

主論文の内容の要旨

学位申請者 氏名	野田 俊輔	ローマ字 氏名	Noda Shunsuke
-------------	-------	------------	---------------

論文題名

大腸菌の DNA 二本鎖切断修復における核様体の時空間制御機構

内容の要旨

DNA 二本鎖切断 (DSBs; double strand breaks) は DNA 上で生じる最も重篤な損傷であり、電離放射線や化学変異原、複製フォークの阻害などによって引き起こされる。DSB は染色体構造の局所的な崩壊を引き起こすため、DSB が修復されない場合や不適切に修復された場合は、染色体レベルのゲノム不安定性が引き起こされ、これはヒトにおける発がんや老化の原因になっている。DNA 相同組換え (HR; homologous recombination) 修復は進化的に保存された機構であり、DSB 部位周辺と相同な配列を持つ姉妹染色体を修復の鋳型として用いることで、DSB の正確な修復を可能にしている。大腸菌では DSB の大部分が相同組換え経路によって修復されることが知られており、これまでの解析から以下のような分子モデルが提唱されている。大腸菌において、DSB が生じた場合、RecBCD 複合体が DSB に結合し、DNA の 5'末端側が削り込まれて 3'末端を持つ一本鎖 DNA (ssDNA; single-stranded DNA) 領域が作られる。次に、ssDNA に RecA タンパク質がフィラメント状に結合し、RecA ヌクレオプロテインフィラメント (通称; RecA フィラメント) が形成される。RecA フィラメントは結合している ssDNA と相同な DNA 配列を姉妹染色体から探し出し、ssDNA を相同な二本鎖 DNA に侵入させ、D-loop と呼ばれる構造を形成する。D-loop が形成されると ssDNA の 3'末端がプライマーとなって DNA 修復合成が起こり、DSB により失われた塩基が挿入される。DNA 修復合成が完了すると、ホリデー構造と呼ばれる 2つの二本鎖 DNA 鎖が交差した組換え中間体が形成され、その後 RuvABC ヌクレアーゼ複合体によってホリデー構造が切断されることで組換え体が作られる。DSB 部位と鋳型となる姉妹染色体間の組換え反応は、HR を介した DSB 修復に加えて染色体高次構造の維持や動態の制御が重要な役割を果たしていると考えられるが、その分子メカニズムは不明である。

染色体高次構造の時空間制御に関わるタンパク質として SMC ファミリータンパク質が知られている。SMC ファミリータンパク質はホモまたはヘテロダイマーで巨大なリング状の構造を形成し、姉妹染色体の接着や、染色体の凝集に寄与しているタンパク質群であるが、近年、

DNA 損傷修復においても重要な役割を果たしていることが報告されている。SMC 様タンパク質である RecN はバクテリア間で高度に保存されているタンパク質で、DNA 損傷によって発現が誘導される。*recN* を欠損した大腸菌細胞は電離放射線や、複製阻害剤であるマイトマイシン C (MMC) に対して高感受性を示す。*recN* 欠損細胞を MMC で処理すると、大腸菌の染色体に相当する核様体が断片化した様子が観察される。RecN 精製タンパク質を用いた生化学的解析から、RecN タンパク質は ssDNA と dsDNA をテザリングする活性を持ち、RecA 依存的な D-loop 形成を促進することが明らかになっている。これらのことから、RecN は相同組換えを介した DSB 修復において必須の役割を果たしており、染色体の高次構造を制御することで、RecA による DSB 修復の促進に関与していることが示唆されている。そこで、本研究では、RecN が持つ核様体の動態を制御する機能が DSB 修復機構において果たす役割を明らかにするため、RecN の欠損で見られる細胞レベルの影響と分子レベルの影響の関連性について詳細に解析した。

