

論文審査の要旨及び担当者

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

論文審査の要旨

1. 論文の要旨

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を引き起こされ、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 HR 経路によって修復されることが知られおり、RecA リコンビナーゼは HR 修復において中心的な役割を担っている。RecA は、DSB 末端部の処理によって生じた一本鎖 DNA 領域にフィラメント状に結合し、相同な二本鎖 DNA の探索と鎖交換反応を触媒して D-loop と呼ばれる組換え中間体を形成する。この RecA フィラメントによる D-loop 形成には、細胞内空間において鋳型となる二本鎖 DNA と RecA フィラメントが近接し、両者の結合が安定に維持されることが重要と考えられるが、その空間制御のメカニズムについては不明な点が多く残されている。

染色体高次構造の維持に関わる SMC タンパク質ファミリーに属する RecN は、バクテリア間で高度に保存されており、その発現は DNA 損傷によって誘導される。*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し、MMC 処理した *recN* 欠損細胞では、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。また、RecN タンパク質は、ATP 依存的に一本鎖 DNA と二本鎖 DNA 間をテザリングする活性を持ち、RecA による 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 HR 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。

これらの背景を踏まえて、本論文の著者は、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、通常、野生型細胞では DNA 損傷依存的に発現誘導される RecN の発現誘導タイミングを変化させた際の核様体構造や細胞生存率、RecN および RecA の細胞内局在パターンへの影響を詳細に解析した。

本論文は、第一章「序論」、第二章「材料及び実験方法」、第三章「結果」、第四章「考察」

により構成されており、以下、第三章と第四章の要旨について述べる。

第三章_第一節～第三節では、*recN*欠損細胞の核様体構造について、RecNの発現タイミングが及ぼす影響について述べられている。*recN*遺伝子はSOS遺伝子の1つであり、DNA損傷に依存して発現誘導が起こる。本論文著者は、アラビノースの添加により発現を誘導できる*P_{BAD}*プロモーターに置き換えたRecN発現プラスミドを構築し、RecNの発現タイミングがMMC存在下における核様体の構造と細胞生存率に及ぼす影響について調べた。その結果、MMC処理によって核様体の断片化が生じた細胞にRecNを発現誘導すると、核様体は元の状態へ再構築され、細胞生存率が野生型レベルに回復することを明らかにした。

第三章_第四節では、HR経路においてRecNのはたらくタイミングについて解析した結果が述べられている。RuvCエンドヌクレアーゼは、HR後期で組換え中間体の解消に関与しており、RuvCを欠損した細胞では、MMC存在下において細胞の中央に凝集した核様体や無核細胞が観察される。本論文著者は、*recN ruvC*欠損細胞が*recN*欠損細胞と同様に核様体の断片化を示すことを明らかにし、さらに、*recN ruvC*欠損細胞にRecNを発現誘導させたところ、*ruvC*欠損細胞で観察されるような凝集した核様体を持つ細胞や無核細胞が増加することを発見した。これらのことから、HR修復において、RecNはRuvCが関与する組換え中間体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HR修復の再活性化によって引き起こされていることが示唆された。

第三章_第五節～第六節では、RecNのN末端にGFP（緑色蛍光タンパク質）を付加したGFP-RecNを発現する*P_{BAD}*系プラスミドを用いることで、RecNの細胞内局在を観察した結果について述べられている。以前の研究では、DNA損傷に依存して発現したGFP-RecNは核様体上に蛍光フォーカスを形成することが示されている。本論文著者は、MMC処理により核様体の断片化が生じた*recN*欠損細胞にGFP-RecNを発現し細胞内局在を調べたところ、RecNは断片化した核様体間（核様体ギャップ領域）に局在することを明らかにした。さらに、ライブイメージングを用いた1細胞蛍光観察から、GFP-RecNが局在している核様体ギャップ領域で断片化した核様体の再構築が起こっていることを明らかにした。

第三章_第七節～第八節では、HR経路に関わるRecAのC末端にmCherry蛍光タンパク質を付加したRecA-mCherry発現細胞を用いた解析結果が述べられている。MMCで90分処理後の*recN*欠損細胞においてRecA-mCherryの細胞内局在を調べた結果、RecA-mCherryは核様体に加えてギャップ領域に局在しており、さらに、この時点からGFP-RecNを発現誘導させると、GFP-RecNは核様体ギャップ領域でRecAと共局在することが示された。

第四章では、今回の結果を踏まえて、HR修復過程におけるRecNの役割について考察している。本論文著者は、*recN*欠損細胞で観察される核様体の断片化は、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と結論している。さらに、この中断はRecAフィラメントがD-loop形成する前の段階で停止しており、この状態においてRecNを発現誘導すると、RecA依存的にギャップ領域にリクルートされたRecNがRecAによるD-loop形成を促進し、DSB修復と核様体の再構築を引き起こされていると考察している。

HR修復に関する解析は数多くの先行研究が行われており、詳細な分子モデルが示されてい

るが、細胞内の三次元空間における染色体の動態制御や DNA 鎖の時空間制御については考慮されていなかった。今回の研究から、本論文著者は、大腸菌の細胞内で起きている HR 修復において、RecA による相同鎖の探索と DNA 鎖交換反応という 2 つの機能は時間的・空間的に分離可能であるということ、また、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を明らかにした。そして、これらの結果をもとに、RecN が DNA 鎖間のテザリング活性を介して、RecA 依存的な HR 修復を促進する組換えモデルを提唱した。これは、HR 修復における DNA 鎖間の時空間制御の仕組みを明らかにした点で高く評価できる内容である。RecN が属する SMC ファミリータンパク質は、ヒトをはじめとした真核生物においても染色体の動態制御に重要な役割を果たしており、発がんや遺伝疾患との関連も指摘されている。そのため、本研究から得られる知見は、DNA 損傷修復における染色体の動態制御メカニズムの解明や、SMC ファミリータンパク質の機能異常と関連がある疾患が起こる仕組みの解明につながることを期待できる。

2. 審査の方法、内容の評価、結論

本論文は、令和 5 年 12 月に提出され、上記 3 名の論文審査担当者がそれぞれ査読した。さらに、令和 6 年 1 月 26 日午後 2 時から、学習院大学 南 7 号館 4 階会議室において公聴会を開催し、当該論文の内容および、これに関する DNA 損傷修復、DNA 相同組換え分野の学識について、質疑応答形式による審査を行なった。また、公聴会後に論文審査担当者 3 名から生命科学全般にわたる学力について口頭試験を実施し、学位申請者である野田俊輔氏の学力について詳細に審査した。

本論文は、RecN が RecA 依存的な相同組換え修復を介した DSB 修復に必須の機能を果たしていることや、RecN による DNA 鎖間の時空間制御が染色体の動態制御と関連していることを世界で初めて示した研究成果であり、相同組換え修復の分子メカニズムを理解する上でも非常にインパクトのある研究成果である。

以上を総合し、本論文は博士の学位論文として十分な内容があり、3 名の論文審査担当者は一致して、野田俊輔氏が博士（理学）の学位を授与するにふさわしいと認めた。

論文審査主査 菱田 卓 教授
高島 明彦 教授
尾仲 宏康 教授