

京都大学	博士（医学）	氏名	岡 勇 人
論文題目	DNA damage response protein ASCIZ links base excision repair with immunoglobulin gene conversion (DNA 損傷応答タンパク質 ASCIZ は塩基除去修復と遺伝子変換をリンクする)		
(論文内容の要旨)			
<p>ASCIZ (ATM/ATR Substrate and Chk2-Interacting Zn<sup>2+</sup>-finger) は、DNA 塩基損傷を誘導する薬剤・メチルメタンサルホン酸 (MMS) に曝露すると、DNA 修復経路の1つである相同組換えの中心的役割を担う Rad51 と共に、DNA 損傷部位に集積する分子として 2005 年に同定された。siRNA により ASCIZ 発現量を減らしたヒト細胞は、MMS に高い感受性を示し、DNA 損傷部位への Rad51 の集積が損なわれていた。しかし、ASCIZ が、DNA 修復に関与するか否か、もし関与するならば、相同組換えに関与するか否かは明らかではない。以上の疑問点を調べる目的で、本研究は、ニワトリ DT40 B リンパ細胞株から ASCIZ 遺伝子破壊細胞を樹立することで、ASCIZ の機能解析を行った。</p> <p>DT40 細胞は、標的組換え効率が高く、培養中に抗体遺伝子を連続的に多様化する。この多様化には、相同組換えによるものと損傷乗越えによる点変異の蓄積とがあり、いずれも AID によるウラシル形成から始まる。ウラシルに塩基除去修復がはたらきかけ、脱塩基部位が生じる。抗体遺伝子の脱塩基部位は、以下の3つの反応を誘導する：(1) 引き続き塩基除去修復がはたらきかけ正確に修復される、(2) 損傷乗越えと呼ばれる DNA 合成経路が脱塩基部位を DNA 複製した結果、抗体遺伝子の点変異蓄積が生じる、(3) 脱塩基部位が DNA 複製時に相同組換えを誘導した結果、抗体遺伝子が多様化する。したがって、ASCIZ<sup>-/-</sup> DT40 細胞の抗体遺伝子の多様化を表現型解析することで、ASCIZ の、3種類の DNA 修復経路（塩基除去修復、相同組換え、損傷乗越え）における役割を正確に解析できる。</p> <p>最初に、ASCIZ 欠損が相同組換えに与える影響を調べた。樹立した ASCIZ<sup>-/-</sup>細胞では、相同組換えによる抗体遺伝子の多様化効率が上昇した。この知見から、ASCIZ は相同組換えを抑制することが示唆された。次に、標的組換え効率を調べたが、ASCIZ 欠損は標的組換え効率には影響がなかった。さらに、MMS 処理した ASCIZ<sup>-/-</sup>細胞では、DNA 損傷部位への Rad51 の集積がわずかに損なわれた。以上の結果から、ASCIZ は相同組換えによる抗体遺伝子の多様化には関与するが、相同組換え一般には重要でない結論した。</p> <p>次に、ASCIZ が抗体遺伝子の点変異蓄積に与える影響を調べた。その結果、ASCIZ は脱塩基部位の形成と損傷乗越えとは関与しないことがわかった。ゆえに、ASCIZ は、脱塩基部位の形成以降のステップで機能すると考えた。</p> <p>最後に、ASCIZ が、脱塩基部位の形成後のステップで塩基除去修復に関与する可能性を調べた。ASCIZ<sup>-/-</sup>細胞は、MMS や過酸化水素に弱い感受性を示した。この結果から、ASCIZ は塩基除去修復を促進することが示唆された。この促進作用が、間接的に、相同組換えによる抗体遺伝子の多様化を抑制していると考えられる。</p> <p>本研究によって、ASCIZ は、少なくとも DT40 細胞では、塩基除去修復に関与し、相同組換えには重要なはたらきをしないことが明らかにされた。塩基除去修復は、生理的条件下で大量に発生する DNA 損傷を修復するのに必須な機能であり、この修復経路が完全に欠損すると変異が蓄積し、細胞レベルで致死である。ゆえに、ASCIZ は、変異の蓄積を抑制し、発がんを防止する機能を有すると推定される。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本学位申請者は、ニワトリ DT40 細胞を用いて、ASCIZ 遺伝子の DNA 修復経路における役割を解析した。ASCIZ は代謝副産物として発生する DNA 酸化ストレスの修復に関わる因子として同定されていた。

はじめに、抗体産生細胞である DT40 細胞の特徴を活かして、抗体遺伝子の多様化を解析することで、ASCIZ の DNA 修復における機能を詳細に検討した。ASCIZ 欠損細胞は、相同組換えによる抗体遺伝子の多様化が高頻度に起きた。しかし、一般的な相同組換えによる二本鎖 DNA 切断の修復効率は、ASCIZ 欠損下でも大きな変化はみられなかったことから、ASCIZ は抗体遺伝子の多様化に伴う相同組換えに特異的に関与することが明らかとなった。

さらに、ASCIZ 欠損細胞は、塩基損傷を誘導するメチルメタンサルホン酸 (MMS) や過酸化水素 (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) に弱い感受性を示すことから、ASCIZ は塩基除去修復を促進する可能性が示唆された。興味深いことに、塩基除去修復の中心的な役割を担う DNA ポリメラーゼ β 欠損による MMS に対する高感受性は、ASCIZ をさらに欠損させることにより緩和された。よって、ASCIZ は塩基除去修復において、DNA ポリメラーゼ β による DNA 合成より前のステップで働くと考えられる。

以上のことから、ASCIZ は、塩基除去修復を促進する一方で、相同組換えによる抗体遺伝子の多様化を抑制している、と結論している。本研究は、DNA 損傷応答タンパク質 ASCIZ の塩基除去修復における機能の解明に貢献し、発がん物質である MMS などのアルキル化剤や生理的条件下で発生する酸化 DNA 損傷に起因する発がん機序の理解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 3 月 26 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