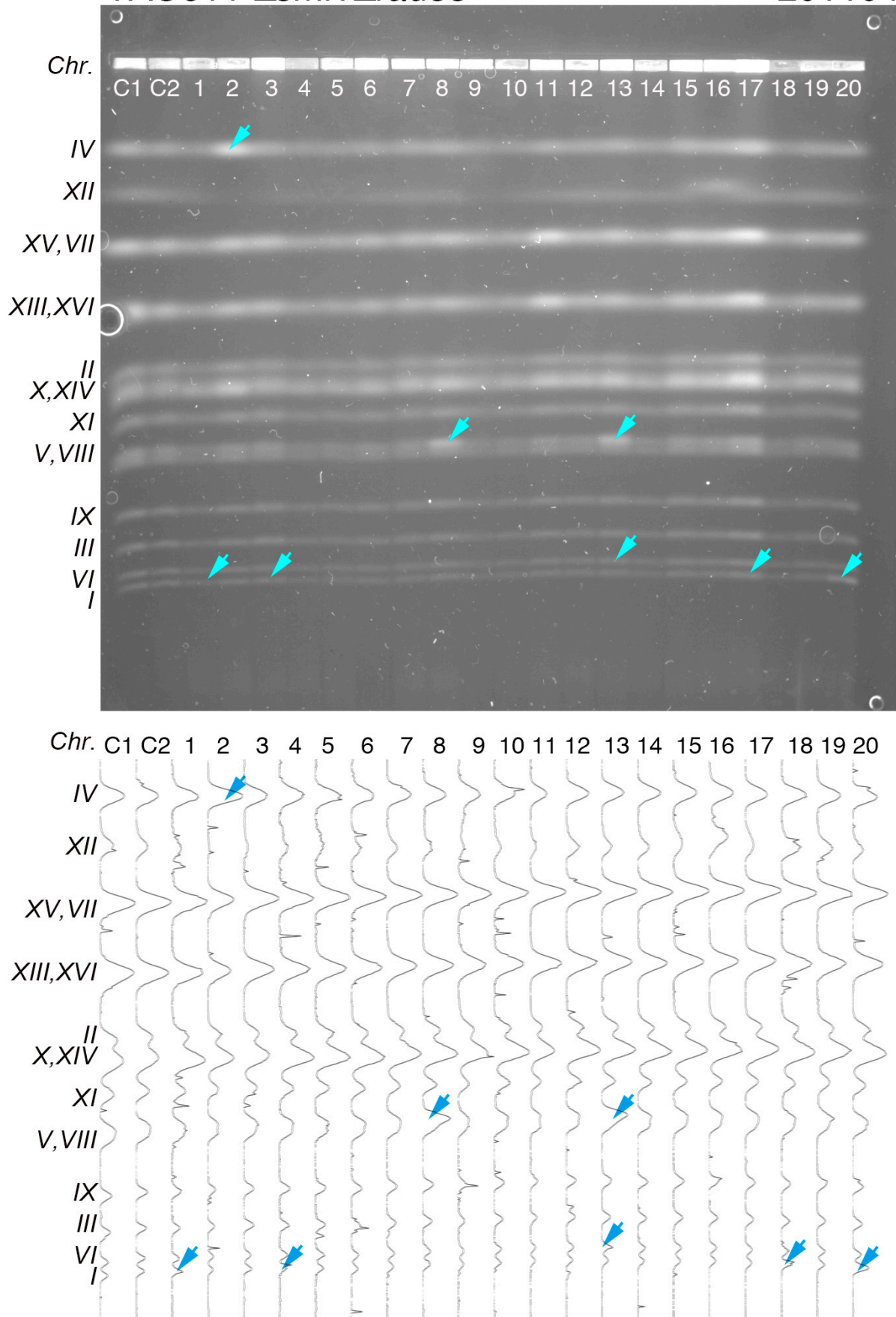


図 48. $\Delta sml1 \Delta rad53$ 株由来のサバイバークロンの染色体構成 (その 1) .

図 6 と同様に行った実験で、過剰複製誘導後 3, 4 時間後にサンプリングしたものから得たサバイバークロンの染色体像 (3h: レーン 1-11、生存率は 0.83%, 4h: レーン 12-20、生存率は 0.79%)。

(Control #1→YST563 (Wt), Control#2→YST2511 $\Delta sml1$ (Wt), lane #1-11 → plate#1- 3h, #12-20 → plate#1 - 4h)

(191021 Synchronized growth, 201104 PFGE)

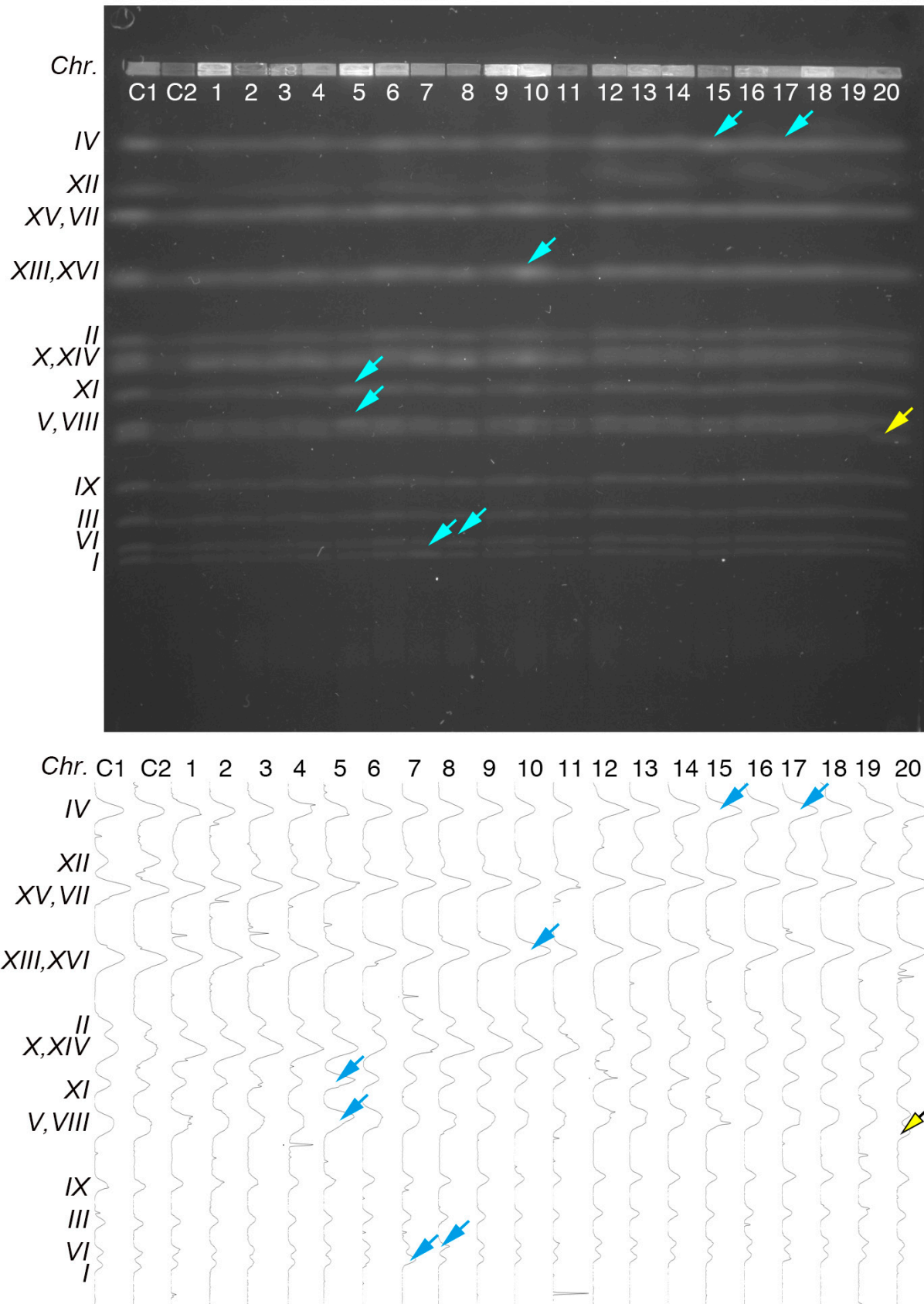


図 49. $\Delta sml1 \Delta rad53$ 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 2) .

図 46 と同じ実験から得た、別のサバイバークローンの解析結果。

(Control #1→YST563 (Wt), Control#2→YST2511 $\Delta sml1$ (Wt), lane #1- 4 → plate#1- 4h, #5-7 → plate#2 - 3h, #8-11 → plate#2 - 4h, #12-20 → plate#3 - 3h)

(191021 Synchronized growth, 201105 PFGE)

