
7. 放射線感受性遺伝子

森 明 充 興

DNA Repair Genes

Mitsuoki Morimyo

Division of Genetics, National Institute of Radiological Sciences

9-1, Anagawa-4-chome, Inage-ku, Chiba 263, Japan

Abstract

Fission yeast *S. pombe* is assumed to be a good model for cloning of human DNA repair genes, because human gene is normally expressed in *S. pombe* and has a very similar protein sequence to yeast protein. We have tried to elucidate the DNA repair mechanisms of *S. pombe* as a model system for those of mammals.

To elucidate the DNA repair mechanisms of *S. pombe*, more than 50 radiation-sensitive mutants of *S. pombe* were isolated and classified into three epistatic DNA repair groups; excision repair, post-replication repair and recombination repair. Based on the epistatic grouping, a model for the DNA repair pathways of *S. pombe* was presented. Among radiation-sensitive mutants, a new mutant M12, which could complement with all the existing *rad* mutants, was found. We cloned the relevant gene *radM12* and mapped it on *NotI* D fragment of chromosome I. The DNA sequences of genomic DNA and cDNA were determined and revealed the physical organization of *radM12* gene. It had 6 exons and encoded a new ubiquitin-conjugating enzyme E2, which had about 40 % homologies with all the known UBC proteins. Without radiation, the M12 mutant exhibited a temperature-sensitive growth and was impaired in a G2-M stage of the cell cycle, suggesting the involvement of *radM12* gene in a process of G2 checkpoint repair.

Another approach to get repair genes is to search them among a catalog of whole cDNAs of *S. pombe*. To know the number and the function of house-keeping-genes of eukaryotic cells,

we have been making a catalog of *S. pombe* cDNAs. The cDNA library containing more than 10,000 clones was prepared by cloning cDNAs made from polyA⁺ mRNA into M13 sequencing vector. We have analyzed more than 5,000 clones and classified them into groups by comparing their DNA and protein sequences with those registered in a private and public Databases. These results indicated that we got 1,000 unique clones and that 1/3 of them had DNA sequences similar to those of other species and the rest 2/3 were new clones. Among them, 13 DNA repair genes, 7 new and 6 known, were found and analyses of their DNA structure and function are now in progress.

はじめに

放射線の生物影響やリスクを調べる時、放射線の線量-効果関係だけからではヒトへの放射線のリスク評価には限界がある。このため、放射線感受性遺伝子の役割を調べることでメカニズム面からの解明を進める研究が進められ、DNA修復機構の解明は放射線生物学の中心的研究課題となっている。紫外線によるDNA障害の修復機構、特に除去修復機構は、原核生物では分子レベルでのメカニズム解明が進められるまでに進んできた。しかし、より複雑な真核生物のメカニズム解明は現在激しい競争の最中であり、関連する遺伝子のクローニングや分子レベルでの機構解明が進められている。さらに、突然変異を誘発する Error-prone 修復や電離放射線によるDNA障害の修復に必須の組み換え修復に関する遺伝子のクローニングとその修復機構の解明が争われている。

我々は、真核生物のモデルとして最も単純な真核生物である分裂酵母を用いた系で、これら遺伝子のクローニングをめざした研究を進めてきた。分裂酵母 (*S. pombe*) は、1) 最も単純な真核生物であり、2) 出芽酵母では全遺伝子の約2%しかイントロを持たないのに比べ、分裂酵母では遺伝子の多くがイントロンを含み、真核生物のモデルとしてより適切なことや、3) ヒト遺伝子が正しく読まれて分裂酵母内で発現すること、4) ヨーロッパを中心に進められている出芽酵母ゲノム解析で得られた遺伝子の結果と我々の分裂酵母で得られる遺伝子の結果から、その遺伝子の保存部分や機能部位を推定できるため、対応するヒト遺伝子クローニングが可能になるなどそのメリットは大きいと考えている。真核生物のモデルとして酵母が適していることは古くから指摘されてきた。実際、細胞分裂に関する分裂酵母の突然変異株にヒト遺伝子を導入してその変異を相補するヒト遺伝子が P. Nurse 達によりクローニングされてきたことは、その指摘が正しかったことを裏付けている¹⁾。また、最近では、組換え修復に関与する RAD51 遺伝子を出芽酵母および分裂酵母から分離し、それら遺伝子の保存部分のアミノ酸配列から対応するヒト遺伝子のDNA塩基配列を予想して対応する遺伝子をクローニングする事に成功している^{2,3)}。分裂酵母を真核生物のモデルとして据えながら進めてきた2つのDNA修復関連遺伝子単離の仕事を紹介する。

