京都大学	博士（　医　学　）	氏　名	Hoida Ismail Abdel-Aziz Manhi
論文題目	Bloom DNA helicase facilitates homologous recombination between diverged homologous sequences (ブルーム DNA ヘリカーゼはミスマッチを含む相同配列間の相同組換えを促進する)		

（論文内容の要旨）

相同組換えは、DNA２重鎖切断の修復や損傷した DNA 鎖での複製ブロックの解除を行うことにより、ゲノム安定性の維持に重要な役割を果たす。相同組換え過程の現在信じられているモデルでは、相同組換えは以下のようなステップにより行われると考えられている。（1）２重鎖切断末端(DSB)の 5'から 3'への DNA の削り込み反応による 3'突出単鎖 DNA のむき出し（2）Rad51 タンパク質の 3'突出単鎖 DNA 上でのポリマー化（3）Rad51-DNA 複合体による相同鎖検索、相同 DNA 鎖への ssDNA のアニール反応（D-loop と呼ばれる組換え中間体が生成される）（4）アニールした ssDNA から相同 DNA 鎖を鋳型に用いた DNA 合成（5）新たに合成された DNA 鎖の相同鎖からの乖離。このようなタイプの相同組換えは SDSA と呼ばれ、鋳型となる配列（ドナー）から損傷した DNA 鎖（レシピエント）への配列の転移を引き起こす。このタイプの組換えは体細胞分裂期における主要な相同組換え経路である。SDSA タイプの相同組換えでは、交叉を伴わない。一方、ssDNA の相同鎖へのアニール後に、もう一方の２重鎖切断末端から生成した ssDNA も相同鎖へアニールして、ホリデージャンクション中間体を形成すると、交叉を引き起こす。このタイプの組換えは娘染色体交換（SCE）や減数分裂期組換えにおける相同染色体間の組換えで見られる。

大腸菌 RecQ ヘリカーゼは 3'から 5'方向への DNA２重鎖の巻き戻しを行う。RecQ のホモログ因子は、酵母からヒトに至る幅広い生き物で見いだされている。ヒトにおいては Blm,Wrn, RecQ1, RecQ4, RecQ5 の５つの RecQ ファミリータンパク質が存在する。*BLM* 遺伝子はブルーム症患者で変異されている。ブルーム症細胞の主立った特徴は、SCE の著しい頻度上昇があげられる。故に、Blm ヘリカーゼは異常な組換えを抑制して、ゲノム安定性に寄与すると信じられている。Blm の組換え抑制における役割は、酵母の Blm のホモログ因子 Sgs1 が、減数分裂期や複製ブロック後のホリデージャンクション中間体の解消に寄与するという知見と一致する。しかしながら、交叉を伴わない SDSA タイプの相同組換えにおける Blm の機能は、ほとんどわかっていなかった。

Blm の SDSA での機能解析のために、Blm 遺伝子をニワトリ B リンパ球 DT40 細胞で破壊した。SDSA の解析のため以下の２つのアッセイを行った。（1）イムノグロブリン遺伝子座のジーンコンバージョン（2）DSB によって誘導されるジーンコンバージョン。イムノグロブリン遺伝子は、上流に位置する偽遺伝子（１０%のミスマッチを有する）との間の、ジーンコンバージョンと呼ばれる組換えによって引き起こされる配列情報の転移によって、遺伝情報の多様化を行っている。同様に、制限酵素（I-SceI）により導入した DSB によって、相同配列間のジーンコンバージョンが誘導される。これらの組換えイベントは、交叉を伴わない SDSA 型の組換えによって引き起こされる。

予想外な事に Blm-/-DT40 細胞は、イムノグロブリン遺伝子座のジーンコンバージョンの低下を示し、特にミスマッチの多い偽遺伝子間での組換えが顕著に低下していた。これと一致した結果として、I-SceI 制限酵素により導入された DSB から始まるジーンコンバージョンにおいても Blm-/-細胞はジーンコンバージョン効率の低下を示し、特に DSB 付近のミスマッチした配列が増えるにしたがい顕著にジーンコンバージョン効率が Blm-/-細胞で低下した。一方、Blm 遺伝子の高発現により、ミスマッチした配列間でのジーンコンバージョン効率は５０倍ほど上昇した。意外なことに、Blm ヘリカーゼのヘリカーゼ活性中心の変異をもつ遺伝子の高発現においても同様のジーンコンバージョン効率の上昇が見られた。

これらの結果から、Blm ヘリカーゼはヘリカーゼ活性と独立に SDSA 反応を促進する働きがあることが示唆された。

（論文審査の結果の要旨）

ブルーム症候群は、変異の蓄積による高発がんを特徴とする常染色体劣性遺伝病である。ブルーム遺伝子座は、DNA ヘリカーゼをコードしており、その DNA ヘリカーゼは、相同組換えによる DNA 修復反応を抑制することが知られていた。申請者は、相同組換えが修復する DNA 損傷を一定数、細胞のなかで誘導した後、相同組換えの初期反応だけを定量するアッセイ方法を構築した。そして、この方法で、ブルーム遺伝子欠損細胞や、ブルーム遺伝子強制発現細胞を解析した。

その結果、申請者は、予想に反して、ブルーム DNA ヘリカーゼは、相同組換えの初期反応を促進することを証明した。この促進効果は、相同組換えする２種類の相同配列のなかに、少し非相同配列が混ざっているときに、特に顕在化する。申請者は、この促進効果を、植物やラット、魚類で使われる、人工制限酵素を使った遺伝子改変技術をさらに、その効率を上昇させることにも応用できることを示した。

以上の研究は、ブルーム症候群の発がん機構の解明に貢献し、がん研究に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成２２年８月４日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降