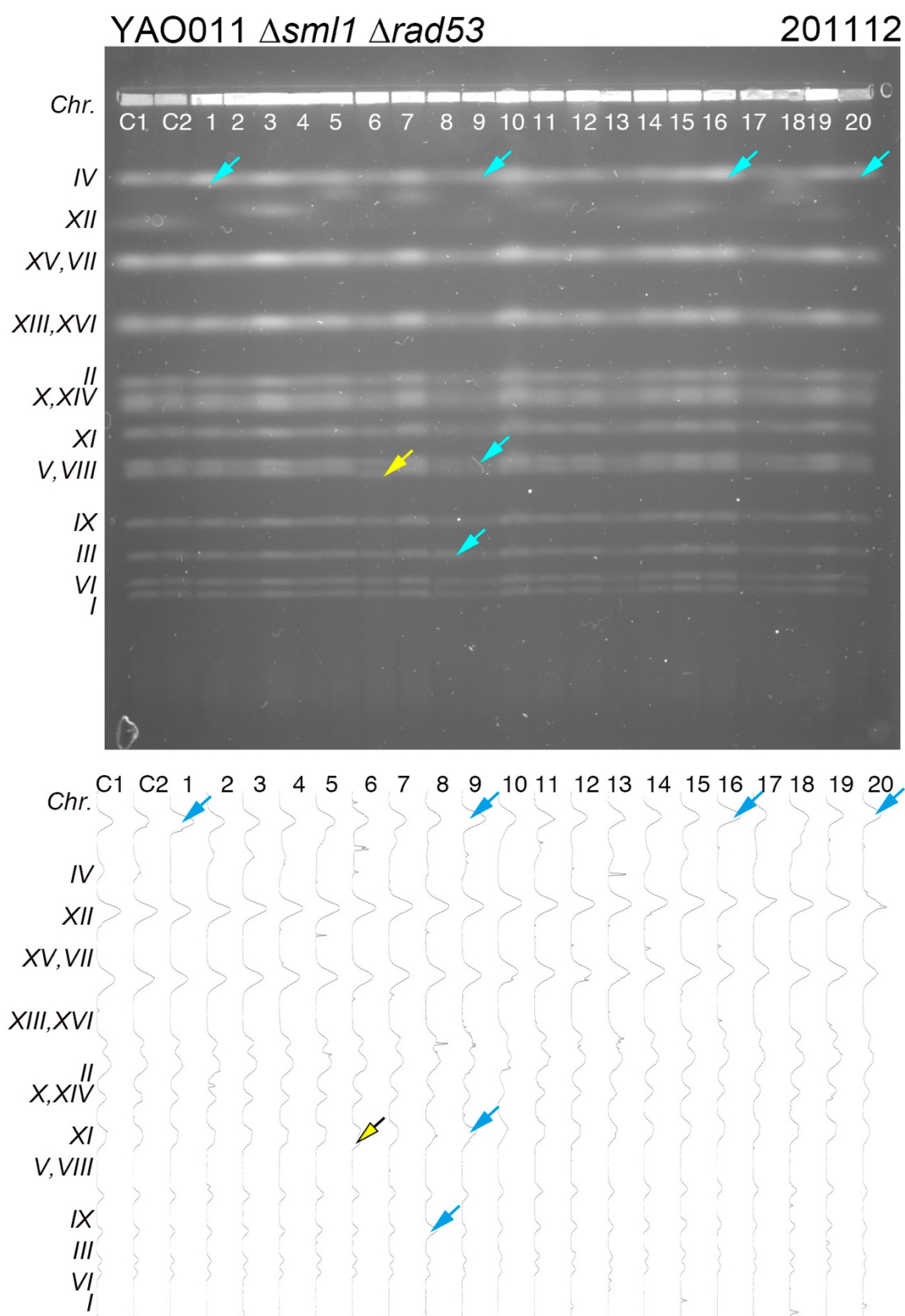


図 50. $\Delta sml1 \Delta rad53$ 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 3) .

図 46 と同じ実験から得た、別のサバイバークローンの解析結果。

(Control #1→YST563 (Wt), Control#2→YST2511 $\Delta sml1$ (Wt), lane #1- 8 → plate#3- 3h, #9-20 → plate#3 - 4h)

(191021 Synchronized growth, 201112 PFGE)

4-5. 染色体安定維持に関わる種々の因子はいずれも過剰複製後の細胞生存率維持に寄与しない

ここまでの結果から、DSB 修復経路や DNA ダメージチェックポイント経路が DNA 過剰複製誘導後の細胞において、その生存率に寄与できない事が分かった。そこで、染色体の安定維持に関わることが知られているその他の様々な因子まで範囲を広げて、解析を行うこととした。図 51 に示した多数の遺伝子の欠損株を作製し、過剰複製誘導条件下でこれらの生育を調べた顕著にコロニー形成が悪くなっていたものは、すでに述べた *Δrad52* 以外にはなかった。*Δarmi1*, *Δctf4*, *Δmre11* のように、過剰複製誘導条件下で、顕著にコロニー形成が悪くなっているように見えるものもあったが、これらは *Δrad53* のように過剰複製を誘導していない条件下でも生育が悪くなっていたことより、過剰複製誘導に依存して大きくコロニー形成能を落としているとは判断しなかった。

一方、マイルドではあるが過剰複製誘導に依存してコロニー形成能を落としているものはいくつか存在した。なかでも、ここでは *Δctf18*, *Δctf8*, *Δdcc1* に注目した (図 51)。これらは、PCNA やコヒーシンのローディングに働くことが知られている Ctf18-RFC 複合体のサブユニットであり、同一複合体に含まれるこれらの因子の欠損株が、いずれも同程度の生育低下を示したことから、これらの欠損株についても同調培養実験を行い、さらに詳しい解析を行った (図 52, 53)。それぞれ 3 つの独立したクローンを用いて解析を行ったが、Flow cytometer による DNA 含量の計測の結果 (図 52)、*Δctf8* の 1 つのクローン (#2) が複製誘導していない YPARaff から採取した細胞でも、G1 期よりも少ない DNA 含量を示す細胞が多くあり、他のクローン (#1, 3) とは違う計測結果であったため、このクローンより得たデータはその後の解析より除外した。

Δctf18, *Δctf8*, *Δdcc1* 株それぞれについて、上述の解析と同様に G1 期停止細胞での複製誘導を行い、生存率を調べたところ、いずれの欠損株も野生型株の生存率を下回ることはなく、野生型株よりも高い生存率を示した (図 53)。

この同調培養実験から得られた、*Δctf18*, *Δctf8*, *Δdcc1* 株のサバイバークローンの染色体構成についても解析を行った (図 54-61)。いずれの欠損株からも染色体異数性や GCR を示すクローンが多く出現した。しかし、これについても、*Δyku70* 同様に、DNA 過剰複製を誘導する前からその染色体構成が異常となっている細胞が生じていたと思われるケースが多くあった (図 54 & 62-Chr.13, 16, 図 57-Chr.3 など)。そのため、不安定化した染色体が複数のクローンで共通していた場合は、複製誘導前からの不安定性と判断した。

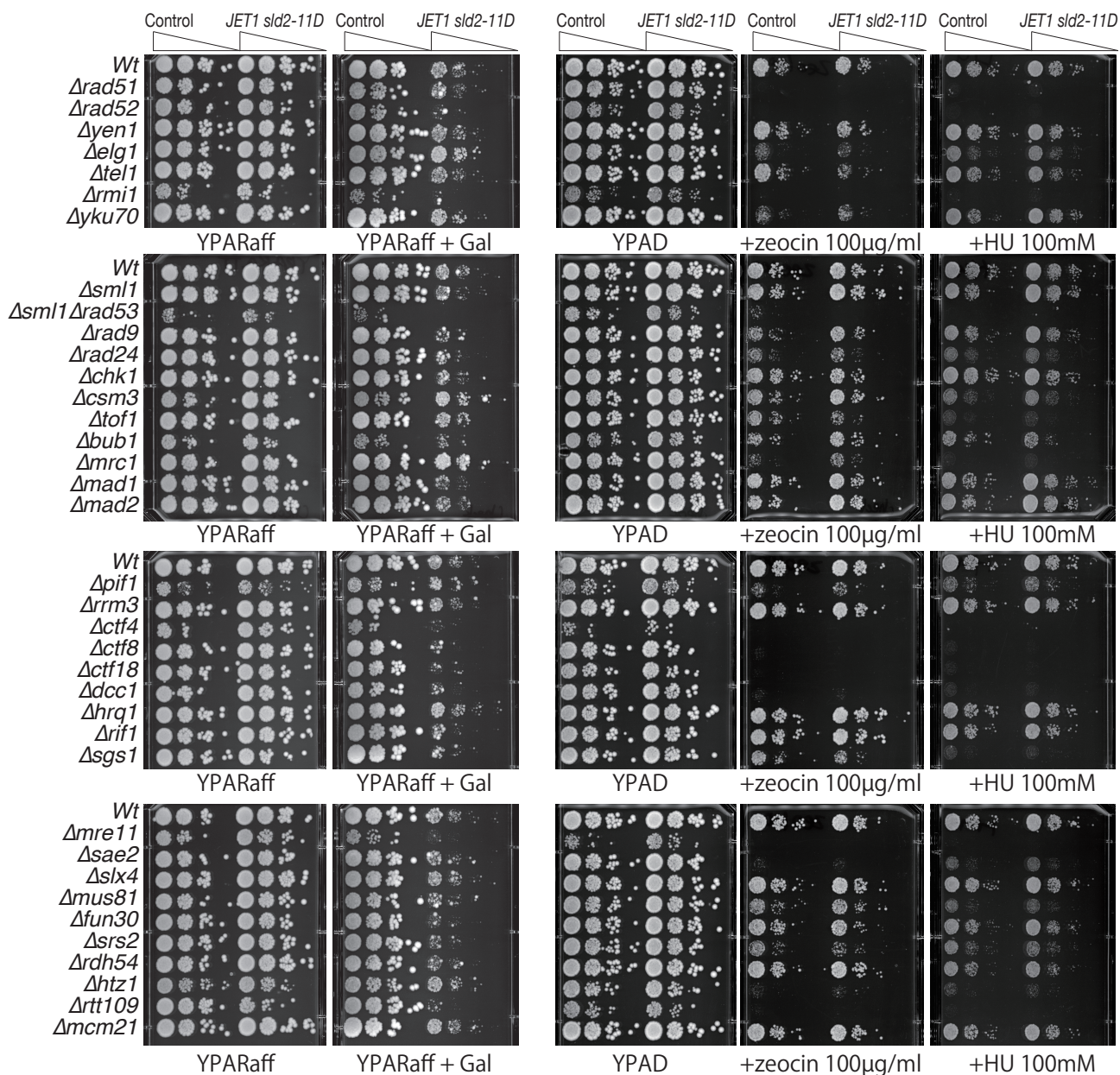


図 51.種々のゲノム安定維持に関わる因子を欠損させても過剰複製に大きく感受性を示すものはないが、Ctf18-RFC 複合体の欠損株の生育はやや悪くなった。

左に示した各遺伝子の欠損株について、終夜培養液から 10 倍希釈系列を作製し、各プレートへスポットし、30℃で 2 or 4 日間培養した。図 5, 43 と同様に、YST513 株と YST563 株をもとに作製した株である。YPAD プレートに zeocin を 100µg/mL あるいは Hydroxyurea (HU) を 100mM 添加した場合（右側 2 列のパネル）と、DNA 過剰複製を誘導した場合のコロニー形成能を示す（左から 2 番目のパネル）。

(YPAD, +zeocin, +HU : 200929 spot, 200930 photography, YPARaff, YPAGal : 201011 spot, 201015 photography)

