OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Molecular Mechanism and Regulation of Gross Chromosomal Rearrangements
Author(s)	大仲, 惇司
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/77549
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（大仲　惇司）	
論文題名	Molecular Mechanism and Regulation of Gross Chromosomal Rearrangements （染色体再編の分子メカニズムとその制御）

論文内容の要旨

相同組換えは、DNA二本鎖切断などのDNA損傷を修復する。一方、遺伝病や細胞死の原因となる染色体再編（GCR）を引き起こすこともある。そのため、組換え経路を厳密に制御することが重要である。多くの真核生物のセントロメア領域はリピート配列で構成されている。そのため、リピート配列を介した染色体再編が起こり易い。これまでの研究から、セントロメアでは相同組換え因子Rad51の変異により同腕染色体が高頻度で起こることが分かっている。Rad51はRad52によって組換え部位に呼び込まれ、一本鎖DNA上に結合しフィラメント構造を形成する。Rad54はRad51フィラメントを安定化し、相同二本鎖DNAへの相同鎖侵入を促進する。このような経路はsynthesis-dependent strand annealing (SDSA)経路と呼ばれ、元の配列を正確に修復することができる。一方で、Rad52は一本鎖DNAを鋳型にアニーリングするsingle-strand annealing (SSA)による組換えを引き起こすことも知られている。しかしながら、染色体再編の分子メカニズムと組換え制御の関係は明らかではない。

セントロメアで相同組換えがどのように制御されているのかを明らかにするため、染色体再編と染色体再編を伴わないない組換え（gene conversion）におけるRad54の役割を調べた。その結果、Rad51だけでなく、Rad54を欠失させることによっても左右両腕が同じ配列となる同腕染色体形成の頻度が増加した。この結果はRad54のATPase活性の変異でも同様であった。また、Rad54のATPase活性は非交叉型のgene conversionにも必要であった。これらの結果から、Rad54によるSDSA経路を促進することで染色体再編を防ぐと考えられる。

染色体再編がセントロメアで発生するメカニズムを明らかにするために、Rad52が染色体再編に必要かどうかを調べた。*rad52*Δにより染色体再編頻度が増加したが、*rad52*Δ細胞の染色体再編頻度は*rad51*Δ細胞よりも低かった。*rad51*Δと*rad52*Δの染色体再編頻度は*rad51*Δ細胞よりも低かったことから、Rad52を介したSSAがRad51に非依存的に染色体再編を引き起こすと考えられる。このような染色体再編は、Rad52タンパク質の*in vitro*でのSSA活性を失った*rad52-R45K*変異により減少した。また、ミスマッチ修復因子としても知られるMsh2-Msh3は、Rad52を介した染色体再編に働いていることが明らかとなった。染色体再編は相同配列を入れ替える交叉型組換えによって引き起こされる可能性が考えられる。Rad52を介した染色体再編が交叉型組換えによって引き起こされるかを明らかにするために、交叉を促進するエンドヌクレアーゼであるMus81の変異体を用いて染色体再編頻度を測定した。その結果、*rad52-R45K*と*mus81*Δにより*rad51*Δのバックグラウンドで染色体再編が大幅に減少した。これらの結果から、染色体再編はSSAによる相同鎖探索のあと、交叉型組換えによって引き起こされると考えられる。

染色体セントロメア領域においてはRad51依存的組換えのみが引き起こされる。このような組換え経路選択に関わる因子を明らかにするため、Rad52によるSSAを増加させる変異をスクリーニングした。その結果DNAポリメラーゼα（Polα）の変異を単離することができた。興味深いことに、DNA複製時に複製フォークの進行に抑制的に働くSwi1/Tof1/Timelessの変異により、セントロメアでRad52依存的SSAが引き起こされた。これらの結果から、DNA複製因子が一本鎖DNAを抑制してRad52を介したSSAを抑制していると考えられる。よって、セントロメアでのRad52を介したSSAを防ぐことが、染色体再編を防ぐことになると考えられる。これらの研究成果は、染色体異常によって引き起こされる遺伝病の原因や予防法の解明につながると考えられる。また、染色体再編を引き起こす因子が種を通じて保存されていることは、生物の進化の原動力となってるとも考えられる。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（　大仲　惇司　）	
	（職）	氏　名
論文審査担当者	主 査　教授	小布施 力史
	副 査　教授	平岡 泰
	副 査　准教授	古郡 麻子
	副 査　准教授	中川 拓郎
	副 査	

論文審査の結果の要旨

自然発生的に生じる DNA 損傷により染色体再編（異常）が起きることがある。染色体再編は細胞死や癌などの遺伝病などを引き起こす。そのため、厳密に制御される必要がある。相同組換えは相同な DNA 鎖を鋳型に DNA 損傷を修復する。ところが、相同組換え因子 Rad51 を破壊すると、染色体のセントロメア領域にある逆向き反復配列（相同配列）を使った染色体再編が起こり、同腕染色体（染色体腕が同一配列かつ鏡像関係）が高頻度に形成する。このことから、相同組換えには複数の異なる反応経路が存在し、それらの間の相違や選択が染色体の安定維持に重要であると考えられる。

大仲惇司氏は、分裂酵母を用いて Rad51 が染色体再編を抑制する分子メカニズムについて解析した。その結果、（１）Rad51 の DNA 鎖交換反応を促進する Rad54 も同腕染色体の形成を抑制すること、（２）Rad51 と Rad54 は染色体再編を伴わない局所的な遺伝子変換型組換えを促進すること、（３）組換え産物の解析から、セントロメア中央の逆位を伴わない非交叉型組換えを優先的に促進すること、（４）交叉型組換えに働くエンドヌクレアーゼ Mus81 が同腕染色体の形成に必要であることを明らかにした。これらの結果から、染色体のセントロメア領域で Rad51 は Rad54 と共に非交叉型組換えを促進することで、交叉型組換えによる染色体再編を抑制すると考えられる（Onaka et al. 2016 Nucleic Acids Res）。

つぎに、大仲氏は染色体再編の発生機構について解析した。その結果、（１）１本鎖 DNA どうしの single-strand annealing（SSA）を行う Rad52 を破壊すると *rad51* 欠失株で起きる染色体再編が減少すること、（２）DNA 結合領域内の点変異 *rad52-R45K* によっても、*rad52* 完全破壊と同様に、同腕染色体の形成が大きく減少すること、（３）精製タンパク質を用いた生化学実験により、野生型 Rad52 に比べ、Rad52-R45K は SSA 活性が大きく低下することを明らかにした。これらの結果から、Rad52 が SSA 反応を起こすことで染色体再編が生じると考えられる。

通常、セントメアでは、Rad51 依存的組換えが起こり、Rad52 依存的 SSA は抑制されている。こうしたセントロメア特異的な組換え制御に関与する因子をスクリーニングした。その結果、DNA ポリメラーゼαや複製進行の制御因子 Swi1/Tof1 が正常に機能しないと Rad52 依存的 SSA が誘発されることを明らかにした。これらの結果から、DNA 複製時に生成する１本鎖 DNA の有無により、組換え経路が決定される可能性が示唆された（Onaka 2020 Commun Biol）。

大仲氏は、多くの実験結果にもとづいて、Rad51 が染色体再編を抑制する仕組みと、Rad52 が染色体異常を促進する仕組みを明らかにした。また、DNA 複製が組換え経路の決定に関与する可能性を示唆した。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。