The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Functional analysis of a F-box DNA helicase, Fbh1, in the homologous recombination repair in Schizosaccharomyces pombe
Author(s)	坂口, 周子
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48792
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【51】

氏　　名	坂　口　周　子（さか　ぐち　ちか　こ）
博士の専攻分野の名称	博　士（理　学）
学　位　記　番　号	第　２１７６６　号
学位授与年月日	平成 20 年３月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 理学研究科生物科学専攻
学　位　論　文　名	Functional analysis of a F-box DNA helicase, Fbh1, in the homologous recombination repair in *Schizosaccharomyces pombe* （DNA 組換え修復に関与する分裂酵母 F-box DNA ヘリケース Fbh1 の解析）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　岡田　雅人 （副査） 教　授　安永　照雄　　教　授　篠原　　彰　　准教授　菱田　　卓

論　文　内　容　の　要　旨

本研究室では、DNA 相同組換えに関与する新規遺伝子を同定するため、分裂酵母において、γ線感受性及び、DNA 複製に関与する *rad2*遺伝子の欠失株との合成致死性を指標に、組換えに関与する変異株を単離し解析を行ってきた。これらのうちのひとつの原因遺伝子をクローン化したところ、F-box DNA ヘリケースをコードする *fbh1* 遺伝子であった。酵母からヒトにまで保存されたこの Fbh1 タンパク質は、タンパク質のユビキチン化や分解に必要な F-Box モチーフと、二重鎖 DNA を巻き戻す DNA ヘリケースドメインを併せ持つタンパク質であった。そこで、本研究では、*fbh1* の組換え修復における役割について詳細に解析を行った。

*fbh1*Δ株は、相同組換えに中心的役割を果たす *rhp51* の欠失株と同様に DNA 損傷を引き起こす紫外線（UV）、MMS（Methyl Methane Sulfonate）、γ線に感受性である。さらに、*rhp51fbh1* 二重変異株は、*rhp51*Δと同程度の感受性を示した。この結果は、Fbh1 は、Rhp51 依存の組換え修復の経路で働くことを示唆している。これまでの研究から、Rhp51 依存の組換え修復に関与するヘリケースとして Fbh1 の他に、Srs2、Rqh1 ヘリケースが報告されている。そこで、Fbh1 と、これらヘリケースの機能的関係を四分子解析により調べた。*srs2*Δ*rph1*Δと同様に、*fbh1*Δ*srs2*Δ、*fbh1*Δ*rqh1*Δは、合成致死性を示し、この致死性は、組換えに関与する *rhp51* や *rhp57* の欠失によって抑圧された。これらの結果より、Fbh1 も Srs2、Rqh1 同様、組換えの制御に関与していると考えられる。Fbh1 タンパク質は、ユビキチンライゲース E3 の一種である SCF 複合体を形成するのに必要な F-box モチーフと、DNA ヘリケースモチーフを併せ持つユニークなタンパク質である。そこで、DNA 修復における各ドメインの機能を調べるため、Fbh1 タンパク質の各ドメイン（F-box、Helicase）にアミノ酸置換を導入した変異株を作製した。初めに各変異株における、DNA 損傷依存のフォーカス形成や薬剤感受性を調べた。ヘリケースモチーフ変異体は、野生型に比べフォーカス形成の割合が上昇したのに対し、F-box 変異体は、MMS 処理をしてもフォーカスが全く形成されなかった。また、F-box 変異株は、*fbh1*Δと同程度の MMS 感受性を示し、ヘリケース変異株は *fbh1*Δよりさらに強い MMS 感受性を示した。しかし、F-box をさらに欠失させた F-box/ヘリケース二重変体では、このヘリケース変異株の MMS 高感受性が抑圧された。これらの結果は、DNA 修復において、Fbh1 の機能には、ヘリケースモチーフ、F-box モチーフが独立して機能することを示している。さらにこの結果は、DNA 損傷部位への局在には F-box ドメインが重要

であり、ヘリケースドメインは、その後の修復に重要であることを示唆している。

以上の結果から、Fbh1 は、Srs2 や Rqh1 と同様に組換え経路において、Rhp51 依存の DNA 鎖交換反応後の組換え中間体のプロセシングに関与しており、その機能は、DNA 損傷に応答して、SCF^{Fbh1} 複合体として、DNA 損傷部位に局在化し、その後、ヘリケースモチーフの機能により損傷部位のプロセシングを行っていると考えられる。

論文審査の結果の要旨

分裂酵母 Fbh1 は、DNA 相同組換え修復に関与する新親タンパク質で、その構造は、N 末の SCF（Skp1-Cullin-F-box）と呼ばれる E3 ユビキチンリガーゼ複合体形成に関与する F-box ドメインと、C 末に DNA 二重鎖を巻き戻す活性を持つ DNA ヘリケースドメインを合わせ持つユニークなタンパク質である。本研究は、この Fbh1 が持つ２つのドメインにそれぞれ変異を持つ *fbh1* 変異体を詳細に解析することで、各ドメインの DNA 相同組換え経路における役割を明らかにしている。その結果、F-box ドメインは、実際に SCF 複合体形成に必須であり、この複合体形成が核移行および DNA 損傷部位へのリクルートに重要な役割を果たしており、一方、DNA ヘリケース活性は、Rhp51 によって形成される組換え中間体のプロセッシングに機能していることを明らかにした。このように、今回の坂口氏の研究は、ヒトまで保存された Fbh1 の構造と機能の相関関係について新たな知見を与えるものであり、よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。