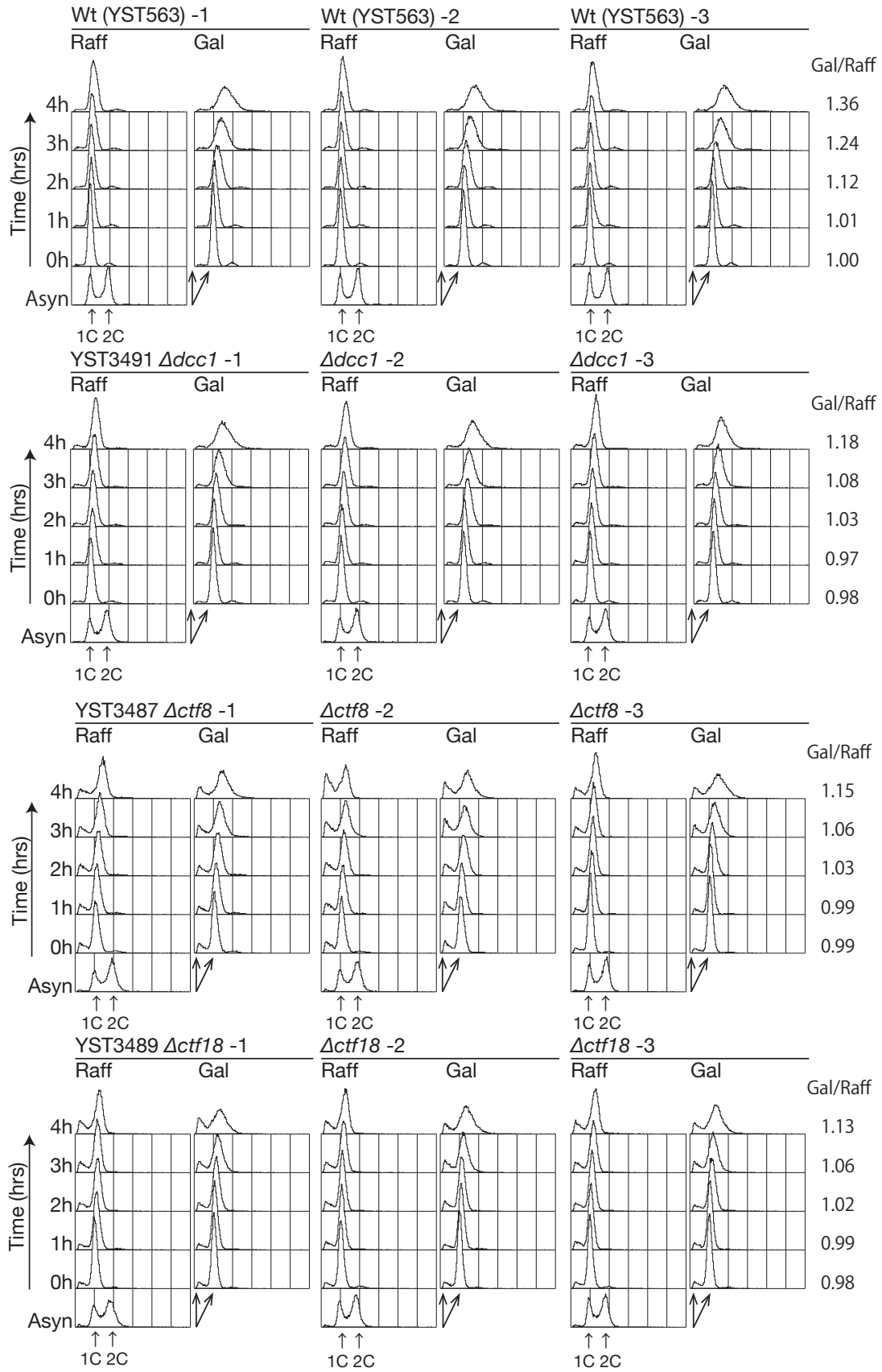


図 52. Ctf18-RFC の非必須各サブユニットを G1 期停止させ、複製誘導を行なった時の DNA 含量増加の様子。

図 6 と同様に実験を行い、算出した生存率。コントロール株と比較して、高い値の生存率を示した。

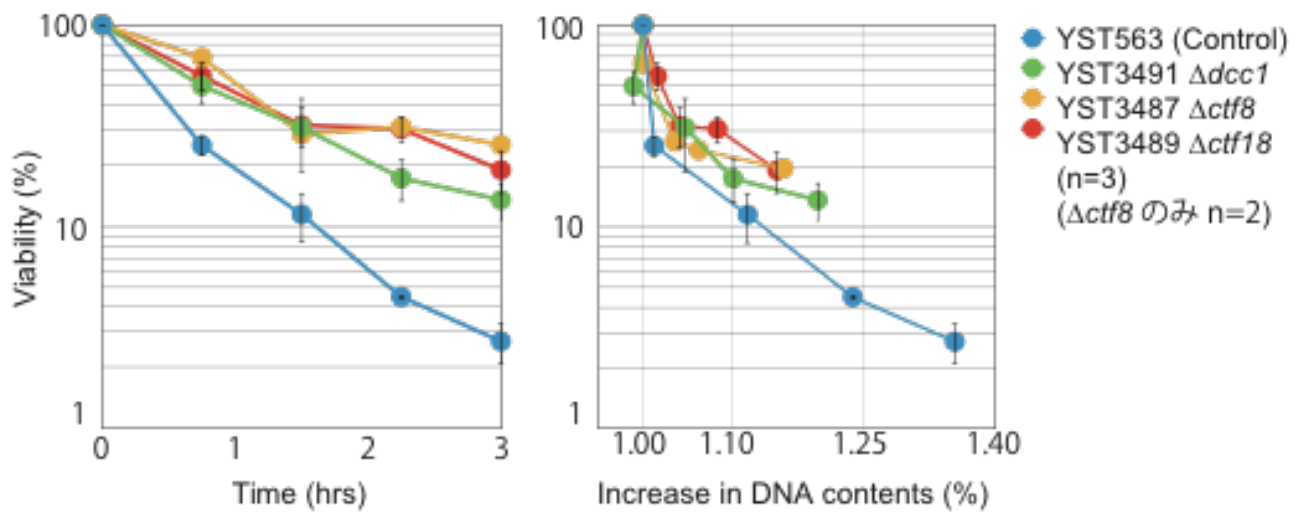


図 53. Ctf18-Ctf8-Dcc1 複合体各因子の欠損は過剰複製誘導後に野生型細胞よりも高い生存率を示す。図 7 同様に解析を行い、各株の生存率をグラフに示す。Error bar: SD.

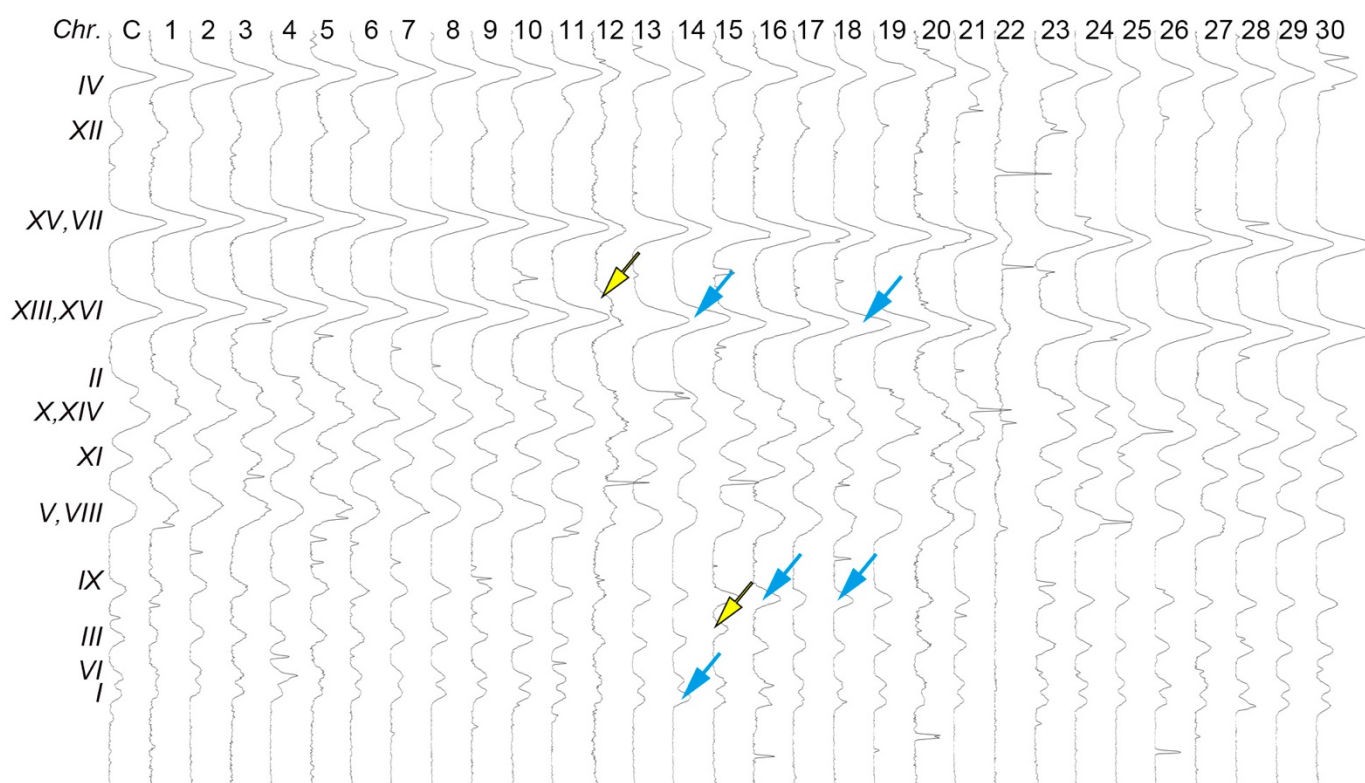
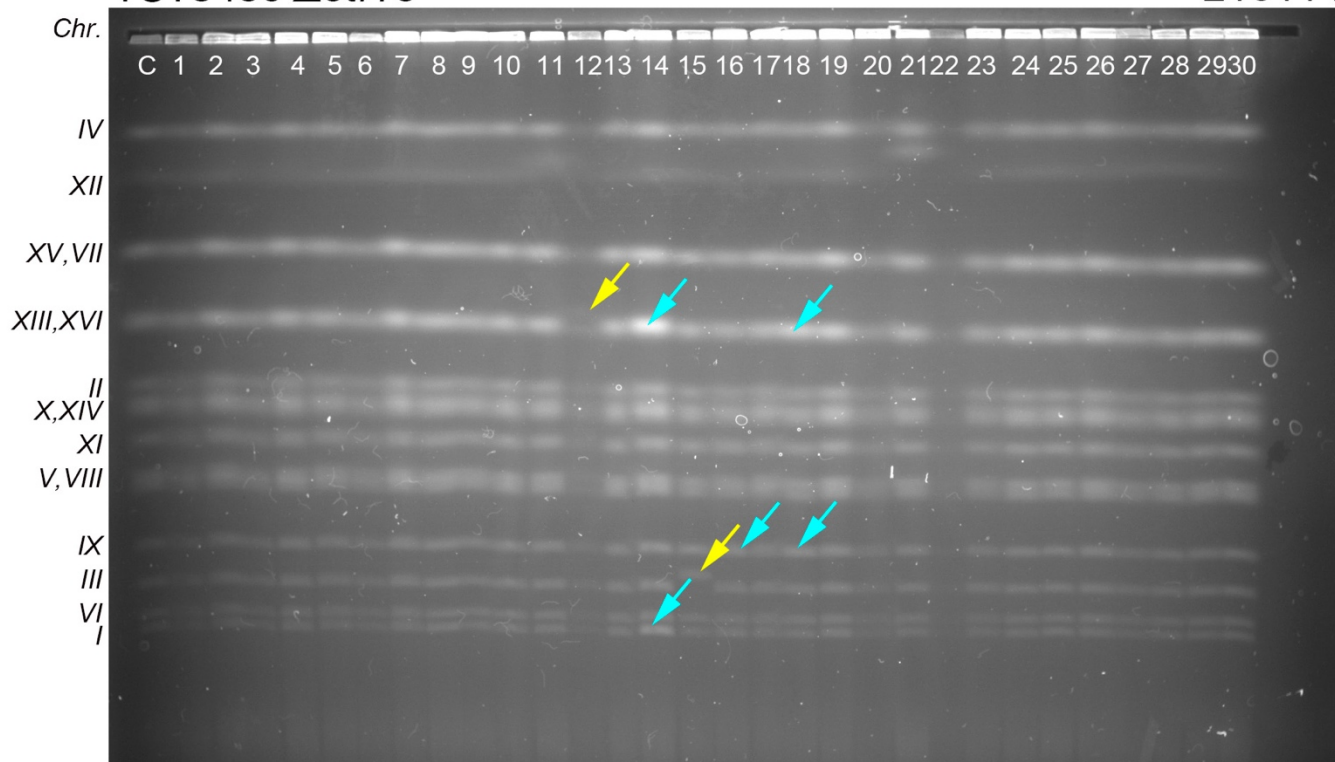


図 54. $\Delta ctf18$ 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 1) .

