

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	
Title(English)	Study on Regulation of Mre11-Rad50-Nbs1 Nuclease Complex by Ctp1 in the Initiation of Homologous Recombination
著者(和文)	ZdravkovicAlex
Author(English)	Aleksandar Zdravkovic
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12050号, 授与年月日:2021年9月24日, 学位の種別:課程博士, 審査員:岩崎 博史,木村 宏,中戸川 仁,相澤 康則,藤田 尚信
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12050号, Conferred date:2021/9/24, 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

(2000字程度)

報告番号	乙 第 号	学位申請者	Aleksandar Zdravković	
	氏 名	職 名	氏 名	職 名
論文審査員	主査 岩崎 博史	教授	藤田 尚信	准教授
	木村 宏	教授		
	中戸川 仁	准教授		
	相澤 康則	准教授		

本論文は「Study on Regulation of Mre11-Rad50-Nbs1 Nuclease Complex by Ctp1 in the Initiation of Homologous Recombination」と題し、英文で記述され、7章より構成されている。

第一章「Introduction」では、Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) ヌクレアーゼ複合体とその制御因子Ctp1 について概説している。まず、DNA二重鎖切断 (DNA double strand break: DSB) の修復の重要性とこれに関わる2つの主要経路を紹介し、そのなかで相同組換えの役割を示している。次に、相同組換えによる修復機構を説明し、そのなかでMRN-Ctp1複合体が反応初期過程に働くことを示し、MRN-Ctp1複合体の生物的重要性を説明している。そして、それぞれのサブユニットについて、その発見の歴史的経緯から最新の情報まで、主にヒトと酵母の研究から得られた知見を総括している。そのうえで、MRN複合体中のMre11ヌクレアーゼがCtp1によって活性化される分子機構が未解決である点を指摘し、本研究の目的を明示している。そして、それを解明するために分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) のMRN-Ctp1を主要モデルシステムとして解析すると述べている。

第二章から第五章までは本研究で得られた結果について述べている。

第二章「In vitro reconstitution of *S. pombe* MRN-Ctp1 complex」では、MRN-Ctp1複合体を試験管内で再構成している。まず、Ctp1サブユニットを精製し、カゼインキナーゼII (CKII) を用いて試験管内反応系にてリン酸化を行い、リン酸化部位を質量分析にて同定している。次に、Mre11-Rad50 (MR) 複合体とNbs1サブユニットをそれぞれ高純度に精製し、これらを用いて高次複合体形成について解析している。その結果、CKIIによってリン酸化されたCtp1がNbs1と結合して、Mre11-Rad50複合体と高次複合体を形成すると述べている。

第三章「Ctp1 stimulation of MRN complex endonuclease activities」では、リン酸化されたCtp1によるMRN複合体のエンドヌクレアーゼ (ニッキング機能) の活性化について解析している。Mre11 はエンドヌクレアーゼとエクソヌクレアーゼ活性を持つので、まず、エンドヌクレアーゼのみを検出する実験系について説明し、これを用いてリン酸化されたCtp1がMRN複合体のエンドヌクレアーゼを効率良く活性化することを示している。この活性化にはNbs1サブユニットとの相互作用、ATPの加水分解、2種類の金属イオンMg<sup>2+</sup>とMn<sup>2+</sup>の両方が必須であると述べている。

第四章「Ctp1 C-terminal 15 amino acid (CT15) site as the critical activator of MR endonuclease activities」では、MR複合体エンドヌクレアーゼの活性化に重要なCtp1タンパク質のC末端15アミノ酸 (CT15) を見出している。まず、様々な短縮変異体の解析から、MRエンドヌクレアーゼの活性化には、CT15領域が必須であること、CT15領域が生物種間でよく保存されていること、また、CT15変異体のin vivo解析からCT15領域で保存されたアミノ酸残基がDNA修復能と孢子生存率に重要であることを見出している。さらに15アミノ酸からなる合成CT15ペプチドが、MRエンドヌクレアーゼを活性化することを示している。これらを総合して、Ctp1のCT15領域がMRエンドヌクレアーゼの活性化に必須の働きをすると述べている。

第五章「Activation of human MRN nuclease activity by peptide derived from CtIP C terminus」では、ヒト由来MRN複合体が CtIP (Ctp1のヒトホモログ) のC末端ペプチド (HsCT15e) で活性化されることを見出している。HsCT15e領域はCDK及びATMによるリン酸化のターゲットとなるスレオニン残基を含み、この2箇所のリン酸化が、ヒト由来MRN複合体の活性化に重要であると述べている。

第六章「Discussion」では、上記の実験結果を総括して、Ctp1のリン酸化機構とCT15によるエンドヌクレアーゼ活性化機構を関連付け、Ctp1によるMRN 複合体制御機構、及び、その普遍性、また、活性化の分子機構について考察している。

第七章「Materials and Methods」では、本研究で用いた実験材料と実験手法の詳細を述べている。

以上を要するに、本論文はCtp1 (CtIP) によるMre11エンドヌクレアーゼの活性化機構を明らかにし、MRN複合体の活性制御機構について新しい重要な知見を提示したものであり理学上貢献するところが大きい。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分な価値があるものと認められる。