

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)	論文要旨
Type(English)	Summary

## 論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース: Department of, Graduate major in	融合理工学 原子核工学	系 コース	申請学位(専攻分野): Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(理学)
学生氏名: Student's Name	塚田 海馬		指導教員(主): Academic Supervisor(main)	松本 義久	
			指導教員(副): Academic Supervisor(sub)		

### 要旨(和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters )

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 章から構成される。

**第 1 章の「序論」**では、細胞・生体レベル(遺伝病やがんの発生)での DNA 損傷応答や損傷修復の重要性、そして放射線および抗がん剤でのがん治療における DNA 損傷応答研究の意義に関して述べた。また、本研究では DNA 修復因子の中から、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・二本鎖切断など様々な種類の DNA 損傷修復に関わる酵素 Polynucleotide Kinase Phosphatase (以下、PNKP)に着目して研究を行っており、PNKPに関する既往の研究状況を述べた。そして、PNKP の DNA 損傷応答やゲノム安定性維持における細胞内での制御機構を分子・アミノ酸レベルで解明することを本研究の目的とした。

**第 2 章の「実験材料と方法」**では、緑色蛍光タンパク質(GFP)と PNKP の融合タンパク質発現系を利用したライブセルイメージング、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いた PNKP 欠損細胞の樹立など、本研究で用いた遺伝子工学技術や分子生物学的手法などについて説明し、それらを応用した細胞内における PNKP 制御機構の解析方法を示した。本論文での研究成果は大別して 3 つに分けられ、それぞれ第 3 章から第 5 章で詳細を示した。

**第 3 章の「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 4 つの領域(FHA、リンカー、脱リン酸化、リン酸化)をそれぞれ欠失した変異体と GFP の融合タンパク質を作製し、細胞内での局在を観察することで、リンカー領域が核内への局在に必須であることを示した。次に、リンカー領域内から核内移行シグナル(NLS: nuclear localization signal)様のアミノ酸モチーフ(アミノ酸 137-142: KKRRMK)を同定し、その欠損変異体( $\Delta$ 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、同様の解析を行うことにより、このモチーフが PNKP の核内移行に必要であることを示した。さらに、核内移行能を欠失した PNKP 変異体を発現する細胞では 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明らかにし、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た。

**第 4 章の「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、細胞内の一部に共焦点顕微鏡を用いてレーザーを照射、DNA 損傷を誘導し、GFP と融合した PNKP の照射領域への集積動態を 1 秒以下の時間分解能で解析可能とした新たな手法(Laser micro-irradiation 法)を確立した。この方法により、第 3 章で作製した PNKP の各領域変異体の照射領域への集積を解析し、FHA 領域が DNA 損傷部位への動員に必要であることを示した。次に、FHA 領域内での進化的保存性の高い 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、これらの残基が DNA 損傷部位への動員に重要であることを示した。さらに、上記 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、2RA 変異体を発現する細胞は DNA 一本鎖切断と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 領域によるタンパク質結合を介した DNA 損傷部位への動員機構とその DNA 修復における重要性を明らかにした。

**第 5 章の「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、アミノ酸進化的保存性やタンパク質リン酸化データベース(Phosphosite Plus)に記載された情報から、リン酸化修飾を受ける可能性が高い 5 個のセリンおよびスレオニン残基を抽出し、第 4 章と同様の解析手法により、この内セリンおよびスレオニン各 1 個が DNA 損傷部位への動員に重要であることを明らかにした。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スレオニン残基が特に重要であることを解明した。さらに、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解明した。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た。

**第 6 章の「結論」**では、本論文のまとめと結論、そして今後の展望や波及効果などを述べた。

備考: 論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意: 論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。  
Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)  
Doctoral Program

## 論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース: Department of, Graduate major in	融合理工学 原子核工学	系 コース	申請学位(専攻分野): Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(理学)
学生氏名: Student's Name	塚田 海馬		指導教員(主): Academic Supervisor(main)	松本 義久	
			指導教員(副): Academic Supervisor(sub)		

### 要旨(英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

This dissertation entitled “Mechanisms of the Regulation of Polynucleotide Kinase/Phosphatase (PNKP) for DNA Repair” consists of 6 chapters.

**Chapter 1** describes the background of this study, including the importance of DNA damage response in an onset of inherited diseases, a carcinogenesis and cancer treatment with radiotherapy and chemotherapy. Then, it describes the current states of research on a DNA repair protein PNKP, which plays an important role in multiple DNA repair pathways. Finally, it describes the objective of this study, which is to elucidate the regulatory mechanisms of PNKP in DNA repair and genome stability at the molecular and amino acid level.

**Chapter 2** describes materials and methods used in this study.

Chapter 3-5 describe the results of the experimental studies and discussion.

**Chapter 3** reveals a mechanism of nuclear localization of PNKP and the essential amino acids using live-cell imaging of green fluorescence protein (GFP)- tagged PNKP including its point-substituted mutants. The importance of nuclear localization of PNKP in DNA single and double strand break repair is also demonstrated.

**Chapter 4** analyzes the recruitment of PNKP to DNA damages in living cells by a novel method “laser micro-irradiation” using a confocal laser microscope. It reveals the critical amino acids of PNKP in the FHA domain for its recruitment to laser-induced DNA damages, which mediate phosphorylation-dependent protein-protein interactions. Finally, the importance of recruitment of PNKP at DNA damages for DNA repair and genome stability is demonstrated.

**Chapter 5** identifies a novel phosphorylation site of PNKP in its linker region and demonstrates that it is required for the repair of DNA double strand breaks as well as DNA single strand breaks via the interaction with single-stranded DNA binding protein complex RPA.

**Chapter 6** presents conclusion and discussion of this dissertation, including the summary, prospective and spreading effects of this research.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note: Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意: 論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。  
Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).