図 6 と同様に行った実験で、過剰複製誘導後 3 時間後にサンプリングしたものから得たサバイバークローンの染色体像 (3h : レーン 1-15、生存率は 30.6%, 4h : レーン 16-30、生存率は 19.1%)。

(Control → YST563 (Wt), lane #1- 15 → plate#1- 3h, #16-30 → plate#1 - 4h)

(191117 Synchronized growth, 210114 PFGE)

YST3489 Δ *ctf18*

210114

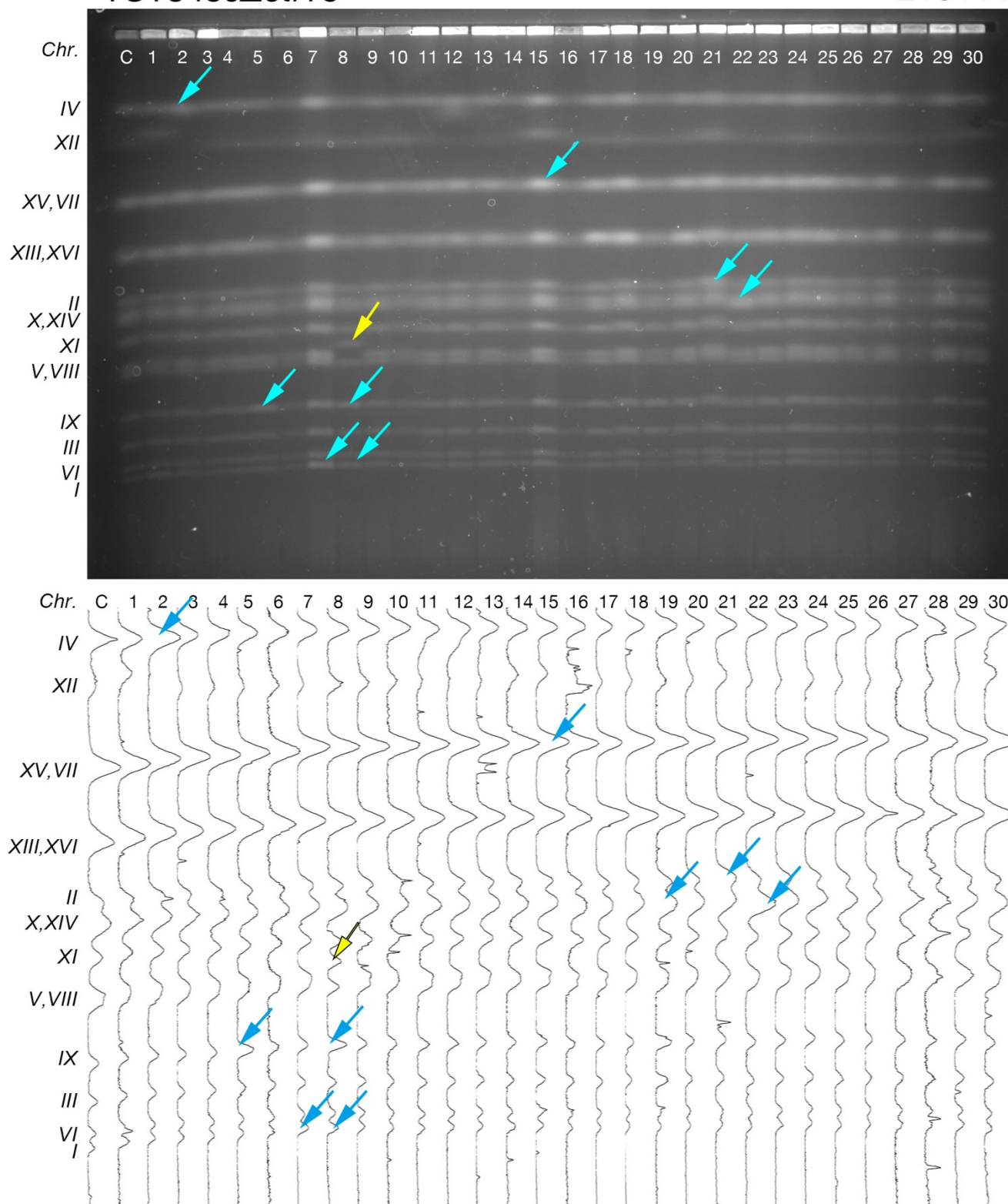


図 55. Δ *ctf18* 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 2) .

図 54 と同じ実験から得た、別のサバイバークローンの解析結果。

(Control→ YST563 (Wt), lane #1- 15 → plate#2- 3h, #16-30 → plate#2 - 4h)

(191117 Synchronized growth, 210114 PFGE)

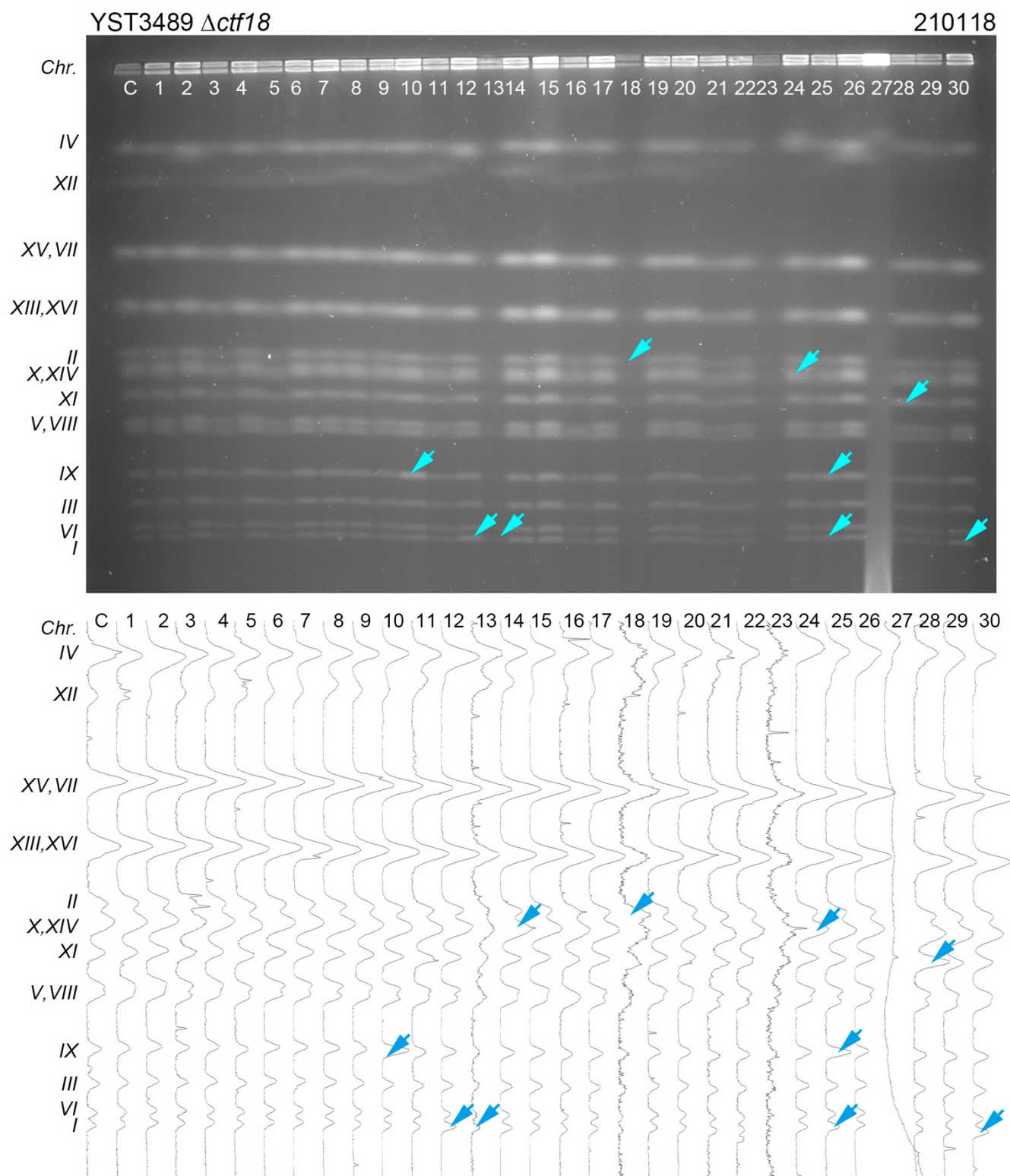


図 56. $\Delta ctf18$ 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 3) .

