

## 論文審査の要旨及び担当者

### 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

### 論文審査の要旨

#### 1. 論文の要旨

生物の DNA は紫外線、電離放射線などの外的要因、活性酸素などの内的要因によって常に損傷を受けている。そのため生物は、これらの DNA 損傷に対する様々な修復機構を進化の過程で獲得してきている。しかしながら、DNA 損傷はゲノム上にランダムかつ細胞周期非依存的に起こるため、S 期 (DNA 合成期) において生じた DNA 損傷の一部は、DNA 複製の進行阻害 (複製ストレス) を引き起こすことが知られている。DNA 複製ストレスはゲノム不安定性を誘発する原因となるため、生物はこれを回避するために、DNA の傷を乗り越え、複製阻害の解消を行う DNA 損傷トレランス (DNA damage tolerance; DDT) 経路と呼ばれるメカニズムを持っている。DDT 経路は、単細胞真核生物である酵母からヒトを含む高等真核生物まで高度に保存されている。DDT 経路には複数のユビキチン化修飾関連タンパク質が関与し、大きく、損傷乗り越え合成とテンプレートスイッチの 2 つの経路に分類され、これらは、DNA 複製ポリメラーゼ複合体に含まれる PCNA と呼ばれる DNA クランプタンパク質のユビキチン化修飾によって制御されている。また、これとは別に、DDT 経路では解消できない場合や DDT 経路が機能しない場合に DNA 相同組換え (homologous recombination; HR) 経路が複製阻害の解消に働くことが知られている。このように、DDT 及び HR 経路は複製の完了を保証する一方で、突然変異を引き起こす原因となるため、DDT 経路自身の制御及び DDT と HR 間の制御はゲノム安定性維持に極めて重要である。しかしながら、これらの制御メカニズムについては、不明な点が数多く残されている。

本論文提出者は、DNA 複製ストレス応答の制御メカニズムを明らかにするために、①DDT 経路における新しい制御メカニズムの解明と、②ヌクレオソームによる複製阻害の解消メカニズムの解明の 2 つの研究テーマについて研究を行なった。①では、DDT 経路関連タンパク質の新規翻訳後修飾の探索を行なった結果、DDT 経路のテンプレートスイッチに関与する Rad5 タンパク質がリン酸化修飾されることを発見し、リン酸化修飾が Rad5 タンパク質量の安定性制御に重要な役割を果たしていることを明らかにした。②では、染色体 (クロマチン) 構造の基本単位となるヌクレオソーム構造が DDT 経路に及ぼす影響を明らかにするために、ヌクレオソームを構成するヒストン変異体を用いた大規模スクリーニングによる解析を行った。その結果、ヒストン H3 とヒストン H4 間の特定の相互作用領域が DDT と HR による複製阻害解消メカニズムの経路選択に関与することを発見し、複製ス

トレス応答における新しいクロマチン制御メカニズムに繋がる成果を明らかにした。

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・考察」により構成されており、第三章は、第一部「DDT 経路における新しい制御メカニズムの解析」、第二部「ヌクレオソームによる DDT 経路の制御メカニズムの解析」によって構成されている。

第三章、第一部では、Rad5 のリン酸化修飾の発見とその意義について述べられている。DDT 経路の制御メカニズムは PCNA のユビキチン化修飾についてよく研究されているが、その他の翻訳後修飾や制御に関する報告は少ない。そこで、本論文提出者は、エピトープタグを付加した DDT 経路関連タンパク質を発現する細胞株を構築し、SDS-PAGE 及びウエスタンブロットによる各タンパク質の検出及び翻訳後修飾の同定を行った。さらに、リン酸に特異的に結合する Phos-tag 分子を用いて、通常の SDS-PAGE 法では検出できないリン酸化修飾タンパク質の同定を試みた。その結果、DDT 経路で働く Rad5 タンパク質に新規のリン酸化修飾を発見した。さらに、部分欠失変異体やアミノ酸置換変異体の解析から、Rad5 のリン酸化部位が 129 番目と 130 番目のセリン残基に起こることを明らかにした。一方で、Rad5 の非リン酸化変異体は DNA 損傷剤に対して野生型と同程度の感受性を示したことから、このリン酸化修飾が複製阻害の解消に直接影響するものではないことが示唆された。そこで本論文提出者は、Rad5 タンパク質量が細胞周期依存的に変化する点に着目した。過去の研究から、Rad5 のタンパク質は G1 期から S 期にかけて発現量が増加し、その後 G2、M 期で減少することが示されている。今回、本論文提出者は、リン酸化型及び非リン酸化型 Rad5 発現量の変動パターンについて解析した結果、リン酸化型 Rad5 は細胞周期依存的な変化が観察された一方で、非リン酸化型 Rad5 は細胞周期を通じて一定であることを発見した。これに一致して、Rad5 非リン酸化変異体では細胞周期依存的なタンパク質量の変化が起こらないことを明らかにした。さらに、Rad5 タンパク質の安定性について調べた結果、リン酸化型 Rad5 が非リン酸化型 Rad5 よりも分解速度が速く、Rad5 の分解がリン酸化修飾によって促進されることを明らかにした。このことは、細胞周期依存的な Rad5 タンパク質量の変化がリン酸化修飾によって制御されていることを示しており、S 期で機能する DDT 経路の新しい制御メカニズムを発見した点に大きな意義がある。

