

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	此村 直人	
学 位 の 種 類	博士（ 理学 ）	
学 位 記 番 号	甲 第1508号	
学位授与の日付	平成29年8月31日	
学位授与の要件	文部科学省令学位規則 第4条第1項 該当	
学 位 論 文 題 目	Rad51 and RecA juxtapose dsDNA ends ready for DNA ligase-catalyzed end-joining under recombinase-suppressive conditions	
主研究指導教員	古久保 哲朗	
論 文 審 査 委 員	(主査) 大野 博司	大学院客員教授
	(副査) 池口 満徳	教授
	(副査) 今本 尚子	大学院客員教授
	(副査) 片岡 浩介	准教授

論文内容の要旨

ゲノムDNAは、細胞内で発生する活性酸素種（ROS）や細胞外から照射される紫外線／電離放射線等によって常に損傷を受けており、特にDNAの二本鎖切断（DSB）は、最も深刻な損傷として知られている。DSB修復は、相同組み換え（HR; homologous recombination）または非相同末端結合（NHEJ; non-homologous end joining）のいずれかの経路により修復される。高等真核生物の場合、体細胞におけるDSB修復は主にNHEJ経路によって行われ、HR経路はむしろ減数分裂時のDSBにおいて開始する相同染色体分離に働くとされている。NHEJ経路では二本鎖DNA（dsDNA）に生じた切断末端同士を直接結合することから、末端部分の配列情報が失われる可能性があるのに対して、HR経路では切断部位と相補的な配列を染色体上の相同部位から見つけ出し、それを鋳型として修復することから、正確な修復が可能と考えられている。HR反応において中心的な役割を担う酵素がRecA/Rad51リコンビナーゼ（原核生物ではRecA、真核生物ではRad51）であり、種を越えて広く保存されている。興味深いことに、最近出芽酵母において、NHEJ経路によるDSB修復の正確性にはRad51の機能が必要であることが示された（ $\Delta rad51$ 株では正確性が1/14以下になる）。しかしながら、知られているRad51の分子機能（生化学活性）ではNHEJ経路での役割を全く説明できない。そこで本研究では、NHEJ経路におけるRad51の分子機能を明らかにすることを目的とし、以下の解析を行った。

RecA, ATPの存在下・非存在下において、大腸菌由来のligaseによるdsDNA（両末端にPstI切断部位を有する）のligation活性に及ぼす効果について検討したところ（反応時間2～

40分間)、RecAはATP依存的にligation活性を促進し、速やかに線状DNAの多量体化 (linear multimer形成) を誘起することが明らかとなった。また興味深いことに、RecA非存在下では環状単量体DNA (circular monomer or nicked circular monomer) が主な生成物であるのに対して、RecA存在下ではむしろDNAの環状化が抑制され、線状DNAの多量体化が促進されることが示された。短い反応時間 (2分間) における促進効果についても調べたところ、RecA, ATP存在下では両因子の非存在下と比較し、1/30~1/40量程度のligaseで同程度のligation活性が得られることが明らかとなった。

次に同反応 (ligation活性の促進) におけるRecAの各種ヌクレオチド (ATP, ADP, AMP, ATP γ S) に対する依存性について検討を行った。その結果、AMP存在下ではRecAによるligation活性の促進が見られないのに対し、ADP存在下では、ATP存在下と同様、ligation活性の促進が見られたことから、ATP加水分解非依存性ならびにpartially extended filament (後述) 形成の重要性が示された。一方、RecAのDNA結合を安定化するとされるATP γ Sの存在下では、ligation活性が強く阻害されたことから、同反応には、RecAとDNAの相互作用がある程度不安定 (ダイナミック) である必要があると考えられた。

DNA末端形状の影響について検討するため、*Pst*I処理 (3'-TGCA overhang) したdsDNAに加え、*Hind*III処理 (5'-AGCT overhang) あるいは*Hinc*II処理 (平滑化末端) したdsDNAを基質とし、RecAによるligation活性の促進効果を調べた (ここでは平滑末端のligationが可能なT4ファージ由来のligaseを使用した)。その結果、いずれの基質に対しても促進効果が見られたことから、同反応には、①末端同士の塩基対形成 (4 bp) は不要であること、②ligaseに種特異性が見られないことから、RecAとligaseの物理的な相互作用は不要であることが強く示唆された。