図 54 と同じ実験から得た、別のサバイバークローンの解析結果。

(Control→ YST563 (Wt), lane #1-15 → plate#3-3h, #16-30 → plate#3-4h)

(191117 Synchronized growth, 210118 PFGE)

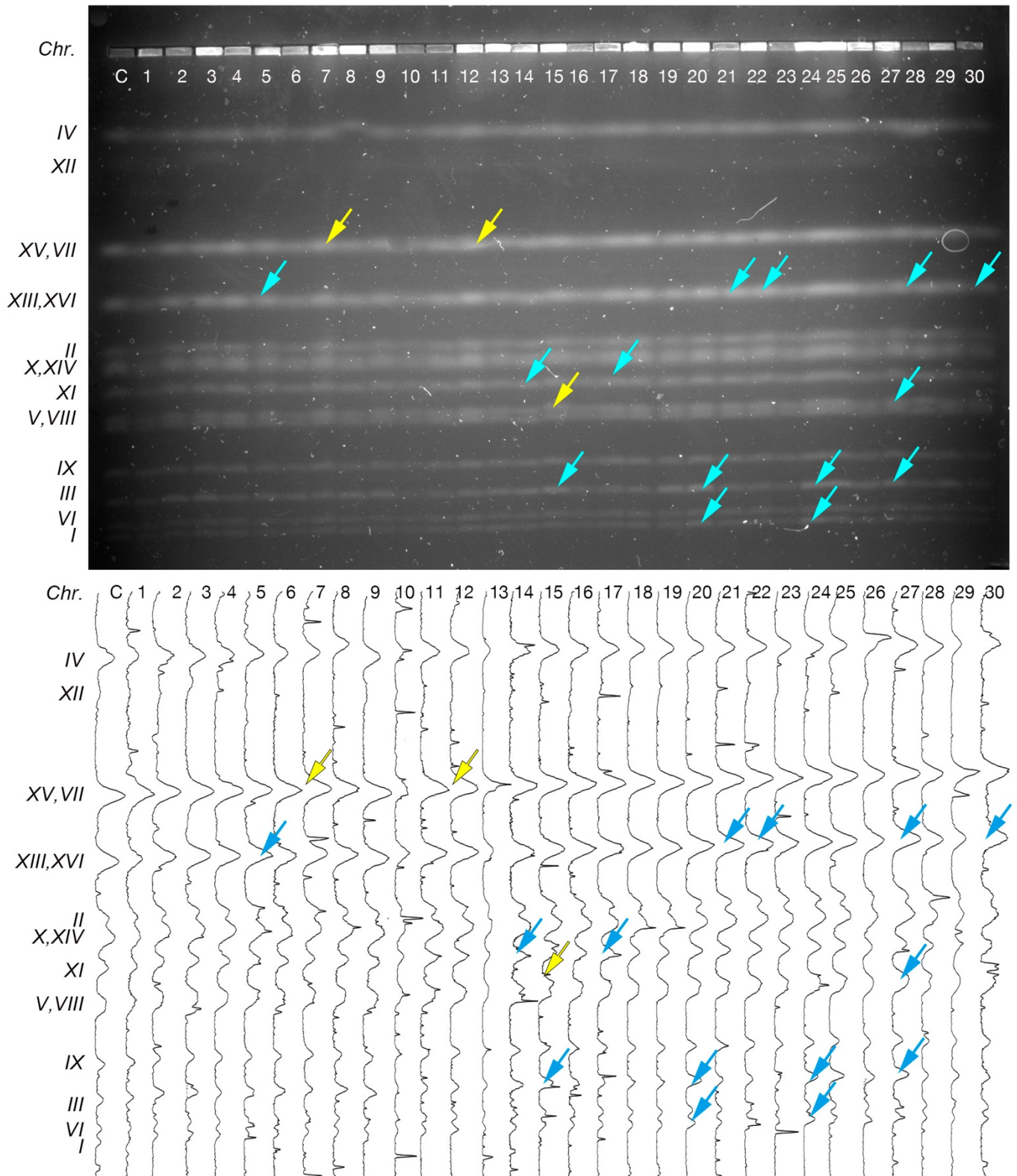


図 57. Δ *ctf8* 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 1) .

図 6 と同様に行った実験で、過剰複製誘導後 3 時間後にサンプリングしたものから得たサバイバークローンの染色体像 (3h : レーン 1-15、生存率は 24.0%, 4h : レーン 16-30、生存率は 19.5%) .

(Control \rightarrow YST563 (Wt), lane #1-15 \rightarrow plate#1-3h, #16-30 \rightarrow plate#1-4h)

(191117 Synchronized growth, 210105 PFGE)

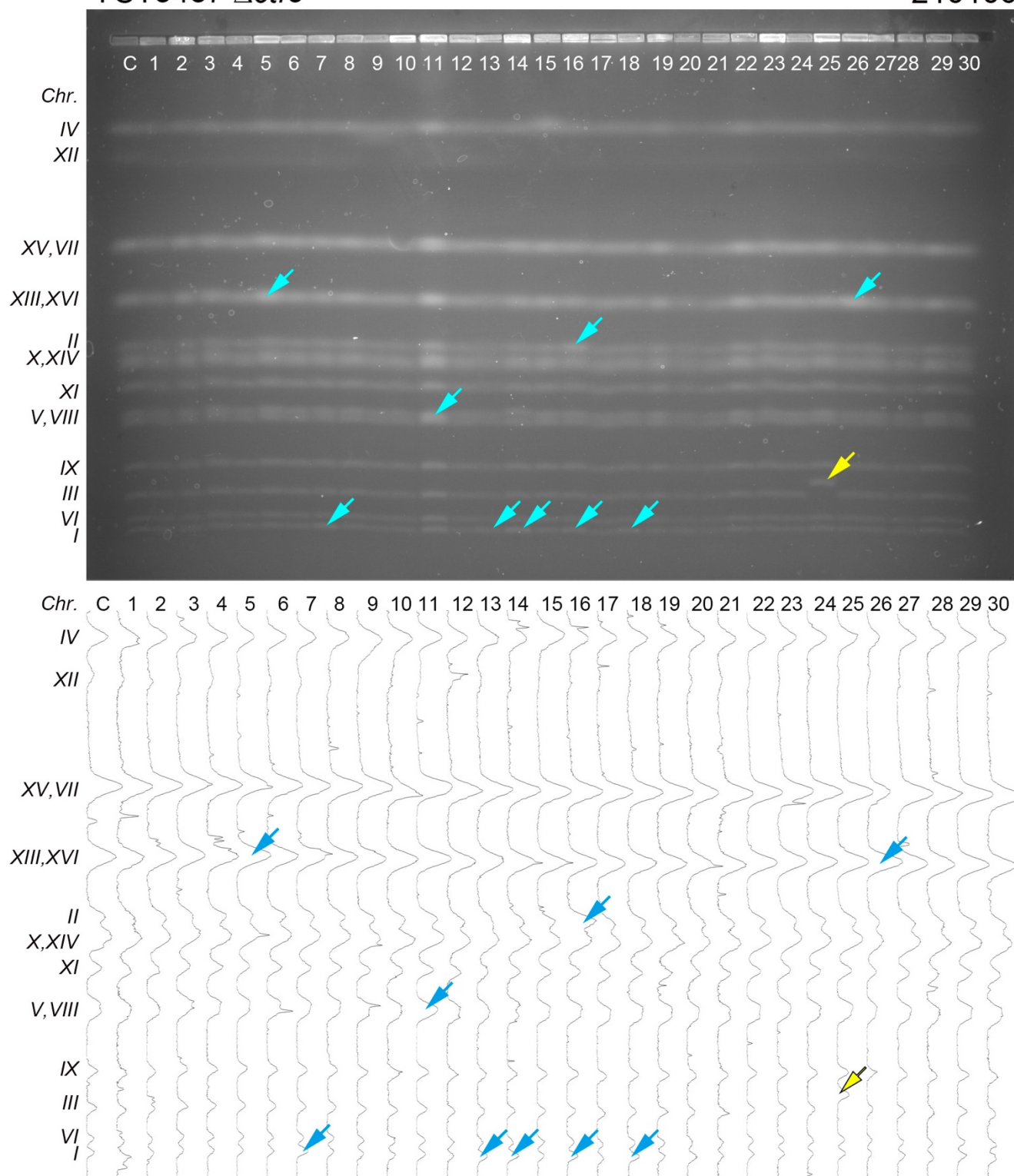


図 58. $\Delta ctf8$ 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 2) .

図 57 と同じ実験から得た、別のサバイバークローンの解析結果。

(Control → YST563 (Wt), lane #1-15 → plate#3-3h, #16-30 → plate#3-4h)
(191117 Synchronized growth, 210106 PFGE)

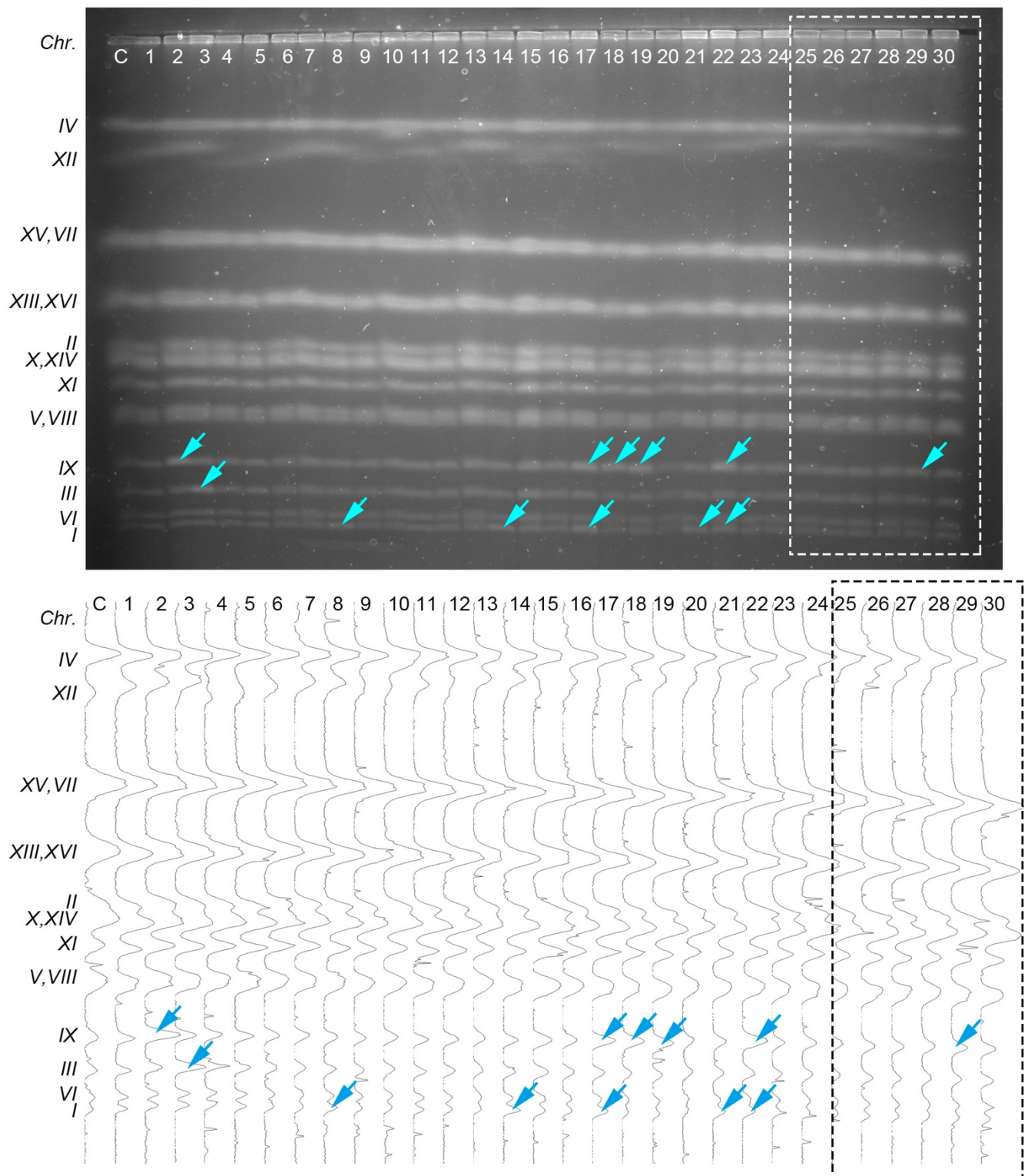


図 59. $\Delta ctf8$ 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 3) .