[I]放射線感受性突然変異株の分離と遺伝子クローニング^{4,5)}

放射線感受性変異株の分離は通常の方法で行った。即ち、分裂酵母野生株を突然変異剤で処理して、寒天培地上でコロニーをつくらせ、レプリカ後放射線を照射して、放射線に感受性を示す突然変異株を約50株分離した。これら突然変異株は13を超える遺伝的に異なる相補性群に分類できた。そこで、これら突然変異株の紫外線とX線感受性を調べて3つのグループに分類した。また、既存の突然変異株も併せて分類を行った結果を図1に示す。紫外線だけに感受性を示す除去修復欠損株、X線だけに感受性を示す組み換

A Model for the DNA Repair Pathways of *S. pombe*

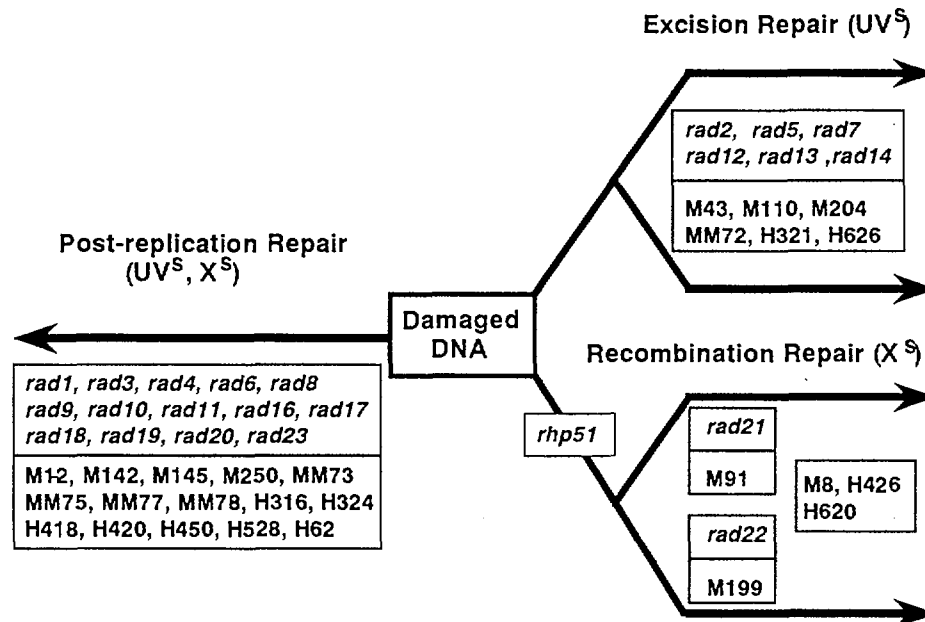


Fig. 1 A model for the DNA repair pathways of *S. pombe*. More than 50 radiation-sensitive mutants were obtained after EMS treatment. They were classified into three epistatic DNA repair pathways by the sensitivities to UV and X-rays. This grouping was confirmed by the evidence that a double mutant in a single repair pathway was as sensitive to radiation as a single mutant, while a double mutant between two independent repair pathways exhibited an additive sensitivities to radiation.

え修復欠損株、そして紫外線、X線ともに感受性を示す複製後修復欠損株のグループである。これらの修復系に含まれる突然変異株で二重突然変異株を作成すると、異なる修復系の組み合わせのときは放射線感受性が additive になる。また、同じ修復系同志で二重変異株を作ると放射線感受性は変わらない。これらのことから、分裂酵母の DNA 修復経路は出芽酵母と同じく 3 種類の独立な修復系が存在することが示された。ただし、組換え修復系の突然変異株が少ないことや複製後修復系の変異株が多数得られた点は異なるが、解析が十分尽くされていないため、さらなる検討が必要である。

複製後修復系は、突然変異を誘発する Error-prone repair や、除去修復および組換え修復といった現在解析が進んでいる修復系以外の未知の回復現象を含み説明が遅れている。このため、この修復系変異株の遺伝子クローニングや機能解析は興味もたれる。そこで、このグループに属する M12 株の既知突然変異株との相補性を調べたところ、M12 株はすべての既知突然変異株と相補することから新規突然変異株であることを確認した。M12 株は、X線にも紫外線にも中程度の感受性を示す (図 2)。また、菌の増殖が遅く、正常な菌の増殖が突然変異で影響を受けていることが推定された。生存に必須の遺伝子でしかも放射線感受性にも関与する遺伝子の変異が考えられる。この欠損を相補する遺伝子をクローニングするため、*S. pombe* の DNA をプラスミド pAU9B2 に組み込んで遺伝子ライブラリーを作成した。M12 の放射線感受性を回復する 2 種類のプラスミド pYMM3, pYMM4 が約 10^{-3} の頻度で得られた (図 3)。ザンハイブリダイゼーションの結果も制限酵素切断地図の結果も両者が同一の DNA 断片に由来することを示していた。即ち、両方に共通な 3.9kbp の DNA 断片に突然変異株 M12 の放射線感受性を相補する遺伝子が存在する。この DNA 断片を更に制限酵素で分解して約 1300bp の DNA 断片 *DraI-EcoRI* 上に放射線感受性を相補する遺伝子を特定した。そこで、この遺伝子断片の DNA 塩基配列を蛍光プライマーを用いたサイクルシーケンス法で決定した。DNA 塩基配列から ORF を調べると、最大 500bp 以下の非常に

