

Title	Study of the role of the Proliferating Cell Nuclear Antigen replication clamp in strand-specific correction of mismatched base pairs by the eukaryotic mismatch repair system
Author(s)	河添, 好孝
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59525
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

論文内容の要旨

氏名 (河添 好孝)

論文題名

Study of the role of the Proliferating Cell Nuclear Antigen replication clamp in strand-specific correction of mismatched base pairs by the eukaryotic mismatch repair system

(PCNA複製クランプが真核生物ミスマッチ修復機構による鎖特異的修復に果たす役割に関する研究)

論文内容の要旨

染色体DNAの正確な複製は、種や個体の維持、発がんの抑制に必須である。DNA複製の正確性は、DNAポリメラーゼの塩基選択の正確性に加え、ミスマッチ修復 (MMR) 機構が合成エラーを修復することで維持される。MMR機構は、原核生物から真核生物まで広く保存されたDNA修復機構である。その特徴は、エラーを含む新生DNA鎖を特異的に修復することであるが、真核生物MMR機構が修復の鎖特異性を決定し、保持するメカニズムは未だに明らかではない。

真核生物の新生鎖識別反応は、MutS α / β 複合体が合成エラーを認識することで開始する。次に、MutS α / β はMutL α エンドヌクレアーゼをDNA上に呼び込み、新生鎖の識別シグナルを探索する。これまでの解析から、DNA複製の中間体として生じる一本鎖断点 (gap/nick) がシグナルとして機能することが分かっている。加えて、DNA複製に必須の因子であるPCNAスライディングクランプも、鎖特異性を生み出しうる候補として考えられてきた。PCNAは、RFC複合体によってDNA合成の方向と一致した方向でDNAに結合する。PCNAは、新生鎖を特異的に切断するMutL α とも相互作用し、MutL α の活性化に関わる。しかしながら、PCNAのDNA結合がMMRの鎖特異性を決定するかどうかは実験的に確かめられていない。さらに、PCNAはElg1複合体によってDNA合成完了後にDNAからアンロードされるため、DNA合成完了後、真核生物MMRがどのようにして修復の鎖特異性を保持するかについてもほとんど分かっていない。

私は、これら問題を解明するため、試験管内でDNA合成と協調したMMRを効率よく引き起こすツメガエル卵核質抽出液 (NPE) を実験系として用いた。当研究室の解析により、NPEはDNA合成反応とMutS、MutL、gapに依存したMMRを効率よく引き起こすことが明らかとなっている。私は、鎖特異的なMMRが、DNA合成の完了後も可能であることを発見した。さらに、PCNAの結合したミスマッチDNAを試験管内で再構成してNPEに加えたところ、PCNAのDNA結合の方向性と一致した鎖特異的なMMRが観察された。以上の結果は、PCNAのDNA結合の方向性によって修復の鎖特異性が決められていることを示す。興味深いことに、NPE中でのPCNAのDNAからのアンローディングは、DNA上にミスマッチがあるときには非常に遅くなり、PCNAのアンローディングの阻害はMutS α のPIP-motifに依存していた。これと対応して、NPE中での鎖特異的なMMR活性はPCNAのDNA上の残存量とよく一致しており、gapによって引き起こされるMMR活性もMutS α によって保持された。以上の結果は、MutS α はgap部位からDNAにロードされるPCNAとの相互作用を介して、PCNAのDNAからの解離を阻害し、修復の鎖特異性を保持することを示す。さらに、MutSとPCNAの相互作用とPCNAアンローダー-Elg1との遺伝的関係性について出芽酵母を用いて解析すると、生体内においても、PCNAをDNA上に残存させることがMMRの効率の維持に重要であることを示唆するデータが得られた。これまでの結果は、真核生物MMRにおいてはPCNAがDNA合成後も新生鎖の識別を可能にする分子であり、MutS α はPCNAとの相互作用を介してPCNAのDNAからの解離を阻害し、DNA複製後のMMR可能な時間を延長することで、DNA複製の正確性に大きく貢献することを強く示唆する。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (河 添 好 孝)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	升 方 久 夫
	副 査	教 授	滝 澤 温 彦
	副 査	教 授	篠 原 彰
	副 査	教 授	平 岡 泰
	副 査	助 教	高 橋 達 郎
論文審査の結果の要旨			
<p>細胞が分裂して増殖する過程において、遺伝子情報を担う染色体 DNA を正確に 1 回だけ複製し娘細胞に均等に分配することが生命の継承に必須である。ミスマッチ修復 (Mismatch reparaire; MMR) は、DNA 複製や相同組換えの過程で遺伝情報の正確性を維持する意義を持つ進化的に保存されたしくみである。DNA 複製では、間違っ塩基が取り込まれた複製エラーが突然変異として固定される前に MMR により正しく修復することは、遺伝情報の正確さを 10^3 程度向上させる。MMR 機能の不全による自然突然変異の蓄積がガン発生頻度を著しく増加させることから、MMR のしくみを明らかにすることはヒトの健康と医療にきわめて重要である。複製エラー修復において、複製エラーを含む新生 DNA 鎖をいかにして識別するかが重要な課題である。真核生物では、新生鎖に存在し鋳型鎖に存在しない DNA の切れ目 (nick や gap) が識別に必要であるとされてきた。さらに nick/gap を埋めて繋ぐ過程で DNA を取り囲むように結合するリング状タンパク質複合体 Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) が実際の分子シグナルではないかと推測されてきた。PCNA のリングの両面は異なっており、DNA に結合する方向性が決まっているため、nick/gap が存在した DNA 鎖の方向性を示すことができると考えられるが、実験的証拠は得られていなかった。</p> <p>申請者は、アフリカツメガエル卵抽出液を用いた試験管内反応系で DNA 複製や MMR がきわめて効率的に起きることを利用し、1 塩基のミスマッチをもつ環状二重鎖 DNA の鎖特異的修復には、nick/gap そのものは必要ではなく、DNA 上に PCNA が結合していることが正しい鎖修復に必要十分であることを証明した。さらに、DNA 複製過程で DNA に結合した PCNA は複製反応の終了と共に速やかに DNA 上から解離させられるが、ミスマッチを認識し結合する MutSa タンパク質複合体が PCNA 結合モチーフを介して PCNA と相互作用することにより、DNA からの解離を阻害し、修復可能な時間を複製後にも拡大する機能を持つことを発見した。</p> <p>これらの研究結果を、学術論文” MutSa maintains the mismatch repair capability by inhibiting PCNA unloading”として eLIFE 誌(2016)に発表し、学位論文「PCNA 複製クランプが真核生物ミスマッチ修復機構による鎖特異的修復に果たす役割に関する研究」にまとめた。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分に価値があるものと認める。</p>			