図 6 と同様に行った実験で、過剰複製誘導後 3 時間後にサンプリングしたものから得たサバイバークローンの染色体像 (3h: レーン 1-12、生存率は 11.6%, 4h: レーン 13-24、生存率は 9.9%) レーン 25-30 は過剰複製誘導していない方由来のもの (生存率: 158.6%)。

(Control → YST563 (Wt), lane #1-15 → plate#1-3h, #16-30 → plate#1-4h)

(191117 Synchronized growth, 210105 PFGE)

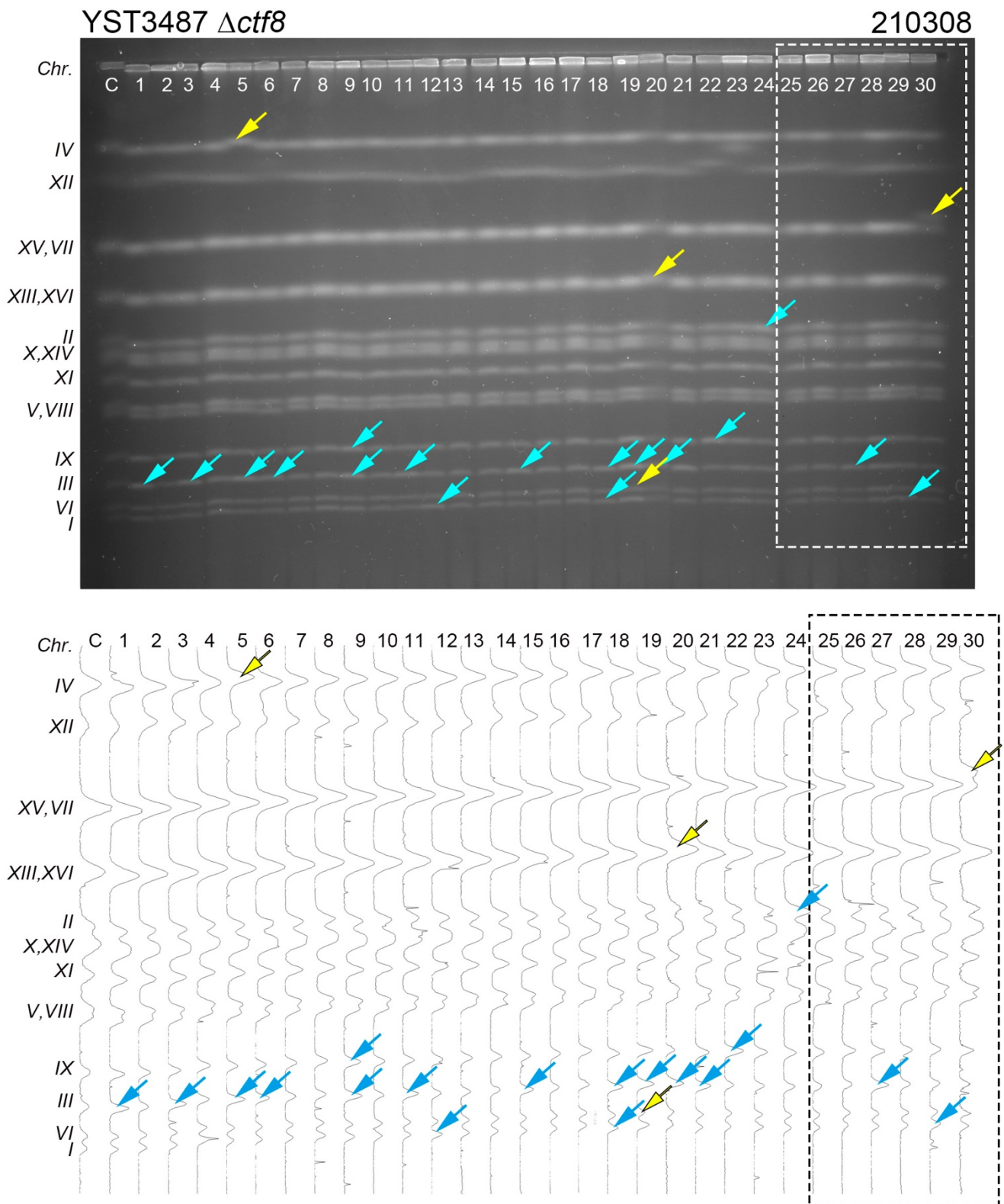


図 60. $\Delta ctf8$ 株由来のサバイバークローンの染色体構成（その 4）。

図 59 と同じ実験から得た、別のサバイバークローンの解析結果。

(Control → YST563 (Wt), lane #1-15 → plate#3-3h, #16-30 → plate#3-4h)

(191117 Synchronized growth, 210106 PFGE)

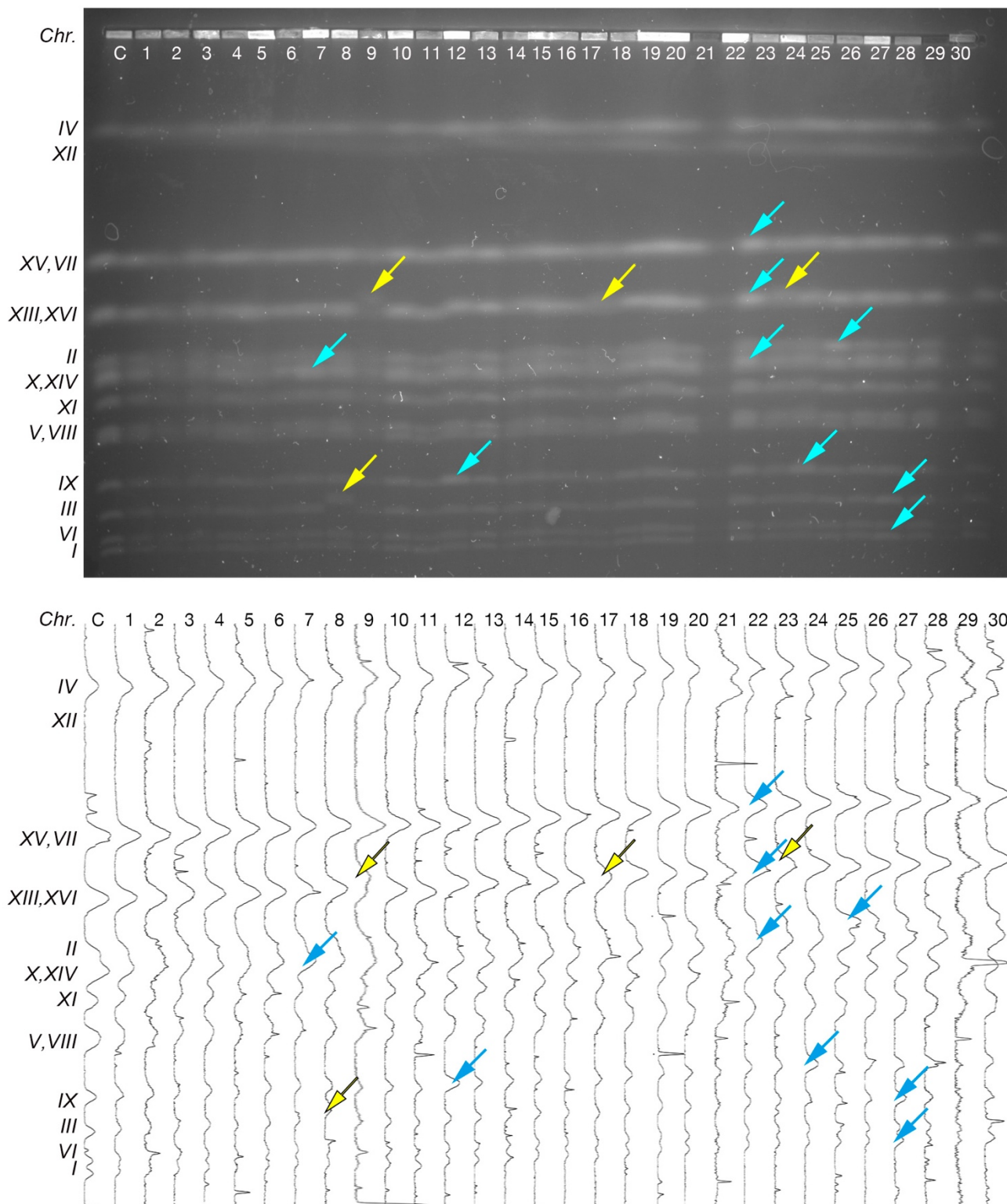


図 61. $\Delta dcc1$ 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 1) .