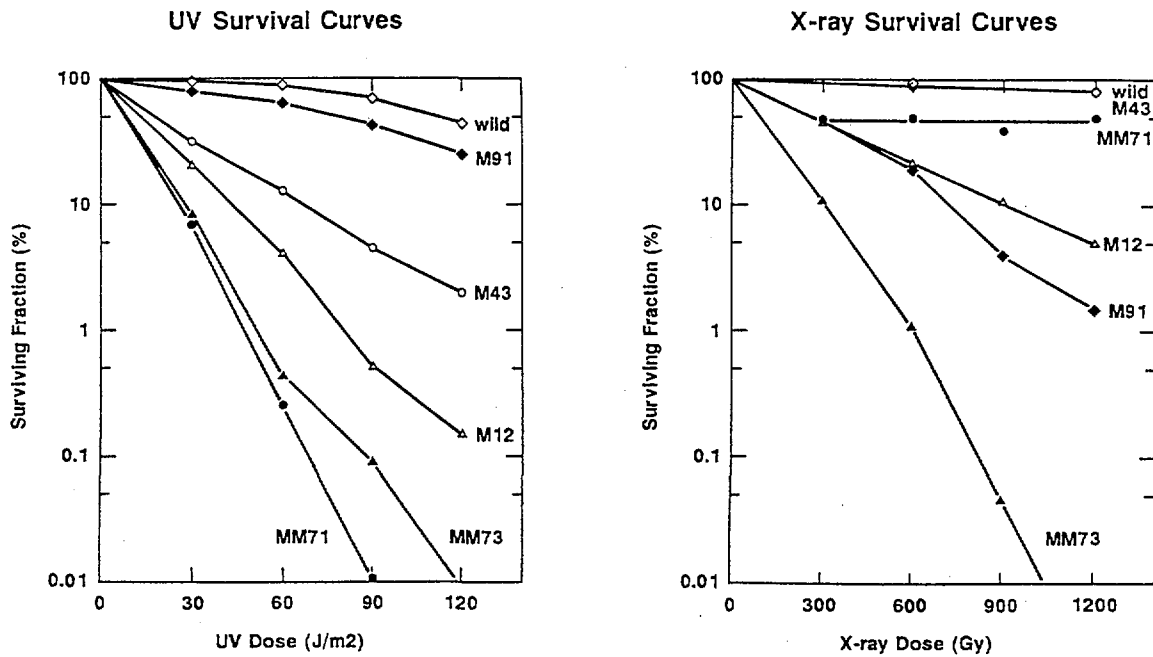


Fig. 2 UV and X-ray survival curves of typical radiation-sensitive mutants in three epistatic DNA repair pathways and strain M12. Cells were cultured in YEL broth to a stationary phase and diluted 100 folds. A 5 ml cell suspension was irradiated at a dose rate of $150\mu\text{W}/\text{cm}^2$ of UV or 30 Grey/min of X-rays. Appropriate dilutions were plated on YEA agar medium to form colonies.

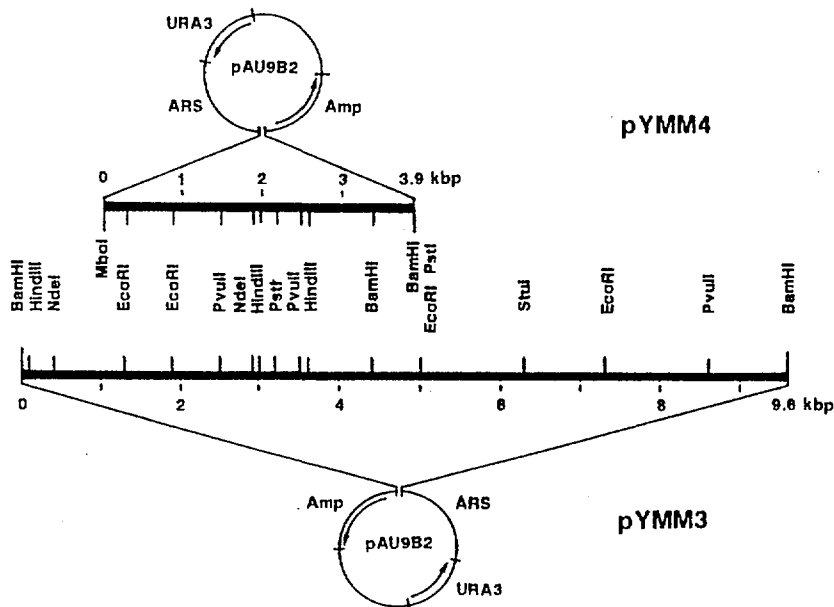
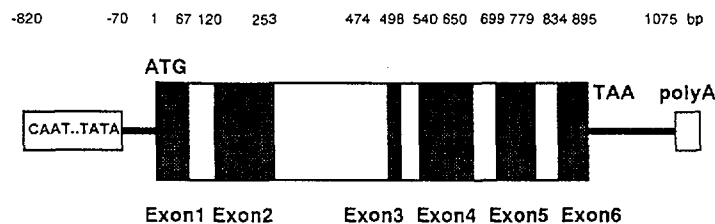


