



Title	Analysis of a Novel DNA Repair Pathway for O6-methylguanine Focused on an Alkyltransferase-like Protein
Author(s)	森田, 理日斗
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58608
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 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 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

氏名	もり た り ひ と 森 田 理 日 斗
博士の専攻分野の名称	博 士 (理 学)
学位記番号	第 2 4 3 4 2 号
学位授与年月日	平成 23 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	Analysis of a Novel DNA Repair Pathway for O^6 -methylguanine Focused on an Alkyltransferase-like Protein (アルキル基転移酵素様タンパク質に着目した新規 O^6 -メチルグアニン傷害修復経路の解析)
論文審査委員	(主査) 教 授 倉 光 成 紀 (副査) 教 授 金 澤 浩 教 授 米 崎 哲 朗 准 教 授 増 井 良 治

論 文 内 容 の 要 旨

背景と目的

DNA のメチル化は全ての生物種において生じる現象であり、様々な生命現象に利用されている。しかし、DNA は予期せぬメチル化を受けることも知られている。高度好熱菌 *Thermus thermophilus* HB8 ゲノムには五つの DNA メチル化酵素が推定されている。このうち TTHA0409 については私の構造解析によって N^4 -meC 特異的であることが推定できたが、他の多くは基質特異性もわかっていない。これらがメチル化傷害の発生に関わっている可能性も考えられる。

Ogt はその活性部位に高度に保存されたシステイン残基 (P_{CH}R) が存在し、そこへ強い細胞毒性をもつ O^6 -メチルグアニン (O^6 -meG) のアルキル基を不可逆的に転移させることにより直接的に O^6 -meG 傷害をグアニンへ修復する。しかし、Ogt と高い配列類似性を示すにも関わらず、活性部位のシステイン残基が他の残基に置換された配列 (P_XHR) を持つ、alkyltransferase-like (ATL) タンパク質の存在が近年明らかとなった。高度好熱菌は Ogt を持たず ATL タンパク質のみを持つことから、その機能解析に都合がよいと考えられる。そこで私は、高度好熱菌由来 ATL タンパク質に着目して、その機能と、新規 O^6 -meG 傷害修復経路の解明を目指して研究を行った。

結果と考察

高度好熱菌由来 ATL タンパク質である TTHA1564 の機能解析を行った。メチル基転移活性を調べたところ、ATL タンパク質単独では DNA 中の O^6 -meG からのメチル基転移活性を示さなかったが TTHA1564 は DNA 結合能を示し、さらに O^6 -meG を含む DNA 特異的に結合することがわかった。また、*ttha1564* 遺伝子欠損株を作成し、その性質を調べたところ、*Attha1564* 株は野生株に比べ高い変異率を示した。以上から、TTHA1564 は他の修復系を駆動するセンサーとして働く仮説を立て、TTHA1564 と相互作用するタンパク質を探索するために、プルダウンアッセイを行った。その結果、TTHA1564 は UvrA や RNA ポリメラーゼを含む数十種類のタンパク質と相互作用することが示された。そこで、NER *in vitro* での再構成系を構築した。

UvrABC は O^6 -meG を含む DNA を切断せず、その系に TTHA1564 を加えても結果は変わらなかった。フルオロセイン-dT を含む DNA を基質として用いた場合は、UvrABC により切断が見られたが、TTHA1564 を添加すると NER 活性を阻害した。

しかし、*Δttha1564*、*ΔuvrA*、*ΔuvrAΔttha1564* 二重欠損株のアルキル化剤による変異率を調べたところ、TTHA1564 は NER と同経路で働いていることが示唆された。野生株、*Δttha1564*、*ΔuvrA* 中の O^6 -meG の量を調べたところ、どちらの欠損株においても野生株に比べて有意に高い蓄積が見られたため、UvrA も TTHA1564 も O^6 -meG の修復に関与していることが示唆された。

Δttha1564 について DNA マイクロアレイ解析を行ったところ、アルキル化剤 MNNG 存在下での *uvrB* と *uvrC* 遺伝子の発現上昇が TTHA1564 に依存することがわかった。以上のことから、TTHA1564 は NER タンパク質の発現上昇によって、本来効率の低い NER による O^6 -meG 修復の効率を上昇させていると考えられた。ATL タンパク質は直接傷害修復に関与しつつ、他の修復系酵素の発現調節にも関わる新規のタンパク質であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

生物は、DNAや蛋白質などの様々な生体分子の機能を、メチル化によって調節するとともに、副反応で生じるメチル基を除去するシステムも備えている。申請者は、高度好熱菌 *Thermus thermophilus* をモデル生物として、O6-methylguanine methyltransferase (Ogt) のホモログと推定されていたTTHA1564蛋白質が、メチル基転移活性は持たないが O6-メチルグアニンを含む DNA に特異的に結合することを示した。さらに、このTTHA1564蛋白質の遺伝子を破壊した高度好熱菌では、野生株よりも O6-meG の量が多くなることも示した。つまり、このTTHA1564蛋白質が O6-meG の修復に関与していることを示した。

次に、申請者は、このTTHA1564蛋白質がヌクレオチド除去修復系の UvrA と強く結合することも発見した。ヌクレオチド除去修復系を試験管内で再構成して、TTHA1564蛋白質の関与を解析したところ、TTHA1564蛋白質以外にもヌクレオチド除去修復系に関与する蛋白質の存在が、強く示唆された。

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。