最後にRecAの出芽酵母ホモログであるRad51についても同様の促進活性の有無を検討し、①RecAと同様、Rad51はADP存在下において大腸菌ligaseのligation活性を促進すること、また当該促進活性は、②Rad51のdsDNA結合能に依存すること (Rad51-G103E変異体には促進活性が見られない)、③大腸菌ligaseとの直接的な相互作用を介さないこと (免疫沈降実験においてRad51と大腸菌ligaseは共沈しない) が明らかとなった。

RecA/Rad51 が形成する filament として、①extended filament (ピッチ 9 nm, +ATP)、②partially extended filament (ピッチ 8.2 nm, +ADP) ③compressed filament (ピッチ 7 nm, -ATP/ADP) の三種類が知られている。本現象において、いずれ (RecA or Rad51) の場合も cofactor として ADP が強い促進活性を示したことから、通常の HR 反応においては不活性型とされるピッチ 8.2 nm の partially extended filament が活性型であることが強く示唆された。RecA の場合、dsDNA 上で extended filament を形成するためには、長時間 (> 10 分間) のインキュベーションが必要であるが、本現象では、はるかに短い時間 (2~5 分間) で反応が完了していることから上記のモデルは支持される。興味深いことに、あらかじめ RecA を dsDNA とインキュベートすると、デッドエンド複合体が形成され、HR 反応は阻害されることが知られている。今回、このデッドエンド複合体について新規の活性 (線状 DNA の多量体化促進活性) が見出されたことは大変興味深い。他グループによる過去の電顕観察結果とも合わせて考えると、末端同士の塩基対形成とスタッキングによって一時的に juxtapose した DNA 断片を RecA がラセン繊維形成でその中に巻き込む形で安定化し、ligation 活性を促進したものと思われる。今後は、実際に本反応が NHEJ 経路に関与することを、細胞内において確かめる必要がある。

論文審査結果の要旨

本論文の審査は、提出論文の内容、発表会（平成29年5月23日午後3時～）および審査会での質疑応答（平成29年5月23日午後4時10分～）に基づき、4名の審査員（主査：大野 博司 教授、副査：池口 満徳 教授、副査：今本 尚子 教授、副査：片岡 浩介 准教授）によって行われた。

学位論文では、大腸菌由来のRecAまたは出芽酵母由来のRad51について、大腸菌（もしくはT4ファージ）由来のligaseが触媒するligation反応に対する促進活性を種々のヌクレオチドの存在下・非存在下で調べた結果、及び得られた結果から推定される作用機構モデルやその生理的意義等について詳しく述べられている。発表会に引き続き審査会を行ったため、審査会ではあらためて内容の要約を発表することはせず、すぐに本研究の専門性、関連科目の知識、英語力に関して、審査員と申請者の間で以下の質疑応答が行われた。