Fig. 3 Plasmid carrying *rad12* gene. To clone a new DNA repair gene *radM12*, a strain M12 was transformed with the gene bank that was made of pAU9b2 and of 8–16 kbp *S. pombe* DNA. Radiation-resistant transformants had two kinds of plasmids, pYMM3 and pYMM4. The 9.6 kbp insert DNA of pYMM3 had whole 3.9 kbp insert DNA of pYMM4 from the evidence that physical maps were completely the same and that they could hybridize each other.

短いものしか存在せず、最大の ORF は既知遺伝子との類似性は見られなかった。短い ORF についてホモロジーサーチを行ったところ、新規の Ubiquitin-conjugating enzyme E2 をコードしていた。そこで、ゲノム DNA と cDNA の DNA 塩基配列を決定した (図 4)。

この E2 蛋白質は全体で 6 つのエキソンからなる 156 アミノ酸の大きさで、全ての既知 E2 蛋白質と 30~40% のアミノ酸類似性を示した (表 1)。また、RadM12 蛋白質は、ユビキチン化を受けるシステイン



157 amino acids, 474 bp
Ubiquitin-conjugating enzyme E2

Fig. 4 A physical organization of a novel ubiquitin-conjugating enzyme gene *radM12*. We have cloned genomic DNA and cDNA of *radM12* gene of *S. pombe* and determined DNA sequences by a cycle sequencing method. It had a couple of promoter-like sequences, TATA and CAAT, upstream 5'non-translating region but no polyA signal at 3'non-translating region. The *radM12* gene had 6 exons and encoded 157 amino acids, which had about 40% homologies with all the existing UBC proteins.

Table. 1 Amino acid homologies among yeast ubiquitin-conjugating enzyme (UBC) E2.

Amino acid homology of the RadM12 protein was searched among Protein databases and found that it exhibited 33-42% homologies with all the existing UBCs, whereas it showed no higher homology than that between Rad6 and Rhp6, a *S. pombe* counterpart of Rad6. The RadM12 protein had a consensus amino acid sequence for ubiquitination CLSIL. These results indicated that the RadM12 protein encodes a novel UBC protein related to DNA repair and cell cycle.

E2 protein of Yeast		<i>S. cerevisiae</i> UBC2	<i>S. pombe</i>	
			Rhp6	RadM12
<i>S. cerevisiae</i>	UBC1	32.6	32.6	34.2
	UBC2	100.0	77.3	40.9
	UBC3	34.6	35.0	35.4
	UBC4	38.6	38.8	36.3
	UBC5	38.6	40.0	37.7
	UBC8	37.5	36.7	31.6
	UBC10	38.7	32.1	29.3
<i>S. pombe</i>	Rhp6	77.3	100.0	31.7
	RadM12	40.9	31.7	100.0

残基周辺のアミノ酸配列が良く保存されていた。E2蛋白質の役割は、標的蛋白質にユビキチンを結合させて、分解したり不活性化することで標的蛋白質の活性を抑え、新たな環境ストレスに適応したり、新たな生理環境に適応する機能を持つ。実際、放射線感受性に関与することが知られている *S. cerevisiae* の *RAD6* 遺伝子は、複製後修復や Error-prone repair そして sporulation に影響を与えるが、E2蛋白質をコードすることが知られている^{6,7,8,9,10}。RAD6蛋白質は、これらに関与するリプレッサーの分解を促進すると考えられる。あたかも、大腸菌の RecA蛋白質が SOS 修復系のリプレッサーである LexA蛋白質を分解して SOS 修復遺伝子群を活性化すると類似している。しかし、M12株がコードする E2蛋白質 RadM12は、RAD6の相同遺伝子がコードする E2蛋白質 Rhp6とは異なることが分かる。では何に関係するのであろうか。M12突然変異株の増殖を液体培地で調べたものが図5に示してある。ベクターだけの M12 (pAU9B2) は、低温 30℃の方が増殖速度が速い上、生存菌数も約10倍高い。それに比べて、野生型 *radM12* 遺伝子を持つ M12 (pYMM4) では高温37℃の方が増殖速度も速い上、生存菌数もそれに比例して高い。即ち、M12株は温度感受性突然変異株である。その上、M12突然変異株は、通常の細胞分裂が大幅に遅れたり、異常な核を持つ細胞や核の不等分離等の G2-M期の細胞分裂の異常が見られる

