

氏名	温 錦耀
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第1074号
学位授与の日付	令和5年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 バイオテクノロジー専攻
学位論文題目	Analysis of the effect of DSB repair proteins on telomere capping proteins in the non-telomerase organism <i>Drosophila</i> (非テロメラーゼ生物ショウジョウバエにおけるDSB修復タンパク質がテロメアキャッピングタンパク質に与える影響の解析)
審査委員	(主査)教授 伊藤 雅信 教授 高野 敏行 准教授 加藤 容子

論文内容の要旨

本論文は、キイロショウジョウバエにおける、テロメアキャッピングタンパク質であるHOAPと二本鎖DNA損傷応答との関連について明らかにしたものである。

本申請論文は、第1章「序論」、第2章「テロメアキャッピングタンパク質 HOAP は二本鎖DNA損傷センサータンパク質 Mre11 および Nbs と相互作用する」、第3章「ショウジョウバエにおいてテロメアキャッピングタンパク質 HOAP は薬剤誘導による二本鎖DNA切断により ATM-Nbs を介してリン酸化修飾を受ける」、第4章「結論および展望」、の全4章から構成される。

第1章では、本研究の背景と目的が述べられている。テロメアは染色体末端の特殊な構造で、染色体の安定化に重要である。一般にヒトを含む哺乳類では、テロメアは短い繰返し配列からなり、テロメラーゼによって伸長される。哺乳類のテロメアには、キャッピングタンパク質であるTRF1およびTRF2が結合し、染色体末端がDNA損傷部位として認識されるのを防ぐ。一方、テロメラーゼを持たない生物も、菌類、植物、昆虫に広く存在する。そのひとつであるキイロショウジョウバエでは、レトロランスポゾンの複製によってテロメア長が維持され、テロメアキャッピングタンパク質 HOAP、HipHop が末端の保護を担う。これらキャッピングタンパク質は、テロメラーゼの有無によらず、DNA二本鎖切断の修復への関与も知られ、普遍的な機能的類似が考えられる。しかし、ショウジョウバエとヒトのテロメアキャッピングタンパク質には、顕著なアミノ酸相同性は見られない。テロメアキャッピングタンパク質のDNA損傷応答因子との相互作用や、テロメア集積の分子メカニズムは、依然として不明な点が多い。本研究の目的はこの解明であり、ヒトとの比較から染色体末端保護機構の包括的理をめをめぐらす意義が述べられている。

第2章では、DNA損傷応答因子 Mre11-Rad50-Nbs 複合体 (MRN)と、HOAPとの相互作用に注目した。まず、免疫沈降法によって、MRN複合体の相互作用を解析した結果、Nbs は Mre11 と直接結合し、Rad50 とは結合しないことを明らかにした。また、蛍光免疫染色法により細胞内局在を調査したところ、Nbs が核に、Mre11 と Rad50 は細胞質に局在することから、Nbs が Mre11 と結合することで、Mre11-

Rad50 を細胞質から核内に移行させることを示した。また、HOAP は Nbs と Mre11 に相互作用するが、HipHop は MRN と相互作用しないこと、および、HOAP と HipHop はテロメアに強く結合するが、MRN はテロメア局在しないこと、を明らかにした。さらに、HOAP の N 末端領域に Nbs との相互作用ならびにテロメア結合に重要な機能的ドメインを明らかにした。

第 3 章では、DNA 損傷と HOAP、および HipHop の関連を解析した。キイロショウジョウバエに注目し、ヒトと同様に DNA 損傷によって HOAP、HipHop のリン酸化が起こるか否か、Phos-tag ゲルを用いて検証した。その結果、薬剤処理により、HOAP はリン酸化されるが、HipHop は修飾されないことを明らかにした。さらに HOAP のアミノ酸 211～270 番目領域にリン酸化修飾部位候補を同定し、このリン酸化にはキナーゼである ATM およびその活性化因子 Nbs が関与することを示した。これらの結果から、DNA 損傷応答において、HOAP はヒト TRF1 および TRF2 と機能的に類似する可能性を示唆した。