まず大野主査より、RecA/Rad51のDNA結合様式はHR経路とNHEJ経路でどう違うのか、NHEJ経路ではRad51欠損により正確性（fidelity）が14倍低下することだが、NHEJ活性自体も低下するのか、RecAとRad51の相同性はどの程度あるのか、原核生物と真核生物ではDSB修復に用いる経路が異なる（前者は主にHR経路を、後者は主にNHEJ経路を利用する）のはなぜか、等について質問があった。いずれの質問に対しても概ね適切な回答が得られたが、特にfidelityについては、実験系の制限（市販のligaseでは誤対合を連結できないなど）も含めて自身の意見を詳しく述べた。池口副査からは、RecAはcofactorとしてATP/ADPの両者を利用するのに対し、Rad51はADPのみを主に利用するように見えるのはなぜかを問われ、さらにRecA, Rad51のつくるfilamentの形状と活性の関係について詳しく説明するように求められた。RecA, Rad51の金属イオンに対する要求性の違いやfilament構造の異同については適切な回答が得られたが、ATP存在下においてdsDNA上にactive filamentを形成する速度の違いについてはよく分からない（RecAは20分程度かかることが分かっているが、Rad51についてはよく分からない）とのことであった。またRecAによるligation促進活性の分子機構についても問われたが、自身のモデルの概要を適切に説明し、複数の可能性について議論した。今本副査からは、ATP, ADPがそれぞれ何をするのか、詳しく説明するように求められたが、質問の意図を正確に捉え切れなかったためか、質疑応答がやや噛み合わない感があった。しかしながら、これらのヌクレオチドがRecA/Rad51に直接結合すること、結合によりfilamentのピッチが変化すること、ATP γ Sについて得られた結果がHR反応から推測される結果とは大きく異なっていたことなどについて回答した。片岡副査からは、RecA/Rad51はssDNA同士の連結を促進する活性はないのか、ssDNAに

inactive formで結合することはできるのか、dsDNAが環状の場合はどうなるのか等について問われた。さらに、EMSA実験で最も伝えたいことは何か、RecAが少量の場合にはヌクレオチド非存在下においても促進活性が見られるのはなぜか、RecAがNHEJ経路に関与するという生理的な証拠はあるのか、等についても問われた。いずれの質問についても概ね適切な回答が得られたが、生理的な証拠については、大腸菌以外（結核菌等）に関する説明であったため、やや説得力に欠ける印象を受けた。

関連科目の知識について、まず大野主査から、DSB以外のDNA損傷の種類とその修復機構について問われ、ヌクレオチド除去修復（NER）、塩基除去修復（BER）についての説明があった。また損傷ではなく、生理的なDSBとしてはどのような例が知られているかを問われ、減数分裂時のDSBや免疫グロブリンのクラススイッチ時のDSBについて、簡潔に回答した。DNA複製や細胞周期についても問われたが、これらについては専門分野からややはずれていたためか、それほど明確な回答は得られなかった。池口副査からは、NHEJ経路において、RecA/Rad51はATPの加水分解のエネルギーをどのように使うのか、HR経路の場合はどうなのか、ATPの加水分解のエネルギーを使う他のタンパク質としてはどのようなものが知られているか等について問われ、概ね適切な回答が得られた。今本副査からは、NHEJ経路が活性化されている（NHEJ反応が起こりやすい）細胞はあるのかと問われ、ガン細胞は紫外線照射に対して抵抗性を示すことからその可能性があること、また実際にRad51阻害剤をガン治療に使う研究が進められていることなどについて述べた。続いて、DNA損傷により活性化されるシグナル伝達経路についても問われ、時間はかかったものの、概ね適切に回答した。片岡副査からは、DNA修復機構の破綻に基づく疾患として、どのようなものが知られているかを問われたが、専門分野に近いこともあり、NHEJ経路の欠損として免疫疾患（LIG4症候群のことと思われる）を、NER経路の欠損としてコケイン症候群を例に挙げ、適切に説明した。全般的に、専門分野から遠い事項に関する質疑応答については、やや知識不足の感を受けたが、学位を取得する上では十分なレベルにあると考えられる。

英語については、"General Introduction", "General Discussion and Conclusion"に記述された内容、ならびに任意に選んだ一枚のスライドの内容を口頭でプレゼンテーションしてもらうことにより判断した。

大野主査より、今年度から生命ナノシステム科学研究科の学生であっても、生命医科学研究科の審査方法（書式）に統一することになったため、"General Introduction", "General Discussion and Conclusion"の部分については博士論文と一体化せず、英文報告書として独立した形で再提出するようにとの要請があった。また再提出に当たっては、細かい文法ミスについても合わせて訂正するように求められた。

その後、審査員全員で討議を行った。研究内容については、学位に十分値するとの評価を受けた。また、専門分野のみならず、関連科目に関する質疑応答、英語力等全てを総合的に判断して、申請者は学位を得るにふさわしい十分な資格を有すると判定された。