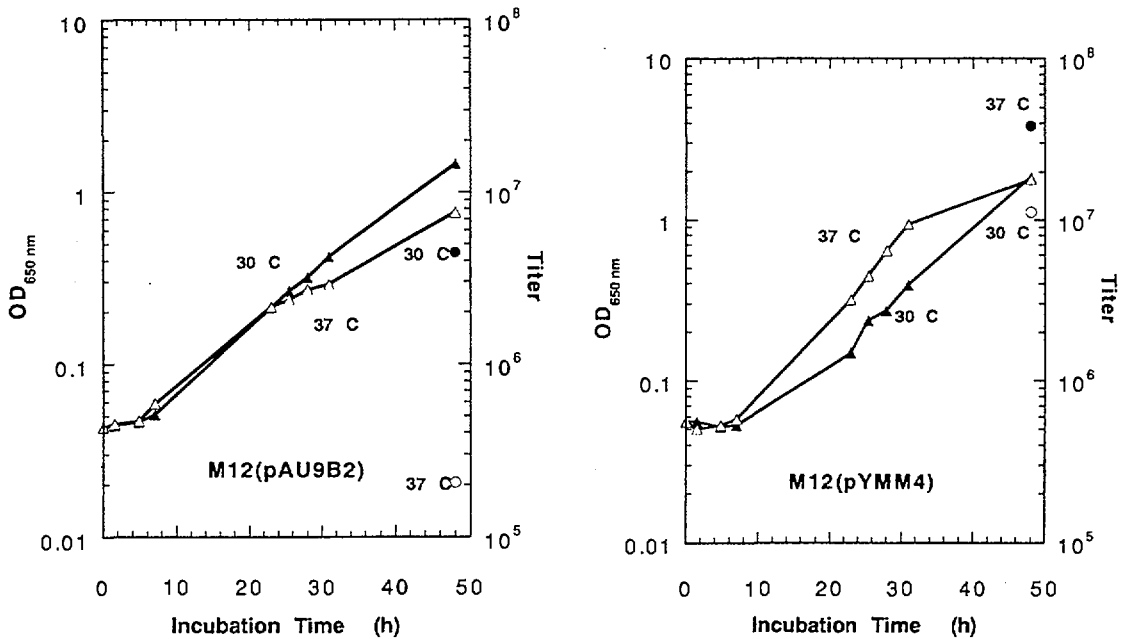


Fig. 5 Temperature-sensitive growth curves of a radiation-sensitive mutant strain M12 of *S. pombe*. A radiation-sensitive mutant M12 was transformed with plasmid pAU9B2 and pYMM4 carrying *radM12* gene. Cells were cultured in a minimal medium and optical density was measured at 30 C (▲) and 37 C (△). At the end of incubation, the number of colony forming units were measured by plating cells on YEA agar medium (○, ●).

ことである。これらのことから、*radM12* 遺伝子のコードする E2 蛋白質は細胞分裂の G2-M 期の制御に関連していることが推定される。また、放射線感受性も影響を受けることから、M12 突然変異株は G2 checkpoint repair に異常を起こし、DNA 修復を終わらないうちに細胞周期が G2-M へと移行を行うため放射線感受性になることが考えられる。ところで、最近 Al-Khodairy 達は G2-checkpoint repair に関係する突然変異株を分離して、その遺伝子をクローニングしている^{11, 12)}。そのなかに、*radM12* とまったく同一の遺伝子 *hus5* が得られたことを報告している。これらのことから、新規放射線感受性株 M12 は、DNA 修復の効率に影響を与える checkpoint repair の制御に関与するとともに、細胞の増殖にも必須のことから、通常の DNA 複製の異常を検知して G2 期を遅らせ、M 期の開始を制御する機能を持つと考えられる。

[II] 分裂酵母全遺伝子のカタログ化による放射線感受性遺伝子の分離

酵母の突然変異株にヒト遺伝子を導入して、変異株の欠損を相補するヒト遺伝子をクローニングする方法は、欠損遺伝子が単独で働く場合は一般的に有効であると考えられる。しかし、いくつかの蛋白質が複合体をつくる場合には種独自の結合系を取るため他生物種の対応する蛋白質（カウンターパート）では置き換えられないと推定される。この場合、遺伝子の保存部分のアミノ酸配列から DNA 塩基配列を予想して PCR 法で増幅するか、Southern hybridization 法で単離することが必要になる。このためには、遺伝子の保存部分を決める必要がある。この点から、出芽酵母で進められているゲノム解析で得られた遺伝情報と我々が進めている分裂酵母全遺伝子のカタログ化で得られる情報を組み合わせることで、相同遺伝子の保存部分を明らかにできると考えている。この方法を酵母の全遺伝子で可能にし、ヒトやマウスの housekeeping gene を明らかにするだけでなく、放射線感受性遺伝子を網羅することを目指して、分裂酵母全遺伝子のカタログ化の研究を推進してきた。