図 6 と同様に行った実験で、過剰複製誘導後 3, 4 時間後にサンプリングしたものから得たサバイバークローンの染色体像 (3h: レーン 1-15、生存率は 17.4%, 4h: レーン 16-30、生存率は 13.6%)。

(Control → YST563 (Wt), lane #1-15 → plate#1-3h, #16-30 → plate#1-4h)

(191116 Synchronized growth, 201223 PFGE)

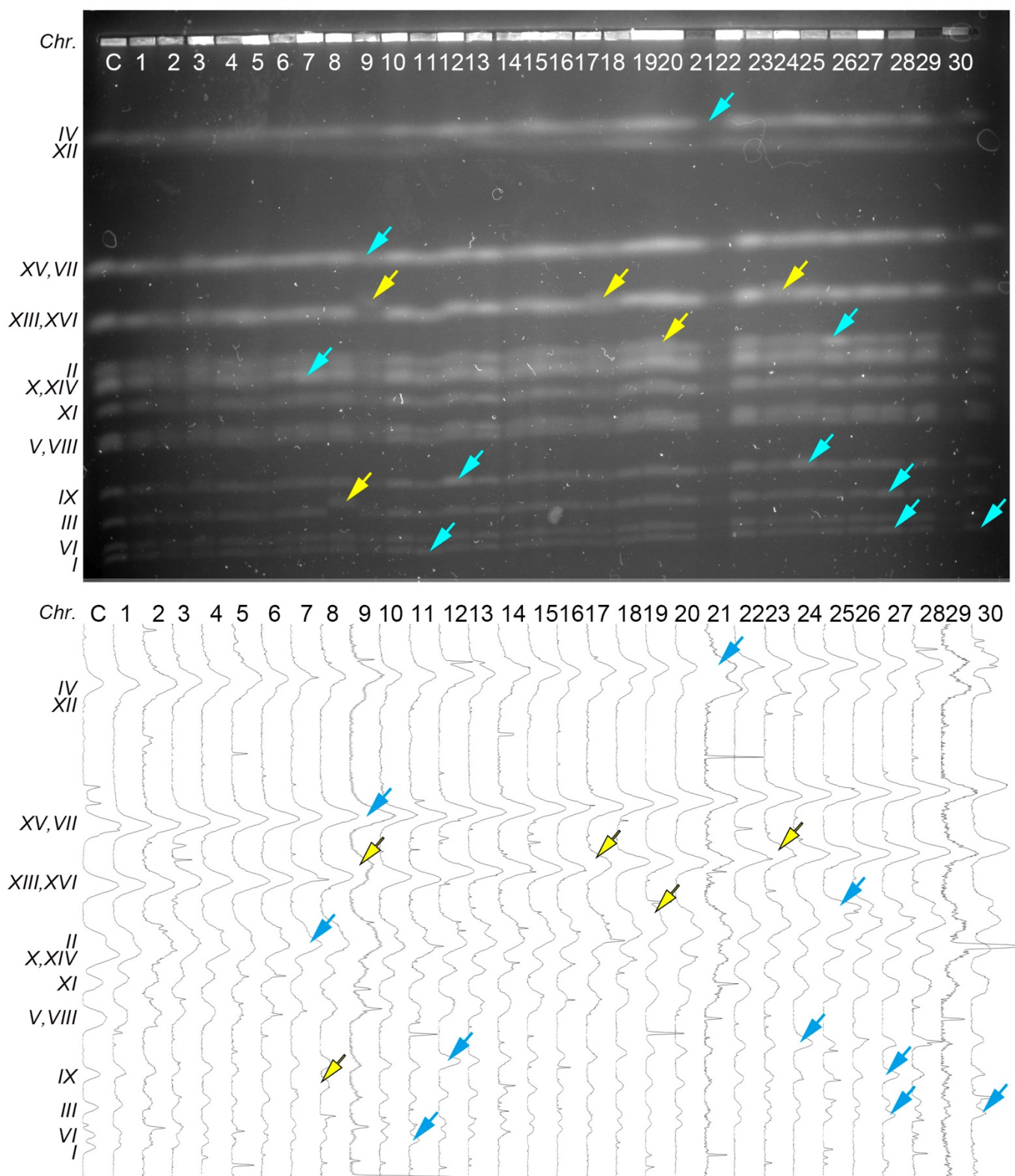


図 62. $\Delta dcc1$ 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 2) .

図 61 と同じ実験から得た、別のサバイバークローンの解析結果。

(Control → YST563 (Wt), lane #1- 15 → plate#2- 3h, #16-30 → plate#2 - 4h)

(191116 Synchronized growth, 201224 PFGE)

YST3491 $\Delta dcc1$

201229

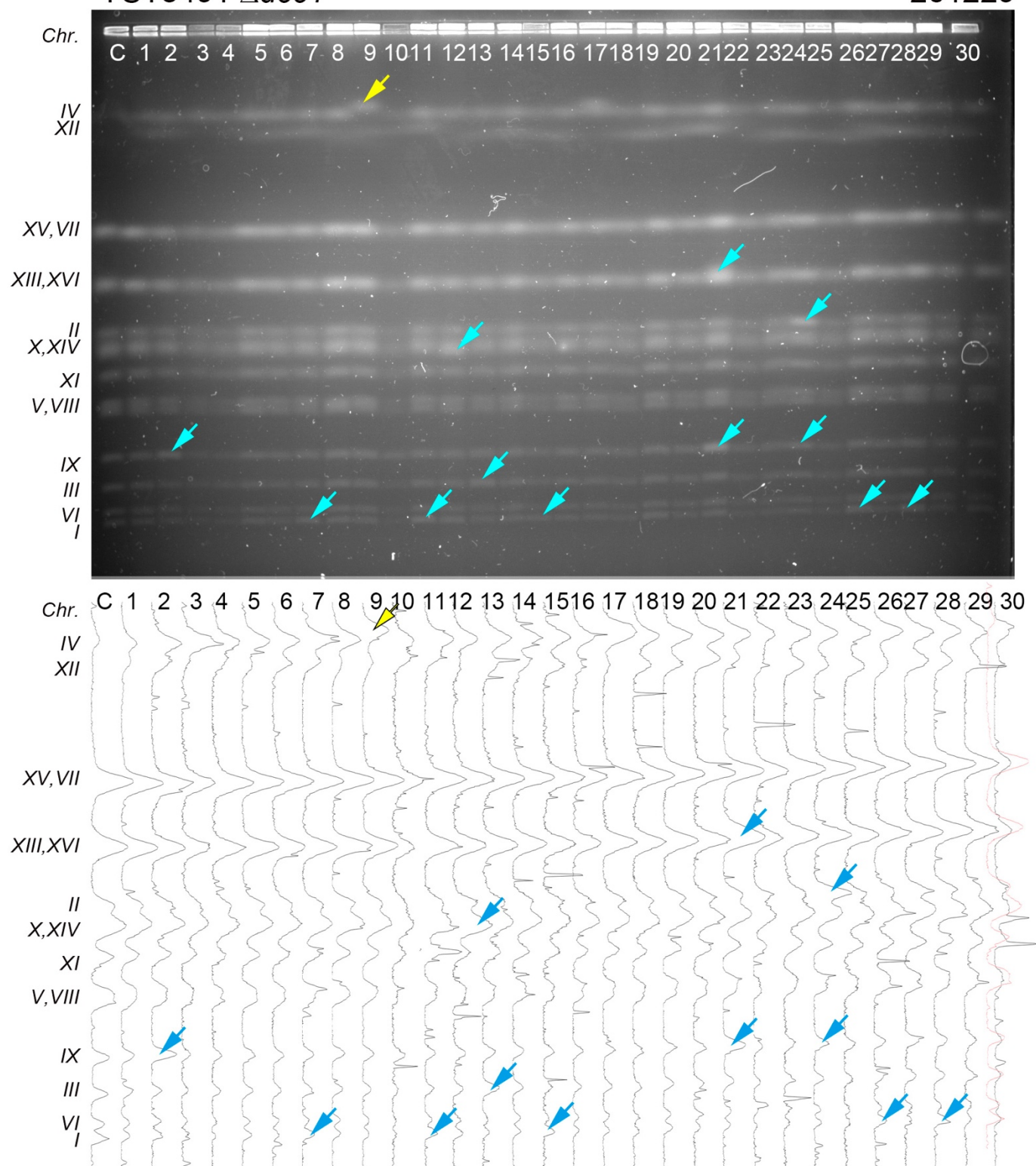


図 63. $\Delta ctf18$ 株由来のサバイバークローンの染色体構成 (その 3) .

図 61 と同じ実験から得た、別のサバイバークローンの解析結果。

(Control → YST563 (Wt), lane #1- 15 → plate#3- 3h, #16-30 → plate#3 - 4h)

(191116 Synchronized growth, 201229 PFGE)

5. 考察

5-1. 過剰複製を誘導した細胞において、DSB 修復経路は生存率維持に寄与できない

薬剤によるダメージ、すなわち複製フォークの停止 (HU) 及び DSB (zeocin) がおきた際に、今回の解析で用いた種々の DSB 修復経路関連因子の欠損株 ($\Delta rad51$ 、 $\Delta rad52$ 、 $\Delta yku70$) は、生存率の顕著な低下を引き起こした (図 5a)。この実験では、細胞培養液を 10 倍希釈系列として薄めたものを用いているため、各スポット位置で最終的に出現したコロニー数から大まかな生存率の低下率を算出できる。これに対し、過剰複製を誘導した YPAGal プレート上では、野生型株とこれらの欠損株を比較した際に、コロニー形成能の低下、すなわち生存率の低下、に薬剤を用いた時ほどの差は見られなかった (図 5b)。

過剰複製の誘導は S 期以降にチェックポイントキナーゼ Rad53 のリン酸化や、チェックポイントクランプ Ddc1 (Ddc1-GFP) のダメージ部位への集積による輝点形成につながることを示されている (Tanaka and Araki, 2011) ほか、DSB 修復経路で機能する Rad51、Rad52、Yku70 欠損細胞でも過剰複製誘導後に Ddc1-GFP の輝点形成が見られた (図 x)。したがって、DSB が生成している環境下において、これらの因子の欠損が薬剤処理時の様に大幅な生存率低下を示さないことは、大きな驚きである。(4-1 項)。

また、同調培養実験による詳しい解析では、株において、DNA 過剰複製を誘導すると野生型株よりも高い生存率を示した (図 7, 37b)。この結果は、過剰複製が起きた細胞においては、DSB が生るにも関わらず、DSB 修復経路が生存率維持に寄与しないばかりか、むしろ逆効果になる、すなわち、DSB 修復を行わない方がいいということを示唆する。このことはこれまでに理解してきた DSB 修復経路の役割とは反対の概念であるが、過剰複製により染色体全域にわたる異常な構造が多数形成されていると考えれば、下手に手を出してさらに染色体 DNA をこんがらからせない方が、結果は良いのかもしれない。

生存率には寄与できないものの、 $\Delta rad51$ 、 $\Delta rad52$ 、 $\Delta yku70$ 株のサバイバーの染色体構成を見てみると、 $\Delta rad51$ 、 $\Delta rad52$ では GCR の発生頻度が低下したのに対し (図 8-36)、 $\Delta yku70$ 株では十分な結論を出せるレベルではないが、その逆の傾向が見られた (図 38-43)。出芽酵母ゲノム中には、多くの Ty1 トランスポゾン、さらにもっと多数の Ty1 の LTR が散在するほか、サブテロメアリピートである X, Y が複数の染色体末端に存在することも知られている。異なる染色体部位や染色体間のこれら相同配列を用いた組換えが GCR に繋がることは容易に予想される。 $\Delta rad51$ と $\Delta rad52$ という HR 欠損株での GCR タイプの染色体の出現頻度低下はこの様な理由によるのかもしれない。