第 4 章では、第 2 章と第 3 章の結果に包括的な考察を加え、染色体末端保護機構の普遍的メカニズムを論じた。さらに、テロメラーゼを持たない生物であるキイロショウジョウバエが、二本鎖 DNA 修復におけるテロメアキャッピングタンパク質の機能解明と染色体末端保護機構の理解に有用な研究モデルであることを指摘した。

論文審査の結果の要旨

本論文は、テロメラーゼを持たない生物の一つであるキイロショウジョウバエにおいて、テロメアキャッピングタンパク質 HOAP と二本鎖 DNA 損傷応答との関連について明らかにしたものである。

テロメアは染色体末端の特殊な構造で、染色体の安定化に非常に重要である。哺乳動物のテロメア DNA は、短い繰返し配列から構成され、テロメアキャッピングタンパク質 TRF1 および TRF2 が結合し、染色体末端が DNA 損傷応答によって損傷部位として認識されることを防いでいる。一方、ショウジョウバエでは、テロメアは複数種のレトロトランスポゾンから構成され、テロメアキャッピングタンパク質 HOAP および HipHop が、DNA 配列非特異的にテロメアに結合し保護している。HOAP および HipHop は TRF1 および TRF2 とのアミノ酸配列の相同性はないが、テロメア保護において類似の機能を果たすと考えられるが、その分子メカニズムや進化的類縁などは不明であった。

申請者はこれらの解明を目指し、まず、HOAP および HipHop と、これらのテロメア結合に重要な DNA 損傷修復因子 Mre11-Rad50-Nbs 複合体 (MRN)との相互作用を、免疫沈降法を用いて解析した。その結果、Nbs は Mre11 と直接結合し、Rad50 とは結合しなかった。HOAP は Nbs と Mre11 に結合するが、HipHop は MRN と結合しなかった。また、HOAP と HipHop はテロメアに強く結合するが、MRN はテロメアへ集積しなかった。さらに、HOAP の Nbs 結合ならびにテロメア局在に重要な機能ドメインを明らかにした。これらの成果は、MRN と HOAP の相互作用を明らかにしたもので、不明であった MRN と ATM によるテロメアキャッピングタンパク質の染色体末端への集積メカニズムの解明に貢献するものと評価できる。

申請者は、続いて、ショウジョウバエ HOAP および HipHop が、ヒトのテロメアキャッピングタンパク質と同様に DNA 損傷によってリン酸化修飾を受けるか、検討した。その結果、薬剤処理により、HOAP はリン酸化されるが、HipHop の修飾は見られなかった。さらに、HOAP のアミノ酸 211～270 番目領域にリン酸化修飾部位候補を同定し、このリン酸化にキナーゼ ATM およびその活性化因子 Nbs が関与することを示した。リン酸化は HOAP のテロメア結合には影響しなかった。申請者はこれらの結果から、DNA 損傷応答

において HOAP が、ヒト TRF1 および TRF2 と類似の機能を果たすことを示した。また、これまでキイロショウジョウバエでは議論されてこなかった DNA 損傷応答と HOAP のリン酸化との関連を明らかにしたことは、研究が遅れているテロメラーゼを持たない生物でのテロメアキャッピングタンパク質の新たな機能を見出しただけでなく、キイロショウジョウバエがテロメアキャッピングタンパク質の機能解析に有用であることを示したことは、高く評価できる。

なお本論文は、申請者を筆頭著者とする下記の2報を基礎としており、いずれも査読制度のある学術雑誌に、1報は掲載され、1報は掲載受理済みである。

- 1) Kinyo On, Gilles Crevel, Sue Cotterill, Masanobu Itoh, & Yasuko Kato

Drosophila telomere capping protein HOAP interacts with DSB sensor proteins Mre11 and Nbs. *Genes to Cells*. 26: 219–229, (2021) Doi: <https://doi.org/10.1111/gtc.12836>.

- 2) Kinyo On, Yasuko Kato, & Masanobu Itoh

Telomere capping protein HOAP is phosphorylated via the ATM–Nbs pathway following treatment with DSB inducing drugs in *Drosophila*. *J. Insect Biotechnology & Sericology* 92: 1–15.