酵母の遺伝子は、全部で約7000程度と推定されている¹³⁾。これらはすべて真核生物の増殖に必要な遺伝子群のため housekeeping gene と考えられる。これらすべての遺伝子を単離して増殖に必要な遺伝子をカタログ化するなかで、放射線感受性に関連する遺伝子群を網羅することを目指して研究を進めている。酵母はモデル真核生物のため、酵母全遺伝子を明らかにすることは真核生物の増殖に必要な遺伝子群を明らかにすることになり、その生物学的意識は大きいと考える。実際、ほ乳類遺伝子群の中でどの遺伝子が housekeeping gene かを定義するには種々考え方がありうる。臓器特異性がなく総ての細胞で発現している遺伝子か、酵母のような生存に必須な遺伝子だけを持つモデル生物と類似の遺伝子か。ほ乳類細胞を扱う研究者は前者と考えているが、酵母を扱う研究者としては後者の件もありうると考えている。

DNA 修復や細胞分裂、DNA 複製などの DNA 修復に影響を及ぼす遺伝子群を網羅するために、分裂酵母の mRNA を分離して cDNA を作り、直接 DNA 塩基配列が決定できるよう DNA 塩基配列決定用ベクターに組み込んだ 1 万を越えるクローンを含む遺伝子ライブラリーを準備した。これら 1 万を越える cDNA クローン総ての塩基配列を効率よく決定するために、まず作成した cDNA 遺伝子ライブラリーの品質を調べた。即ち、このため最初の 500 個のクローンについて総て DNA 塩基配列を決定した (図 6)。その結果、100bp 以下の短い cDNA を持つクローンが全体の 20%、またシーケンス結果の判読困難なものが約 20% 存在した。全クローン 12000 個の DNA 塩基配列を決定するにはこれら利用価値の低いものの割合を減らすことが重要である。そこで、残りのクローンはまず電気泳動して DNA の長さを調べ、100bp 以上の cDNA を持つクローンについて DNA 塩基配列の決定を行う計画にした。現在までに約 5000 クローンの解析を進めた結果、400bp 以上の長さの cDNA を持つ割合が 50% までに改善された。得られた DNA 塩基配列は、まず M13 ベクター DNA 塩基配列を除いて cDNA 塩基配列だけを保存した。次に、この DNA 塩基配列をアミノ酸配列に変換して類似蛋白質を探し、全体のアミノ酸配列が既知蛋白質と 30% 以上の類似性を示すときその類似遺伝子として登録した。DNA 塩基配列から検索すると時間が掛かりすぎること、また分裂酵母遺伝子はまだほとんど報告がないためアミノ酸配列の類似性の方が信頼性が高いためこの方法を採用した。類似の蛋白質がない場合には更に DNA の類似性を調べた。このような解析を約 5000 クローンについて行った結果、100bp 以上を含むクローンが全体の 50% の 2500 クローンで、その内独立のクローンが 1000 個得られた (図 7)。即ち、cDNA ライブラリーの平均重複度は 2.5 であることから、かなり良いライブラリーであると考えられる。これら独立の 1000 クローンのうち、約 1/3 の 300 クローンがアミノ酸の類似性で見ると他種生物で得られている遺伝子と類似の遺伝子であった。残り

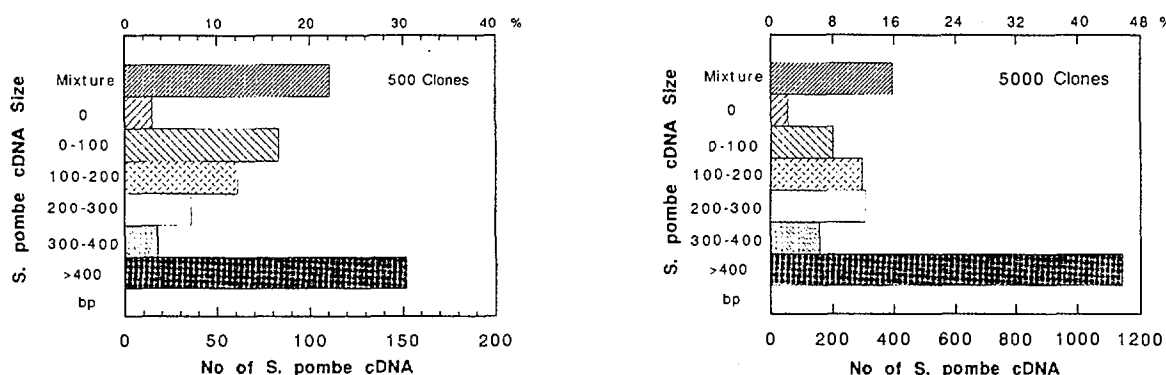


Fig. 6 The size distribution of *S. pombe* insert DNA cloned in a sequencing vector M13. The cDNAs of *S. pombe* were made from polyA⁺ mRNAs, cloned into M13 sequencing vector and their size distribution was analyzed after determining DNA sequences by a cycle sequencing method.

