

氏 名	きく ち こう じ 菊 池 浩 二
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2909 号
学位授与の日付	平 成 17 年 9 月 26 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	医 学 研 究 科 分 子 医 学 系 専 攻
学位論文題目	Fen-1 facilitates homologous recombination by removing divergent sequences at DNA break ends. (Fen-1 は DNA 断裂近傍の非相同配列を除去することにより相同組換えを促進する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 松 本 智 裕 教 授 小 松 賢 志 教 授 渡 邊 正 己

論 文 内 容 の 要 旨

本研究室では標的組換え効率が高いため高等真核細胞で唯一系統的な遺伝学的解析が可能なニワトリ B リンパ細胞株, DT40 を用い, 相同組換えの機構を解明すべく, DNA 修復機構に関与する様々な遺伝子の変異クローンを構築し, 表現型解析を行ってきた。

相同組換えは複数の段階(開始, プロセッシング, DNA 鎖交換反応, 修復合成, 解離など)からなる複雑な分子機構である。そして, その過程においてヌクレアーゼが重要な役割を担っていることが考えられている。例えば, 出芽酵母の HO ヌクレアーゼは相同組換えによって行われる接合型変換の開始に必要であり, Mre11 は DNA 二重鎖切断部位のプロセッシングを行う。また, Rad1-Rad10 は *in vitro* においてホリデイ構造の解離を行うことが知られている。しかし, 依然として, 相同組換えに関与するヌクレアーゼの知見は十分ではない。そこで, 本研究では, 相同組換えに関与する可能性があるヌクレアーゼファミリーのひとつとして, RAD2 ファミリーに着目し, 研究を行ってきた。RAD2 ファミリーに属する遺伝子は XPGN モチーフ及び XPGI モチーフを持ち, 高等真核生物では *EXO1*, *FEN-1*, *XPG* の 3 つの遺伝子が知られている。*Exo1* は, ミスマッチ修復の因子として知られている *Msh2* と結合し, 出芽酵母の研究からミスマッチ修復及び相同組換えに関与することが示唆されている。*Fen-1* は複製時に生じる Okazaki fragment の DNA フラップ構造, 及び塩基除去修復(BER)の際に生じる DNA フラップ構造を除去すると考えられている。また, マウスにおいて *FEN-1* 遺伝子を破壊すると胎生致死になることが最近になり報告された。*Xpg* は色素性乾皮症の責任遺伝子のひとつであり, ヌクレオチド除去修復(NER)及び BER の転写カップリング修復に関与することが知られている。これらの遺伝子は出芽酵母からヒトまで高度に保存されている。しかし, 高等真核生物において, これらの遺伝子が相同組換えに関与するか否か解析されていなかった。

今回, *FEN-1* 及び *XPG* の遺伝子破壊株について解析を行い, *Molecular and Cellular Biology* 誌上において論文の公表を予定している。本研究では *FEN-1* 遺伝子破壊株において標的遺伝子組換え効率, SCneo を用いた遺伝子変換効率及び免疫グロブリン遺伝子変換効率を測定し, それぞれが有意に低下していることを見いだした。さらに, 我々はニワトリ DT40 細胞において二重鎖切断により誘導される標的遺伝子組換え効率を測定する系を確立し, その系を用いて, *Fen-1* が DNA 断裂部位に存在する非相同配列を除去することを明らかにした。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本学位授与申請者が所属する教室では, 標的組換え効率が高いため高等真核細胞で唯一系統的な逆遺伝学的解析が可能なニワトリ B リンパ細胞株 DT40 を用い, 相同組換えの機構を解明すべく, その機構に関与する様々な遺伝子の変異クローンを構築し表現型解析を行っている。申請者は, 相同組換えに関与する全ヌクレアーゼを同定すべく研究に取り組んだ。その過程で, これまでラギング鎖 DNA の複製における役割しかなかった *Fen-1* が, 相同組換えの初期のステッ

ブに関与することを明らかにした。

申請者はまず、*FEN-1* 遺伝子破壊株において、同一配列同士の組換えは正常であるが、非相同配列を含む組換え効率が低下することを見出した。この結論が正しいか否かを検証するために、申請者は、DT40 細胞において非相同配列の長さが組換え効率に与える影響を系統的に測定するアッセイ系を確立した。そして、Fen-1 が組換え開始点にある非相同配列を除去して組換え効率を上昇させることを証明した。

以上の研究は、相同組換えにおけるヌクレアーゼの機能解明に貢献するだけでなく、標的組換え効率を改善するという応用にも寄与するところが多く、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17年8月11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。