

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	DNA修復におけるDNAリン酸化・脱リン酸化酵素PNKPの制御機構
Title(English)	
著者(和文)	塚田海馬
Author(English)	Kaima Tsukada
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11906号, 授与年月日:2021年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:松本 義久,片渕 竜也,鷹尾 康一郎,塚原 剛彦,木村 宏
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11906号, Conferred date:2021/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第		号	学位申請者氏名		塚田 海馬	
		氏名	職名		氏名	職名	
論文審査 審査員	主査	松本 義久	准教授	審査員	木村 宏	教授	
	審査員	片渕 竜也	准教授				
		鷹尾 康一朗	准教授				
		塚原 剛彦	准教授				

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は、「DNA 修復における DNA リン酸化・脱リン酸化酵素 PNKP の制御機構」と題し、全 6 章から構成されている。

第 1 章「序論」では、まず、放射線および抗がん剤を用いたがん治療における DNA 損傷の重要性や、DNA 修復の分子機構に関する現在の知見について述べている。その上で、核酸末端のリン酸化・脱リン酸化活性を持ち、塩基損傷、DNA 一本鎖切断および DNA 二本鎖切断の修復に関わる酵素 Polynucleotide Kinase Phosphatase (以下、PNKP) に着目し、細胞内での PNKP の制御機構を分子・アミノ酸レベルで解明することを本研究の目的とすると述べている。

第 2 章「実験材料と方法」では、本研究における実験材料や方法について述べている。

第 3 章「ライブセルイメージングによる PNKP 細胞内局在制御機構の解析」では、まず、PNKP の FHA 領域、リンカー領域、脱リン酸化触媒領域、リン酸化触媒領域をそれぞれ欠損する変異体と GFP の融合タンパク質を作製し、細胞内局在を観察することにより、リンカー領域が核内への局在に必須であることを示している。次に、リンカー領域内の核内移行シグナル (NLS: nuclear localization signal) 様のアミノ酸モチーフ (アミノ酸 137-142: KKRMK) の欠損変異体 (Δ NLS) およびリジンあるいはアルギニン残基をアラニンに置換した変異体 (K137A, K138A, R139A, R141A, K142A) を作製し、同様の解析を行うことにより、このモチーフが PNKP の核内への移行に必要であることを示している。さらに、核内移行能を欠く PNKP 変異体を発現する細胞は DNA 一本鎖切断および二本鎖切断修復能が著しく低下することを示し、PNKP の核内への移行機構とその DNA 修復における重要性を明らかにしている。

第 4 章「Laser micro-irradiation 法を用いた DNA 損傷部位への PNKP 集積動態解析」では、まず、共焦点顕微鏡を用いて細胞内の一部をレーザー照射して DNA 損傷を誘導し、GFP と融合した PNKP の照射領域への集積を 1 秒以下の時間分解能で解析可能な新たな手法 (Laser micro-irradiation 法) を確立している。この方法を用いて、第 3 章で作製した PNKP 変異体の照射領域への集積を解析し、FHA 領域が PNKP の DNA 損傷部位への動員に必要であることを示している。次に、FHA 領域内で高度に保存された 2 個のアルギニン残基をそれぞれアラニンに置換した変異体 (R35A, R48A) は照射領域への集積が著しく低下することから、FHA 領域が PNKP の DNA 損傷部位への動員に重要であることを示している。さらに、上記の 2 個のアルギニン残基をアラニンに置換した変異体 (2RA) では DNA 一本鎖切断修復に関わる XRCC1 および DNA 二本鎖切断修復に関わる XRCC4 との結合が失われること、XRCC1 あるいは XRCC4 の発現を抑制すると PNKP の照射領域への集積が低下することを示し、PNKP の DNA 損傷部位への動員が FHA 領域を介した XRCC1 および XRCC4 との結合を介して行われていることを明らかにしている。また、2RA 変異体を発現する細胞は DNA 一本鎖切断および二本鎖切断修復能およびゲノム安定性維持能が低下することから、FHA 領域を介した PNKP の DNA 損傷部位への動員機構の DNA 修復における重要性を明らかにしている。

第 5 章「リンカー (非構造化) 領域内の新規リン酸化部位の同定と DNA 修復における役割」では、まず、進化的保存性やタンパク質リン酸化データベース (Phosphosite Plus) に搭載された情報から、リン酸化修飾を受けやすい可能性が高い 5 個のセリンおよびスレオニン残基を抽出し、第 4 章と同様の解析を行うことにより、このうちセリンおよびスレオニン各 1 個が PNKP の DNA 損傷部位への動員に重要であることを明らかにしている。次に、このセリンおよびスレオニンをアラニンに置換した変異体の DNA 修復能力を解析し、DNA 二本鎖切断修復には双方が重要である一方、DNA 一本鎖切断の修復には専らスレオニンが重要であることを示している。さらに、免疫沈降法により、このスレオニンが PNKP と一本鎖 DNA 結合タンパク質である RPA との結合に必要であることを示している。以上の結果から、このスレオニンがリン酸化を受け、RPA と結合することで PNKP による DNA 一本鎖切断修復を制御していることを明らかにしている。

第 6 章「結論」では、本研究で得られた成果をまとめ、結論と今後の展望や課題を述べている。

これを要するに、本論文は、核酸末端のリン酸化・脱リン酸化を介して多様な DNA 損傷の修復に関わる酵素 PNKP の細胞核内移行機構、DNA 損傷部位への集積メカニズム、DNA 一本鎖切断修復に重要な新規リン酸化部位を明らかにしており、理学的貢献が大きい。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られる。