第三章、第二部では、ヌクレオソームによる複製ストレス応答の制御メカニズムについて述べられている。真核生物の DNA は、主に 4 種類からなるヒストンタンパク質に巻き付いたヌクレオソーム構造を基本単位とし、他のタンパク質と共にクロマチン構造を形成している。また、細胞分裂期においては、クロマチンはさらに凝集した染色体を形成する。このような構造体は、長鎖 DNA を核内に収納し正しく娘細胞に分配する点において重要である一方で、DNA 損傷や複製ストレス応答の際にはむしろ障害になると考えられている。実際、最近の研究から、ヒストンの翻訳後修飾やクロマチンリモデラーによるヌクレオソーム構造の変化が DNA 損傷応答経路の促進に関与していることが報告されている。そこで本論文提出者は、ヌクレオソームと複製ストレス応答の関係性を明らかにすることを目的として研究を行なった。まず、ヒストン H3、H4 の変異体コレクションと DDT 欠損株 (*rad18Δ* 株) を掛け合わせ、二重変異株コレクションを作製し、DNA 損傷剤に対する感受性スクリーニングを行った。その結果、*rad18Δ* 株と比較して、さらに高感受性を示す 49 のヒストン変異と、耐性を示す 6 つのヒストン変異を単離・同定した。構造解析の結果から、耐性を示す 6 つのヒストン変異体の変異箇所は、全てヌクレオソームの表面で互いに近接した位置に存在し、特に、H3<sup>R69</sup>、H3<sup>E73</sup>、H4<sup>N25</sup> の 3 つのアミノ酸残基は側鎖間相互作用が可能な位置にあることが示された。本論文提出者は、これ

ら3つの残基が同じメカニズムで耐性を獲得していると考え、この領域を SDD (Suppressor of DNA damage tolerance defect) 領域と名付けた。遺伝学的な解析から、DDT 経路欠損時のヒストン SDD 変異による耐性獲得は HR 経路の促進に依存していることを明らかにした。さらに、ヒストン SDD 変異体の解析から、SDD 変異は HR 活性を促進するだけでなく、DDT 活性の低下も引き起こすことが観察されたことから、SDD 領域が DDT 経路と HR 経路の経路選択に重要であることを明らかにした。生物は複数種のクロマチンリモデリング複合体を持っており、それぞれ DNA 複製、転写、損傷応答時にヌクレオソームの構造変化を引き起こすことで各反応の促進に機能している。そこで本論文提出者は、ヒストン SDD 変異が DDT/HR 経路の経路選択の変化を引き起こす原因としてクロマチンリモデラーの働きに着目した。その結果、クロマチンリモデラーの1つである INO80 複合体が SDD 変異体の S 期の進行において重要な役割を果たしており、INO80 を欠損した場合、SDD 変異によって促進される HR 経路に異常が起こることを明らかにした。このことは、ヒストン SDD が INO80 複合体による DDT/HR 経路の経路選択において重要な役割を果たしていることを示している。

本論文提出者は、DDT 経路で働く Rad5 タンパク質が S 期にリン酸化修飾を受けることを発見し、そのリン酸化修飾が Rad5 のタンパク質量の制御に関与していることを明らかにした。Rad5 の過剰発現は DNA 損傷剤に対して高感受性を示すことから、Rad5 のリン酸化修飾は複製ストレス応答の厳密な制御に関与する可能性があり、今後の DDT 経路の制御機構の解明に繋がる重要な成果である。また、ヒストン変異体を用いたスクリーニングと遺伝学的な解析によって、ヒストン SDD 領域が複製阻害の解消に機能する DDT/HR 経路の経路選択に重要であることを発見した。今回の研究は、これまで DNA 複製ストレス応答において障害になると考えられていたヌクレオソーム構造がむしろ DDT/HR 経路の経路選択において積極的な役割を果たしていることや、クロマチンリモデラーを制御するヌクレオソーム領域を同定したことなど、従来知られていなかったヌクレオソームの働きを明らかに点において高く評価できる内容である。また、SDD 領域のアミノ酸残基は酵母からヒトまで高度に保存されていることから、本研究から得られる知見は、ヒトのがん研究を含めたゲノム安定性維持に関わる生命科学分野に極めてインパクトを与えるものである。

## 2. 審査の方法、内容の評価、結論

本論文は、令和1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2年1月16日午後3時から学習院大学理学部南7号館9階セミナー室で公聴会を開催し、当該論文の内容およびこれに関する DNA 複製、組換え、修復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、学位申請者である林匡史君の学力について詳細に審査した。

本論文は、DNA 複製ストレスの解消に関与する DNA 損傷トレランス経路で働く Rad5 のリン酸化修飾を介した新たな制御メカニズムの解明と、染色体の基本単位となるヌクレオソーム構造が複製ストレス応答の制御に重要な働きをすることを明らかにした。これらの結果は、DNA 損傷による突然変異の誘発メカニズムの解明に繋がる重要な発見であり、ヒトのがん研究への応用も期待できる成果である。

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、本学位申請者に博士（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  
小島修一 教授