今回、私は RecN の発現タイミングが核様体の構造と生存率に及ぼす影響について調べるために、*recN* 遺伝子が本来持っている DNA 損傷に依存して発現誘導が起こる SOS プロモーターからアラビノースの添加により発現を誘導できる *PBAD* プロモーターに置き換えた RecN 発現プラスミド (pBAD-RecN) を構築した。このプラスミドで *recN* 欠損細胞を形質転換後、SOS 誘導型 RecN と同様に MMC 処理開始直後にアラビノースを添加し、RecN を発現誘導したところ、MMC 処理中も核様体は正常な構造が維持され、断片化は観察されなかった。次に、MMC 処理後 90 分の段階で RecN の発現誘導を行ったところ、90 分の段階では $\Delta recN$ 細胞に特徴的な核様体の断片化が観察された一方で、120 分 (RecN 発現誘導後 30 分) の段階では正常な核様体構造を持つ細胞の割合が増加し、細胞の生存率も野生型細胞と同程度まで回復が見られた。これらの結果から、DSB によって核様体構造が断片化した後でも、RecN の発現誘導によって核様体構造と細胞生存率を回復させることができることが分かった。次に、HR 経路の後期ではたらく RuvC を欠損した *ruvC* 欠損細胞と、*recN ruvC* 欠損細胞において、MMC 処理後の核様体構造を観察したところ、*ruvC* 欠損細胞では細胞の中央に凝集した核様体や無核細胞が観察されたのに対し、*recN ruvC* 欠損細胞では *recN* 欠損細胞と同様に核様体の断片化が観察された。さらに、*recN ruvC* 二重欠損株に pBAD-RecN を導入し、長時間の MMC 処理を行って核様体が断片化した後に RecN を発現誘導させたところ、核様体が *recN* 欠損株で観察されるような断片化した核様体を持つ細胞が減少し、*ruvC* 欠損細胞で観察されるような細胞中央に凝集した核様体を持つ細胞や無核細胞が増加した。これらのことから、RecN は相同組換え修復において RuvABC が関与するホリデー構造解消の過程よりも早期の過程で機能するタンパク質であり、核様体の再構築は RecN 発現誘導による相同組換え修復の再活性化によって起きていることが示唆された。

次に、MMC 処理と同時に RecN を発現誘導した時と、MMC 処理によって核様体が断片化した後に発現誘導した場合の RecN の細胞内局在を比較するために、pBAD-RecN プラスミドにある *recN* 遺伝子の N 末端に GFP タグを付加したプラスミド (pBAD-GFP-RecN) を構築し

た。まず、pBAD-GFP-RecN を *recN* 欠損細胞に導入し、MMC 処理とアラビノース添加による RecN 発現誘導を同時に行ったところ、RecN は核様体上に局在していた。SOS 誘導型のプラスミドを導入した *recN* 欠損細胞に対しても同様の実験を行った場合でも、RecN は核様体上に局在していることが分かった。しかし、pBAD-GFP-RecN を導入した *recN* 欠損細胞を MMC で 90 分処理した後にアラビノースを添加したところ、MMC 処理とアラビノース添加を同時に行った場合とは対照的に、RecN は断片化した核様体間（核様体ギャップ領域）に局在していた。さらに、RecN が局在していた核様体ギャップ領域で、断片化した核様体の再構築が起きているのかを調べるために、MMC 処理した $\Delta recN$ 細胞に RecN を発現した際の動態をライブイメージングにより解析した。その結果、RecN が局在していた核様体ギャップ領域で断片化した核様体が結合し、再構築される様子が観察された。これらの結果から、*recN* 欠損細胞において、RecN のギャップ領域への局在は DSB 部位への結合を反映していることと、核様体ギャップ領域に局在する RecN は DSB 修復を促進することで核様体構造を再構築していることが示唆された。さらに、RecN がギャップ領域において HR 経路に関わる RecA と共局在しているかを調べるために、C 末端に mCherry 蛍光タンパク質を付加した RecA を発現するプラスミド（pRecA-mCherry）と pBAD-GFP-RecN を $\Delta recA \Delta recN$ に導入し、MMC で 90 分処理した後にアラビノース添加によって RecN を発現誘導したところ、RecN は RecA と共に核様体ギャップ領域で共局在していることが分かった。

以上のことから、 $\Delta recN$ 細胞で観察される DSB に依存した核様体の断片化は、染色体構造の不可逆的な崩壊を反映したものではなく、RecN の発現のみで再構築が可能な状態、すなわち HR 修復が中断されている状態を反映していることが分かった。さらに、HR 修復が中断されている間、核様体ギャップ領域に存在する DSB では、RecA ヌクレオプロテインフィラメントが DNA の分解を防ぐ役割を果たしていると考えられ、RecN は RecA 依存的にギャップ領域に結合すると、RecA による HR 反応の再活性化を引き起こすことで DSB 修復の促進と核様体の再構築関与していることが示された。今回の結果は、RecA が持つ相同鎖の探索と、DNA 鎖交換反応という 2 つの機能が時間的・空間的に分離可能であり、SMC 様の RecN が RecA フィラメントと核様体の両者の動態を制御することによって一連の反応を促進する必須の役割を果たしていることが明らかになった。