

Title	Cyclin-dependent protein kinase regulates the repair mode of non-homologous end joining through the phosphorylation of Lif1 protein in budding yeast
Author(s)	松寄, 健一郎
Citation	大阪大学, 2010, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58581
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について 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

【10】	
氏 名	松 壽 健 一 郎
博士の専攻分野の名称	博 士（理 学）
学 位 記 番 号	第 2 4 1 6 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 22 年 9 月 22 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	Cyclin-dependent protein kinase regulates the repair mode of non-homologous end joining through the phosphorylation of Lif1 protein in budding yeast (CDKによる非相同末端結合の新規制御メカニズム解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 篠 原 彰 (副査) 教 授 滝澤 温彦 教 授 升方 久夫 准教授 菱田 卓 准教授 篠原 美紀

論文内容の要旨

DNA二重鎖切断(DSB)は、両鎖の遺伝情報を同時に失うことから、最も重いDNA損傷の一つとされている。DSBが修復されなかった場合、染色体一部の欠失などの染色体不安定化を引き起こす。これを防ぐため、細胞は、非相同末端結合(NHEJ)と相同組み換え(HR)という2つの独立したDSB修復経路を備えている。HRは姉妹染色体を鋳型とし、遺伝子変換によりDSBを修復する。このため、修復産物は元通りの正確なDNA配列になる。一方、NHEJでは、切断されたDNA切断末端同士を近付け、DNAリガーゼにより直接繋ぐことでDSBを修復する。NHEJの経路では、正確に修復されたものと、変異を伴ったものが見られる。このことから、NHEJ経路の中には正確な修復と不正確な修復の2種類があると考えられている。不正確なNHEJの修復産物では、DSB末端の数bpの欠失と共に修復部位に数bpの相同領域が存在する。修復産物の特徴は分かっているものの、この正確なNHEJと不正確なNHEJの分子メカニズムや制御機構については不明である。

今回、我々はNHEJ因子の一つ、Lif1のリン酸化を通したNHEJの制御機構を発見した。今回の解析の結果、Lif1がリン酸化タンパク質であることを見だし、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)により直接リン酸化されていることも明らかにした。リン酸化部位を特定し、Lif1の非リン酸化型変異株(*lif1-CDKd*株)を作製し、その機能を調べたところ、*lif1-CDKd*株では、NHEJの活性が低下することが分かった。特に、不正確なNHEJに欠損を持つことが分かった。さらに、修復産物のDNA配列を見ると、修復部位での欠失の長さが低下していた。この結果は、DSB末端の削り込みの段階に欠損をもつ可能性を示している。実際に調べてみると、*lif1-CDKd*株では、DSB末端の削り込みが遅れることが分かった。また、Lif1が削り込み因子であるSae2と物理的に相互作用しており、この相互作用がDSB末端の削り込みに必要であることも分かった。

これらの結果は、Lif1がCDKによりリン酸化されることで、削り込み因子を介してDSB末端の状態を変えていると考えられる。そして、この削り込みにより、正確なNHEJ経路と不正確なNHEJ経路が、細胞周期依存的に切り替えられていることを示唆している。

論文審査の結果の要旨

DNAの2重鎖切断は相同組換えと非相同末端結合により修復されることでゲノムの安定化に寄与している。これら2つの修復経路は、細胞周期に依存して経路選択が行われていると考えられているがその具体的な制御メカニズムは不明であった。

申請者は、DNA二重鎖切断修復に中心的な機能を果たすMre11-Xrs2-Rad50(MRX)複合体と非相同末端結合因子Lif1の間の相互作用を見だし、いままで不明であった非相同末端結合におけるMRX複合体の機能を明らかにした。

さらに、細胞周期依存的にサイクリン依存性キナーゼによって、非相同末端結合因子Lif1がリン酸化を受けることを見だし、そのリン酸化のDNA二重鎖切断修復における機能を明らかにするために解析を行った。その結果、Lif1のリン酸化が細胞周期のS/G2期に特徴的なDSB末端の単鎖化というDSB末端の形状を必要とする、非相同末端結合の一つの経路に必要なことを明らかにした。また、さらにDSB末端の単鎖化に関わるエンドヌクレアーゼSae2タンパク質との物理的相互作用を新たに見だし、その相互作用がDSB末端の単鎖化制御に必要な可能性について示した。この結果は、相同組換えの修復中間体であるDSB末端の単鎖化の制御に非相同末端結合因子が関わりさらに、相同組換えの中間体から、NHEJによって修復する新規経路の分子メカニズムを新たに示しその活性調節に細胞周期制御因子が直接関わることを明らかにした。

この結果から、細胞周期とDNA二重鎖切断修復のコーディネーション機構および相同組換え

と非相同末端結合のコーディネーション機構を理解する上で重要な知見が得られた。

本申請研究により、非相同組換えについての新しい制御の仕組みを明らかにでき、今後の当該分野での研究の発展も期待できる。

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。