

## 主論文の内容の要旨

学位申請者 氏名	林 匡史	ローマ字 氏名	Masafumi Hayashi
-------------	------	------------	------------------

論文題名

### DNA複製阻害時に働く DNA 損傷トレランス経路の制御メカニズムの解明

内容の要旨

生物の遺伝情報を担っているゲノム DNA は紫外線や活性酸素などの外的、内的要因によって常に損傷を受けている。DNA 損傷は DNA 損傷修復経路によってすみやかに修復されるが、このような傷はゲノム全体のランダムな位置に起こる。そのため、DNA 複製中に複製ポリメラーゼが損傷部位にたどり着くと、複製フォークの進行が阻害されてしまう。複製阻害は誤塩基対形成や複製フォークの崩壊などゲノムの不安定性を引き起こす主要な原因となるため、生物は複製阻害を解消するメカニズムとして DNA 損傷トレランス (DDT) 経路を獲得してきた。DDT 経路は複数のユビキチン関連タンパク質によって促進され、DNA 損傷を乗り越えることで複製阻害を解消する。DDT 経路は複製阻害の解消に働く一方で、突然変異を誘発するメカニズムとしての側面も持っており、その働きは厳密に制御されなければならない。さらに、複製阻害の解消には相同組換え (HR) 経路も関与しているため、DDT 経路と HR 経路がどのように使い分けられているのか、もしくは、どのように協調して働くのかなど、その制御機構の実態は不明である。これに加えて、真核生物の DNA はヒストン 8 量体に巻き付いたヌクレオソームを形成し、さらにクロマチン構造を形成している。このような構造は複製阻害解消の際に障害となる一方で、複製阻害の解消メカニズムやその経路選択に関与している可能性がある。本研究では、DNA 損傷トレランス経路の制御機構の解明を目的とし、①DDT 経路における新しい制御メカニズムについて、②ヌクレオソームによる DDT 経路の制御メカニズムについて解析を行った。

#### ①DDT 経路における新しい制御メカニズムの解析

本研究では、DDT 経路に関与するタンパク質について新規の翻訳後修飾の検出を試みた。出芽酵母の DDT 関連タンパク質に Myc または Flag タグを導入することで、検出系を構築した。また、リン酸化特異的に結合する Phos-tag 分子を用いて SDS-PAGE を行うことで、SDS-PAGE では検出できないリン酸化の検出を行った。その結果、Rad51 において Phos-tag

依存的なシフトアップが検出された。このシフトアップは脱リン酸化酵素で処理することで消失したことから、リン酸化であると結論づけた。部分欠失変異体やアミノ酸置換変異体の解析から、Rad5 のリン酸化がアミノ酸 129 番目と 130 番目のセリン残基で起こることが分かった。さらに実験を行った結果、(1) Rad5-S130 のリン酸化は S 期に CDK によってリン酸化されること。(2) Rad5 の発現量が S 期に増加し、それに伴いリン酸化レベルが増加すること。(3) リン酸化が起こらない *rad5<sup>S130A</sup>* 変異体ではタンパク質量の変動が見られないこと。さらに、(4) 非リン酸化型 Rad5 と比べてリン酸化型 Rad5 の半減期が短いことを明らかにした。

以上の結果から、Rad5 のリン酸化は Rad5 の量的変動に関与していると考えられる。一方で、Rad5 の非リン酸化変異体は DNA 損傷剤に対して感受性を示さなかった。これは Rad5 のリン酸化が DNA 損傷剤に依存しないことと一致している。しかしながら、Rad5 の過剰発現によって複製ストレスが上昇するという報告があることから、Rad5-S130 のリン酸化が完全になくなった場合、タンパク質量の制御が破綻することで、特定のストレス条件下や特定の細胞周期、または複合的な条件で Rad5 が有害なレベルに蓄積すると、ゲノムの完全性や細胞の生存に有害となる可能性がある。

## ②ヌクレオソームによる DDT 経路の制御メカニズムの解析

本研究では、ヌクレオソームによる DDT 経路の制御メカニズムについて明らかにするため、複製ストレスに影響を及ぼすヒストン変異体の単離と解析を行った。出芽酵母のヒストン H3/H4 のアミノ酸置換変異体コレクションを用いて、DDT 経路を欠損した *rad18* 欠損細胞と掛け合わせ、*rad18Δ* ヒストン 2 重変異体コレクションを作製した。333 株の *rad18Δ* ヒストン 2 重変異体を用いた DNA 損傷剤に対する感受性スクリーニングの結果、*rad18* 単独欠損株よりも感受性を示した株が 49 種類、耐性を示した株が 6 種類得られた。これら 6 種類のヒストン変異箇所は全てヌクレオソームの表面に位置しており、特に H3<sup>R69</sup>、H3<sup>E73</sup>、H4<sup>N25</sup> については側鎖間の相互作用が可能な距離に存在し、DNA との接触も可能な場所に位置していた。耐性を獲得する変異が密接した領域に存在することから、これらは同一のメカニズムで耐性を獲得していると考えられる。そこで、この領域を SDD (Suppressor of DNA damage tolerance defect) 領域と名付け、SDD 変異体に対する遺伝学的な解析を行った。その結果、SDD 変異体は DDT 経路欠損時に HR 経路の活性化によって耐性を獲得することが分かった。遺伝学的な相互作用解析に加え、PCNA のユビキチン化修飾や突然変異及び組換え頻度の測定などから、(1) SDD 変異体は HR 経路の活性化だけでなく、DDT 活性の低下を引き起こしており、ヒストン SDD 領域が DDT 経路の活性促進に関与していることを明らかにした。それに加えて、いくつかのクロマチンリモデリング因子との相互作用解析から、(2) SDD 変異体による HR 経路の活性化は Ino80 クロマチンリモデリング複合体に依存して起こることを明らかにした。

ヒストン SDD 領域は、DDT 経路の活性化及び、Ino80 複合体を介した DDT 経路と HR 経路の制御を担うヌクレオソーム機能において重要な役割を果たしていることが明らかになった。特に、SDD 変異体では、Ino80 のクロマチンへの結合が増加し、INO80 を欠損した場合は DNA 損傷に対して非常に高い感受性を示す。以上の結果から、SDD 領域は複製ストレス下

において、INO80 複合体に依存せずに複製阻害の解消メカニズムを促進できる可能性があると考えられる。