2/3の700クローンが新規遺伝子と考えられる。我々が探している DNA 修復に直接関係する遺伝子が14クローン得られたが、新規遺伝子7クローンと既知遺伝子6クローンであった。DNA 塩基配列からアミノ酸配列を決めその類似性を調べてみると、新規遺伝子は他種生物の DNA 修復遺伝子と30~50%のアミノ酸類似性を示した。DNA 修復遺伝子は除去修復、複製後修復、組み換え修復、そして checkpoint repair の総てに及んでいる。このように、1種類の生物から DNA 修復に関与する遺伝子を網羅的に取ることは、今後、遺伝子の構造と機能や遺伝子相互の関係等を明らかにする上でも重要な鍵となると考えている。更に、これら遺伝子のアミノ酸の保存部分に対応する DNA 塩基配列をプローブにして対応するヒト遺伝子クローニングを進めることが可能となってきた。

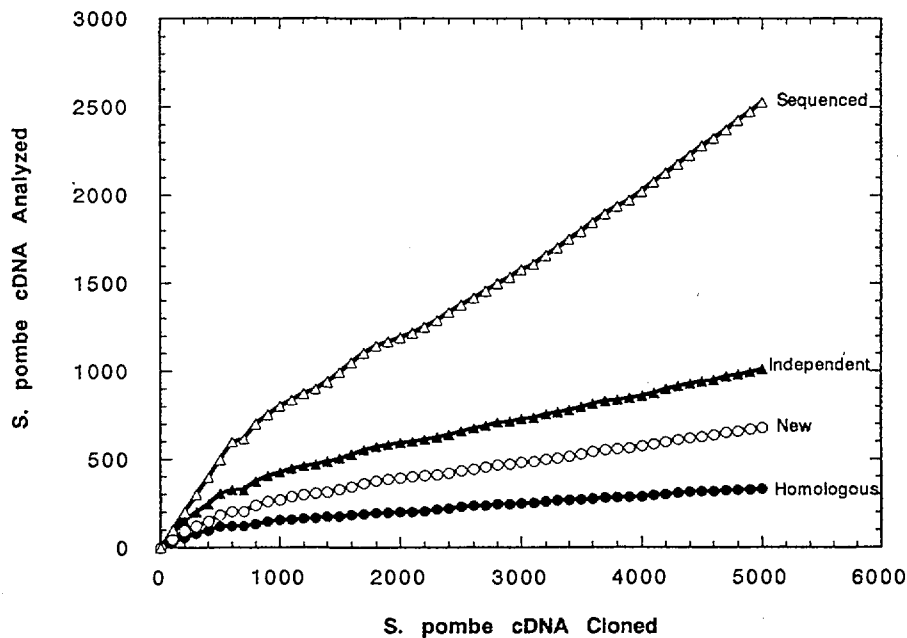


Fig. 7 Properties of cDNA clones. The nucleotide sequences of cDNA library were determined by one-path reading by a cycle sequencing method and homologous sequences of DNA and protein were searched among private and public Databases. We have examined about 5,000 clones and determined DNA sequences of 2,500 clones. We got 1,000 independent clones with the redundancy of 2.5 and 300 homologous and 700 new genes.

Table. 2 DNA repair genes of *S. pombe*. We have analyzed about 5,000 clones of *S. pombe* cDNAs and got 13 DNA repair related clones; 6 known and 7 new genes of *S. pombe*.

