

**【目的】**細胞のゲノム DNA は、さまざまな内的・外的要因により絶えず損傷を受けている。最も危険な DNA 損傷である二本鎖 DNA 切断は非相同末端連結 (NHEJ) または相同組換えによって速やかに修復されるが、これら 2 つの主要経路とは異なる修復機構も存在する。しかし、こうした経路の意義や分子機構の多くは未解明である。我々は最近、マイナーな修復機構の一つ alternative end-joining に PolQ タンパク質が必須であることを遺伝学的に明らかにした。また、PolQ と Lig4 (NHEJ の必須因子) を同時に欠損した細胞では Alu 配列間での組換えが顕著になることを見いだした。本研究では、ヒト細胞のゲノム安定性維持における二本鎖切断修復の役割と意義を明らかにすることを目的として、PolQ の機能ドメインの解析を進めるとともに、Alu-Alu 組換えの特徴と制御機構に関する先駆的研究を行った。

**【方法】** 1. 各ドメインに変異を入れた発現ベクターを構築し、ヒト *LIG4/POLQ* 二重破壊株に pPGKneo と共導入した。細胞を G418 含有アガロース培地中で 3 週間培養した後、生存コロニー数を指標にランダム挿入頻度 (ベクターが染色体中に組み込まれる頻度) を算出した。2. *LIG4/POLQ* 二重破壊株の *HPRT* 遺伝子座の第 3 エクソン中に CRISPR/Cas9 により二本鎖切断を誘発した後、PCR 解析とシーケンス解析により組換え体の同定と各クローンにおける Alu-Alu 組換えの特徴の解析を行った。Rad51 と Rad52 の関与については阻害剤を用いて、Msh2 の関与についてはゲノム上の変異を修正 (cDNA をノックイン) した細胞を構築して実験を行った。

**【結果】** PolQ の Polymerase 活性だけでなく ATPase 活性も alt-EJ において必須の機能を果たすことが明らかとなった。一方、Rad51 結合ドメインは PolQ の機能に必須ではなかった。NLS 配列中に変異を入れると PolQ は細胞質に局在したが、その機能に大きな影響はみられなかった。上で述べた通り、PolQ と Lig4 を同時に欠損した細胞では Alu-Alu 組換えでしか修復 (すなわち切断末端の再連結) が行われず、*LIG4/POLQ* 二重破壊株の *HPRT* 遺伝子座における Alu-Alu 組換えの特徴を調べたところ、二本鎖切断誘発部位の近傍に存在する Alu 配列が組換えの基質として利用されやすいこと、また相同性の高い Alu 配列同士で組み換わる頻度が高いことが判明した。阻害剤等を用いた実験から、こうした Alu-Alu 組換えは Rad52 依存性の一本鎖 DNA アニーリング (SSA) によって引き起こされることが強く示唆された。また、PolQ や Lig4 に加え、Msh2 によっても SSA を介した Alu-Alu 組換え反応が強く抑制されていることが明らかとなった。異なる Alu 配列の間で起こる一本鎖 DNA のアニーリングが Msh2 タンパク質によって阻害されていることが推測される。Alu-Alu 組換えはがんや遺伝病の直接的原因となる危険な組換えであり、その制御機構の解明は反復配列に富んだゲノムが安定に維持される仕組みを理解するうえで重要な課題である。

#### Alternative end-joining の主役 PolQ の機能ドメインと Alu-Alu 組換えに関する研究