$\Delta yku70$ 株のサバイバークローンで見られた GCR の発生頻度が高い傾向は HR 欠損とは逆の傾向であり、これはそれぞれの修復様式の違いに起因するものであると考えられる。出芽酵母では、特に S 期以降は、DSB 修復系として NHEJ はほとんど働いていないと考えられている。しかし、仮にこの様な傾向が正しいとすると、NHEJ の有無が少なからず影

響している、例えば、NHEJ 経路が無くなることで、HR が亢進するなどの影響があるのかもしれない。Yku70 欠損株においては、過剰複製を誘導する前から染色体が不安定化していると思われるような事例が数多くあった。Yku70 は NHEJ に加えてテロメアの局在や安定維持に関わるタンパク質であり、テロメアの不安定性は DSB として認識され、DNA ダメージチェックポイントを惹起する。実際、 $\Delta yku70$ 株は生育が悪く、G2 期細胞の比率が非常に高い（図 37a、A-synchro の DNA 含量）。DNA ダメージチェックポイントの活性化は Rad53 のリン酸化を引き起こすため、この点は容易に検証できるが、それが高頻度な染色体不安定化細胞の出現に繋がるのかどうかは簡単には判断できない。また、テロメア不安定化は Breakage-Fusion-Bridge (BFB) cycle (McClintock, 1941) を引き起こし、不安定化した染色体が出現すると考えられている。しかし、この BFB サイクルにおいては、NHEJ が必要であると考えられるため、 $\Delta yku70$ 株では起こりにくいと考えられる。いずれにせよ、 $\Delta yku70$ 株の表現型の理解には、さらなる解析が必要であろう。

5-2. 少量の DNA 過剰複製誘導時には、DSB 修復経路が正しく働いている傾向がある

$\Delta rad51$, $\Delta rad52$ の過剰複製後の生存率は野生型株よりも高かった。しかし、過剰複製量あたりの生存率のグラフ（図 7 右）の傾きからみると、DNA 過剰複製誘導直後では、野生型株の生存率を下回っている可能性がある。このことから、DNA 過剰複製誘導がわずかな時点では、HR 経路が細胞生存率に寄与している可能性がある。同調培養実験で、Galactose 濃度を 2% 未満に下げる、あるいは DNA 過剰複製誘導直後のサンプリング時間を最初の 1 時間または 2 時間まで 15 分毎あるいは 30 分毎にする（現時点では 1 時間毎）など、条件を変えてさらに詳しい解析をすれば、この点を明らかにできるのではないかと考えている。

5-3. プレート上と同調培養実験で、生存率（生育）がやや異なることがある

本研究で作製した各欠損株のスポットアッセイで、過剰複製誘導時に、野生型株と比較して生育が良くなるものはなく、ほとんどのものが、ほぼ同程度の生育を示し、いくつかは悪化した（ $\Delta rad52$, $\Delta sml1 \Delta rad53$ 株など）（図 5, 44, 51）。しかし、同調培養実験での解析では、野生型株の生存率を下回るものはなく（図 7, 37, 45, 53）。プレート上での生育と同調培養実験との生存率が異なる結果を示す例がいくつかあった。

ふたつの実験で得られた結果の相違について、いくつか理由が挙げられる。前提としてそれぞれの実験系で条件が違う点がある。まず、プレートでは α ファクターによる G1 期停止を誘導せず、常に Galactose 存在下で培養している。一方で、同調培養実験では、 α ファクターによる G1 期停止を誘導し、複製が確実に起きる様にしている。通常の細胞周

期の G1 期はそこまで長くはない。つまり、プレート上では G1 期複製誘導の効率が悪く、DNA 過剰複製の程度がかなりマイルドな状態にある可能性がある。したがって、プレート上での表現型は、同調培養実験におけるマイルドな過剰複製誘導時のものを示している可能性がある。

しかし、実際のところ、プレート上で複製誘導がどの程度できているかを定量化することは難しく、正確なレベルはわかっていない。そのため、上とは逆に、プレート上での過剰複製誘導率が同調培養実験での誘導率をはるかに上回って、同調培養実験では追跡できないまでの生存率を示しているという可能性も考えられる。この場合は、過剰複製誘導直後に DSB 修復能が低下し、同調培養実験のように生存率の低下につながる。しかし、同調培養でモニターしうるさらに先まで過剰複製が誘導されるとダメージの蓄積が過剰になる。その結果、最終的に DSB 修復経路がない欠損株よりも機能しているコントロール株の方が高い生存率を示し、その表現型をプレー上で示しているという可能性が考えられる。

どちらの可能性が正しいかは、現時点では分からないが、今後、各実験の条件で Galactose の濃度を 2% 未満にする、あるいは、同調培養実験でサンプリングのスパンを最初だけ細かく 15 分、30 分毎にする、または、さらに長い時間サンプリングをするなどして、表現型の相違について詳細に解析する予定である。

5-4. 今回調べた DNA 安定維持に関わる因子の中には過剰複製後の細胞生存率維持に関わるものはなかった

DNA ダメージチェックポイント制御で中心的な役割を持つ Rad53 を欠損した株：*Δsm11Δrad53* 株について、この株は生育が遅く、他の欠損株よりも生育が悪い。スポットアッセイの結果で (図 44)、YPAGal プレート上で DNA 過剰複製を誘導した場合、コントロール (*Δsm11*) 株と比較して *Δsm11Δrad53* 株は、薬剤を添加した時ほどの差ではなかったが、コロニー形成能がかなり低下した。しかし、同調培養実験による詳細な解析では、コントロール株と *Δsm11Δrad53* 株の生存率がほとんど同じ値を示した (図 45b)。この株ではチェックポイント制御が正しく機能していないので、DSB を認識しても細胞周期が停止せず、DSB 修復をする間も無く次の段階に進んでしまうため、この株では DSB 発生時でも HR や NHEJ が働きづらい状況にあると考えられる。そのため、この株の生存率がコントロール株と同様の値を示したことは、DSB 修復経路が過剰複製後の細胞生存率に寄与しない裏付けになると言える。

また、その他の DNA 安定維持に関わる他の因子でもスポットアッセイによる解析をした。しかし、過剰複製を誘導した YPAGal プレートで、コントロールより高い生育を示したものはなかった (図 51)。しかし、比較的生育が悪くなったものとして、Ctf18-RFC 複合体のサブユニットである Ctf18, Ctf8, Dcc1 の欠損株があった。これらについて、同調

培養による解析をすると、いずれもコントロール株より高い生存率を示した（図 53）。これらの欠損株ではコヒーシンの装着が低下する。そのため、DSB 発生時に、HR が備わっていても相同配列探索の効率が悪く、HR 機能低下に繋がると考えられる。DSB 修復経路欠損株で過剰複製を誘導した細胞において、HR は細胞にとってむしろネガティブに働いている傾向があったことを考えると、これらの欠損が、HR の機能低下に繋がり、最終的には過剰複製時に、細胞の生存率の低下を緩やかにしたと考えられる。

本研究では、過剰複製をする細胞において、生存率維持に影響を与えるものは見つからなかった。しかし、異数性による増殖不全を示す細胞で脱ユビキチン化酵素である Ubp6 をコードする遺伝子の機能低下変異は、細胞内タンパク質組成の変化を抑制することで、増殖能を改善することがわかっている (Torres et al., 2010)。本研究ではまだ試みていないが、過剰複製をする株で、この Ubp6 を欠損する株（または変異株）を作製し、解析を試みれば、なにか新しい知見が得られるかもしれない。既知の DSB 修復経路では過剰複製後の細胞において生存率維持に寄与できないが、過剰複製後の細胞をレスキューするような未知の修復経路が存在するかもしれない。今後はそれについての解析も必要である。

今回の研究で得られた結果は、G1 期での時期尚早な複製開始の結果引き起こされる過剰複製がひとたび起きてしまうと、その遺伝毒性に対し細胞は、対応するすべを持たないことを示唆する。すなわち、このことは逆説的に「一回の細胞周期に一度だけの DNA 複製」という制御の重要性を示すものと考えている。また、この際、HR が、本来とは逆に細胞にマイナスな影響を与えるという結果は、多細胞生物においては、アポトーシスのような、もはや回復し得ない細胞を淘汰し、細胞がん化のリスクを軽減するための経路として働きうる可能性を示唆しているのかもしれない。

謝辞

本研究を行うにあたり、研究の指針や結果の解釈、実験方法についての助言等、あらゆる角度からご指導いただいた田中誠司教授に深く御礼申し上げます。また、小川志保助教には研究を進めていく上で蛍光観察の実験などに協力していただき、様々な助言を賜りました。ありがとうございました。

本研究の研究活動・論文作成にあたり、研究室の皆様のおかげで貴重な時間を過ごせました。心より感謝いたします。

引用文献

- Bell, S.P., and Labib, K. (2016). Chromosome Duplication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *203*, 1027-1067.
- Davidson, I.F., Li, A., and Blow, J.J. (2006). Deregulated replication licensing causes DNA fragmentation consistent with head-to-tail fork collision. *Mol Cell* *24*, 433-443.
- Hills, S.A., and Diffley, J.F. (2014). DNA replication and oncogene-induced replicative stress. *Curr Biol* *24*, R435-444.
- Macheret, M., and Halazonetis, T.D. (2015). DNA replication stress as a hallmark of cancer. *Annu Rev Pathol* *10*, 425-448.
- McClintock, B. (1941). The Stability of Broken Ends of Chromosomes in *Zea Mays*. *Genetics* *26*, 234-282.
- Mimura, S., Seki, T., Tanaka, S., and Diffley, J.F. (2004). Phosphorylation-dependent binding of mitotic cyclins to Cdc6 contributes to DNA replication control. *Nature* *431*, 1118-1123.
- Nguyen, V.Q., Co, C., and Li, J.J. (2001). Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms. *Nature* *411*, 1068-1073.
- Tanaka, S., and Araki, H. (2011). Multiple regulatory mechanisms to inhibit untimely initiation of DNA replication are important for stable genome maintenance. *PLoS genetics* *7*, e1002136.
- Tanaka, S., and Araki, H. (2013). Helicase activation and establishment of replication forks at chromosomal origins of replication. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* *5*, a010371.
- Tanaka, S., Umemori, T., Hirai, K., Muramatsu, S., Kamimura, Y., and Araki, H. (2007). CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature* *445*, 328-332.
- Torres, E.M., Dephoure, N., Panneerselvam, A., Tucker, C.M., Whittaker, C.A., Gygi, S.P., Dunham, M.J., and Amon, A. (2010). Identification of aneuploidy-tolerating mutations. *Cell* *143*, 71-83.
- Zhao, X., Muller, E.G., and Rothstein, R. (1998). A suppressor of two essential checkpoint genes identifies a novel protein that negatively affects dNTP pools. *Mol Cell* *2*, 329-340.