DNA Repair Genes of *S. pombe*

Clone	Homologous gene	Homology (%)	Repair	Species	Properties
Sp cDNA497	rad26	94.6%/56bp	Checkpoint repair	<i>S. pombe</i>	G2 checkpoint repair
Sp cDNA1167	swi10	80.6%/175bp	Rec-repair	<i>S. pombe</i>	Mating type switching
Sp cDNA1531	rad4	99.3%/135aa	Error-prone repair	<i>S. pombe</i>	XRCC1 homolog
Sp cDNA1750	RAD16	51.6%/31aa	Rec-repair	<i>S. cerevisiae</i>	Helicase, SNF/RAD54 family
Sp cDNA2701	SNM1	40.3%/62aa	Cross-link repair	<i>S. cerevisiae</i>	Zinc-binding domain
Sp cDNA3247	rad9	97.2%/180bp	Error-prone repair	<i>S. pombe</i>	Cell cycle arrest
Sp cDNA3478	RAD54	39.0%/41aa	Rec-repair	<i>S. cerevisiae</i>	Helicase, SNF/RAD54 family
Sp cDNA4427	rad13	72.1%/444bp	Exc-repair	<i>S. pombe</i>	RAD2, XPGC homolog
Sp cDNA4671	recA	22.4%/87aa	Rec-repair	Rhizobium	RecA
Sp cDNA4914	RAD57, RAD51, DMC1	54.0%/50aa	Rec-repair	<i>S. cerevisiae</i>	RAD57
Sp cDNA5108	rhp54	100.0%/376bp	Rec-repair	<i>S. pombe</i>	RAD54 homolog
Sp cDNA5251	RAD10	54.5%/378bp	Exc-repair	<i>S. cerevisiae</i>	RAD10/RAD1, Endonuclease
Sp cDNA5641	RAD23	30.7%/127aa	Exc-repair	<i>S. cerevisiae</i>	RAD23

おわりに

このように、我々は分裂酵母を真核生物のモデルとして据え、DNA 修復に関係する突然変異株を分離

しそれらにヒト遺伝子を導入して対応するヒト遺伝子をクローニングする方法と、分裂酵母全遺伝子をカタログ化しながら出芽酵母遺伝子との比較を進めてDNA塩基配列保存部分からヒト遺伝子をクローニングする方法の準備を進めてきた。まだやっと両方の方法が推進可能になってきた段階であるが、これから2つの方法でヒト遺伝子のクローニングを進めるとともに、新規酵母遺伝子から遺伝子破壊等の方法で新規遺伝子の機能を解明することで、放射線感受性遺伝子全体を見据えたモデル生物としての分裂酵母のDNA修復遺伝子の研究という目的を達成したいと考えている。

参考文献

- 1) Lee, M. G. and Nurse, P.: complementation used to clone a homologue of the fission yeast cell cycle control gene *cdc2*. *Nature* **327**, 31–35, 1987.
- 2) Shinohara, A., Ogawa, H., Matsuda, Y., Ushio, N., Ikeo, K., and Ogawa, T.: Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to *RAD51* and *recA*. *Nature Genetics* **4**, 239–243, 1993.
- 3) Yoshimura, Y., Morita, T., Yamamoto, A., and Matsushiro, A.: Cloning and sequence of the human *RecA*-like gene cDNA. *Nucleic Acids Res.* **21**, 1665, 1993.
- 4) Morimyo, M., Machida, I., Hongo, E., Saeki, T., and Hama-Inaba, H.: Cloning of a new DNA repair gene *radM12* of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, **8**, S275, 1992.
- 5) Morimyo, M., Machida, I., Hongo, E., and Hama-Inaba, H.: The *radM12* gene of *S. pombe* encoding a new ubiquitin-conjugating enzyme. *Proceedings of the 17th International Congress of Genetics*. Birmingham, 1993.
- 6) Morrison, A., Miller, E. L. and Prakash, L.: Domain structure and functional analysis of the carboxyl-terminal polyacidic sequence of the *RAD6* protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 1179–1185, 1988.
- 7) Reynolds, P., Koken, M. H., Hoeijmakers, J. H., Prakash, S. and Prakash, L.: The *rph6* gene of *Schizosaccharomyces pombe*: a structural and functional homolog of the *RAD6* gene from the distantly related yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **9**, 1423–1430, 1990.
- 8) Koken, M., Reynolds, P., Bootsma, D., Hoeijmakers, J., Prakash, S. and Prakash, L.: *Dhr6*, a *Drosophila* homolog of the yeast DNA-repair gene *RAD6*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 3832–3836, 1991.
- 9) Koken, M. H., Reynolds, P., Jaspers-Dekker, I., Prakash, L. and Prakash, S. et al.: Structural and functional conservation of two human homologs of the yeast DNA repair gene *RAD6*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 8865–8869, 1991.
- 10) Jentsch, S., McGrath, J. P. and Varshavsky, A.: The yeast DNA repair gene *RAD6* encodes a ubiquitin-conjugating enzyme. *Nature* **329**, 131–134, 1987.
- 11) Al-Khodairy, F., Enoch, T., and Carr, A. M.: The *S. pombe* *hus5* gene encodes a ubiquitin conjugating enzyme required for normal mitosis. *J. Cell Science* (in press), 1995.
- 12) Al-Khodairy, F. and Carr, A. M.: DNA repair mutants defining G2 checkpoint pathways in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.*, **11**, 1343–1350, 1992.
- 13) Dujon, D., et al.: Complete DNA sequence of yeast chromosome XI. *Nature*, **369**, 371–378, 1994.