

論文内容要旨（和文）

所属：生物科学専攻 動物学系

氏名：周 慧

論文題目：ナイミーヘン症候群の原因遺伝子 *NBS1* の放射線とアフラトキシンに対する細胞応答における役割

ナイミーヘン症候群の原因遺伝子産物 *NBS1* は細胞周期チェックポイントの制御および相同組換え（HR）修復に機能することで、放射線誘発 DNA 損傷応答に重要な役割を果たすことが知られている。しかし、*NBS1* の制御機構には不明な点が多い。さらに、*NBS1* は紫外線誘発 DNA 損傷発生時に損傷乗り越え DNA 合成（TLS）に機能することが報告されている。このように *NBS1* は放射線誘発 DNA 損傷に限らず様々な DNA 損傷に応答する多機能タンパク質だと考えられ、未解明な機能が残されていることが推測される。そのため本研究は、*NBS1* の放射線誘発 DNA 損傷応答における *NBS1* の制御機構とともに、アフラトキシン B₁ (AFB₁) 誘発 DNA 損傷応答における *NBS1* の役割についても明らかにすることを目的とした。

NBS1 は MRE11、RAD50 と MRN 複合体を形成して放射線誘発 DNA 損傷応答に機能する。最初に免疫沈降法を用いて MRN 複合体形成を検討すると、抗 MRE11 抗体で共沈する *NBS1* の量が放射線照射により増加した。*NBS1* は ATM キナーゼによってリン酸化を受けるが、ATM による *NBS1* のリン酸化部位をアラニンに置換した場合および ATM 特異的阻害剤で前処理した場合、ともに MRE11 と共沈する *NBS1* タンパク質量の増加が見られなくなった。このことか

ら、放射線誘発二本鎖切断 (DSB) 発生時に NBS1 が ATM によりリン酸化されることで MRN 複合体形成が促進されると考えられた。また、リン酸化部位に変異を加えた NBS1 発現細胞の細胞周期解析から、このような ATM 依存的なリン酸化は細胞周期チェックポイント制御に重要であることが示唆された。細胞を G0 期で停止させると MRE11、RAD50 に変化は見られなかったが、NBS1 タンパク質量が顕著に減少した。この G0 期での停止細胞を GFP レポーターアッセイで解析すると HR 修復活性が低下していた。この結果は NBS1 タンパク質の量的制御は DNA 合成が完了して相同な姉妹染色分体が存在する前に、突発的に HR 修復機構が活性化して、非相同な染色体間での組換えが起こることを防ぐのに重要であると考えられる。

代謝酵素 *CYP1A2* 遺伝子を導入した細胞に AFB₁ 処理を行うと細胞死を増加させた。また AFB₁ 処理は PCNA のモノユビキチン化および Pol η のフォーカス形成を誘導することから、Pol η 依存性 TLS 経路の活性化が示唆された。次に、NBS1 および RAD18 の関与を検討したところ、*NBS1* あるいは *RAD18* 欠損細胞では PCNA のモノユビキチン化が消失するとともに、AFB₁ に対する致死感受性が増加した。これらの結果から NBS1 と RAD18 を介した Pol η 依存的な TLS 経路が活性化されることで、細胞内で活性化された AFB₁ により生じた DNA 損傷が引き起こす細胞死が抑制されることが示唆される。

本研究は ATM 依存的な MRN 複合体形成の促進と細胞周期依存的タンパク質の量的制御という NBS1 の二つの制御機構を明らかにした。また AFB₁ 誘発 DNA 損傷の発生時に NBS1 が TLS に機能することを明らかにした。このように、NBS1 はゲノム安定化と細胞死の低減に重要な役割をしていることが明らかとなった。