

Title	Fork regression pathway in human cells : the 6-4 photoproduct induces chickenfoot intermediates in an in vitro DNA replication system
Author(s)	菅野, 毅治
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49291
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	菅野 毅 治
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 22198 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 生命機能研究科生命機能専攻
学位論文名	Fork regression pathway in human cells : the 6-4 photoproduct induces chickenfoot intermediates in an <i>in vitro</i> DNA replication system (ヒト細胞における複製フォーク後退機構 : <i>in vitro</i> DNA 複製系において 6-4 光産物はチキンフット型複製中間体を誘発する)
論文審査委員	(主査) 教授 花岡 文雄 (副査) 教授 田中亀代次 教授 升方 久夫

論文内容の要旨

The fork regression pathway, one of the post-replication repair pathways, induces chickenfoot intermediates ; however, the existence of this pathway in mammals has not been elucidated to date. In order to investigate whether chickenfoot intermediates are produced by mammalian cells, I employed an *in vitro* DNA replication system composed of UV-induced lesion-containing DNA templates and human cell-free extracts. Two-dimensional agarose gel (2D gel) electrophoretic analyses showed that some abnormal replication intermediates accumulated in the presence of DNA damage. Furthermore, I used atomic force microscopy to identify chickenfoot-like DNA structures in the replication products of 6-4 photoproduct containing templates, but not of the cyclobutane pyrimidine dimers. These results suggest that the fork regression pathway may contribute to damage tolerance, in particular for 6-4 photoproducts, in mammalian cells.

I also examined effects of RecQ helicases, BLM, WRN and RECQ β that have been predicted to promote fork regression pathway by 2D gel electrophoretic analyses. As a result, RecQ helicases decreased X-shaped and double-Y molecules that derived from two converged replication forks. These results imply a possibility that RecQ helicases have critical roles for decatenation of replicating DNA at least in the *in vitro* DNA replication system.

論文審査の結果の要旨

チキンフット型 DNA の形成を特徴とする複製フォーク後退機構は、ゲノムの安定性保持に深く関与すると考えられているが、高等真核生物ではその存在すら明らかではない。申請者は、2D ゲル電気泳動法によって、ヒト細胞抽出液を用いた無細胞 DNA 複製系において、紫外線 DNA 損傷が複数種の異常な構造の複製中間体を誘発することを明らかにした。また原子間力顕微鏡によってチキンフット型 DNA の検出に成功した。これにより、高等真核生物に

おける複製フォーク後退機構の存在が強く示唆された。

次に、複製フォーク後退機構で重要な役割を担うと考えられている RegQ ヘリケースの WRN、BLM、RECQ5 β の組換えタンパク質を発現・精製し、これらが複製中間体に与える影響を 2D ゲル電気泳動法によって解析した。その結果、これらのタンパク質は複製フォーク後退機構を活性化しないが、複製に伴う DNA のねじれの解消を促進しているという新しい知見を得た。

これらの研究は学術的に十分な価値があり、理学博士の学位に値すると考える。