

Title	A study of the mechanism that facilitates eukaryotic DNA mismatch repair to function on chromatin
Author(s)	照井, 利輝
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72176
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

論文内容の要旨

氏名 (照井 利輝)

論文題名

A study of the mechanism that facilitates eukaryotic DNA mismatch repair to function on chromatin
(真核生物のDNAミスマッチ修復がクロマチン上で機能するための機構の研究)

論文内容の要旨

ゲノムDNAの正確な複製は遺伝情報を維持するために重要である。ミスマッチ修復 (MMR) 機構は複製フォークの後ろに取り残されたエラーを修復することで、複製の正確性を高めている。真核生物では、DNA合成エラーはMutS α (Msh2-Msh6) もしくはMutS β (Msh2-Msh3) によって認識される。MutS複合体はリング状の構造をとっており、DNA二重鎖を取り囲むようにDNAに結合する。MutS複合体はミスマッチを認識するとスライディングクランプ様に構造変化し、エンドヌクレアーゼであるMutL α をリクルートする。MutL α のエンドヌクレアーゼ活性は複製に必須のクランプであるPCNAによって活性化され、エラーを含む新生DNA鎖特異的にニックを入れる。MutL α によって切断された鎖はエキソヌクレアーゼなどで分解され、最後に正しい鎖が合成されて修復が完了する。重要なことに真核生物のDNAはヒストン八量体に巻き取られ、ヌクレオソーム構造をとっている。MMRの各ステップはヌクレオソーム構造に強く影響を受けうる。真核生物では、クロマチンリモデリング因子やヒストンシャペロンがヌクレオソームに対処することで、クロマチン上で起きる複製、転写、組み換えといった様々な反応が促進されることが分かっている。しかしながら、MMRに関わるこれらの因子は見つかっておらず、MMRがどのようにクロマチンに対処し修復を行っているのかは分かっていない。

ツメガエル卵核質抽出液 (NPE) は様々な核内で起こる反応を試験管内で再現する事のできる系である。NPEを用いた当研究室の専攻研究により、Msh2依存的にミスマッチをもつDNAのヌクレオソーム形成が阻害されることが示唆されていた。私はマイクロコッカスヌクレアーゼ (MNase) 処理とqPCRを組み合わせた解析を行い、ミスマッチの周辺約1 kbの領域でヌクレオソームが顕著に排除されることを明らかにした。この反応を促進する因子を明らかにするために、Msh2依存的にミスマッチをもつDNAに結合する因子を探索し、クロマチンリモデリング因子Smarcad1を得た。Smarcad1はMsh2依存的にミスマッチをもつDNAに結合しており、Smarcad1の免疫除去により、NPEのヌクレオソーム排除活性が減弱した。これらの結果はSmarcad1がヌクレオソーム排除を促進することを示唆する。さらに、Smarcad1が生体内での複製の正確性に与える寄与を明らかにするために、出芽酵母での突然変異頻度の測定も行い、MutS α もしくはMutS β の片方を欠失させたときに、出芽酵母のSmarcad1ホモログであるFUN30遺伝子を欠失させると著しく変異頻度が上昇することを見出した。この結果はFun30がMutSと協調的に働くことで突然変異頻度を抑制することを示唆する。これらのFun30の変異頻度抑制効果は、DNA合成依存的なヌクレオソーム形成を行うCAF-1を失活させることで緩和された。これらの結果は、MutSがSmarcad1/Fun30をミスマッチ周辺に呼び込むことで、ミスマッチ周辺のヌクレオソーム排除を促進しMMR効率を高めることを示唆している。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (照 井 利 輝)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	小布施 力 史
	副 査	教 授	篠 原 彰
	副 査	招へい教授	原 口 徳 子
	副 査	准教授	高 橋 達 郎 (九州大学大学院理学研究院)
論文審査の結果の要旨			
<p>以下本文</p> <p>ミスマッチ修復 (Mismatch repair; MMR) は DNA 合成後に残されたエラーを修復し、突然変異を抑えている重要な DNA 修復反応である。真核生物の MMR は DNA がヒストン八量体に巻き取られ、クロマチンを形成する状況で機能しなければならない。しかし、裸の DNA 上でのミスマッチ修復反応は、精製タンパク質を用いた再構成が既に成功しているが、クロマチンを形成した DNA 上でのミスマッチ修復反応は再構成が成功しておらず、MMR がクロマチン上で機能するために必要な因子と機構は明らかになっていない。</p> <p>申請者は、クロマチン形成反応を試験管内で非常に効率よく再現できるというツメガエル卵核質抽出液 (NPE) の特性を利用して、ミスマッチ塩基対の周辺で、MMR 機構依存的にヌクレオソームが排除されることを証明した。また、この反応の分子機構の解明に取り組む中で、これまで MMR に関わるものが知られていなかった、クロマチンリモデリング因子 Smarcd1 とヒストンシャペロン FACT が、ミスマッチ塩基対周辺のヌクレオソームの排除を促進することを見出した。さらに、生体内の MMR のモデル系として出芽酵母を用いて突然変異頻度を計測することで、Smarcd1 の酵母のホモログである Fun30 が、MMR 機構と協調して突然変異の抑制を促すことを示した。これらの結果から、申請者は真核生物の MMR 反応が、ミスマッチ周辺のヌクレオソームを排除しながら進行しており、Smarcd1 と FACT がヌクレオソームの排除をすることでクロマチン上の MMR を促進するというモデルを提唱した。</p> <p>提出された学位論文の内容として、データの質、量ともに申し分なく、それらを用いた論理的な構成が適切になされていた。また、自分の行った研究のことのみならず、背景や知識の十分な理解も伺えた。また、学位論文の成果の一部は一流学術誌に掲載されている。</p> <p>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。</p>			