京都大学	博士（医学）	氏　名	竹田　純
論文題目	Radiation induction of delayed recombination in *Schizosaccharomyces pombe*（分裂酵母において電離放射線が誘発する遅発性突然変異）		

（論文内容の要旨）

電離放射線などの環境因子が誘発するDNA二重鎖切断(DSB)は、それが修復されたのちの子孫細胞においても染色体突然変異や遺伝子突然変異を引き起こす。この遅発性突然変異の誘導・維持には、細胞が「DSBが起きたこと」を記憶する必要があり、これまでに(1)継続的に新しい損傷が発生することで維持される記憶、(2)損傷によらないエピジェネティックな損傷の記憶、という二つの異なった損傷記憶の存在が考えられている。これまでの研究から、多細胞生物では損傷応答の下流において上記の両方が機能していると予想されるが、より観察・測定しやすい前者の機構に関する報告が多く、後者の機構に関する報告はほとんど例がない。本論文では、単細胞であるが機能面で動物細胞と共通点が多く、遺伝学的な解析に利用しやすい分裂酵母が、エピジェネティックな損傷記憶機構を持つことを報告する。

解析に先立って、*ura4*遺伝子の一部をタンデムに重複させた内側にG-418耐性遺伝子をもたせた組み換えレポーター遺伝子を作製した。このレポーターを用いると、培地へのG-418添加によって細胞集団から組み換え体を排除できるため、継代培養の各時点で正確な組み換え頻度が測定できる。レポーターを導入した株にX線を照射すると、リピート間での相同組み換えが誘導され、組み換え頻度は線量依存的に高くなった。つぎに、200bpの重複を持つレポーター遺伝子を用いてX線照射後の組み換え頻度を経時的に測定すると、上昇した組み換え頻度はそのまま8～10世代にわたって高く保たれ、その持続期間には線量依存性がみられなかった。また、組み換え頻度が高く保たれている細胞の培養液は非照射細胞の組み換え頻度を上昇させなかった。これらの結果は、DSBの存在を一定期間細胞内に記憶するメカニズムと、記憶の下流でDSBの位置に依存せずにトランスに組み換え頻度を上昇させるメカニズムの存在を示唆していた。

哺乳類細胞では、DSBが誘導する炎症応答の一環として持続的に活性酸素の産生量が増大し、二次的におこる酸化損傷が遅発性突然変異を誘発する場合がある。ところが分裂酵母では、X線照射後に持続的な活性酸素の産生増加は見られず、活性酸素スカベンジャーを培地に添加しても遅発性組み換えは抑制されなかった。これらの結果は、活性酸素は分裂酵母の遅発性組み換えには関与しないことを示唆していた。また、一番染色体への位置特異的なDNA　DSBの導入が、三番染色体におけるレポーターの組み換え頻度を上昇させたことから、損傷がトランスに組み換え頻度を上昇させうることが示された。

相同組み換えに必須な分子である　Rad22　(Rad52オーソログ)の活性化を経時的に観察すると、組み換え頻度の変化と平行して8～10世代のあいだ約30%の細胞で活性化が見られた。そこで、遅発性におこるRad22の活性化が損傷によるものなのか、あるいは他の制御系によるものなのかを判断するために、X線照射後のさまざまな時期における細胞周期プロファイルを測定した。DSBの発生にともなう細胞周期の停止はX線照射後しばらく観察されたが、遅発性組み換えを起こしている集団の細胞周期プロファイルは対照と差がなかった。つまり、Rad22の持続的な活性化は、修復されずに残った損傷や新たに生じた損傷が原因ではないことが明らかになった。

以上の結果は、DNA　DSBが持続的な損傷の発生ではないエピジェネティックな機構による損傷記憶を誘発することと、損傷記憶がその下流で組み換え系の活性を調節していることを示唆している。

（論文審査の結果の要旨）

電離放射線で照射された細胞とその子孫細胞では、当初の損傷が修復されたのちも突然変異頻度が長期的に上昇したままになる。これは「遅発性突然変異」とよばれ、その成立には分裂を介しても損傷の情報を「損傷記憶」として細胞にとどめておく機構が必要である。申請者は分裂酵母をもちい、X線照射後にみられる損傷記憶と遅発性組み換え変異についての解析を試みた。

分裂酵母ではX線照射直後に上昇した組換え頻度は、DNA二本鎖切断(DSB)の修復の後も8～10世代にわたって高く保たれた。遅発性組み換えの持続期間は照射線量には依存せず、照射後の細胞分裂回数に依存した。また、活性酸素抑制剤では遅発性組み換えが抑えられないことから、培養細胞で報告されている遅延的に産生される活性酸素種の関与は否定された。

蛍光タンパク質を融合させた相同組み換えタンパク質Rad22(ヒトや出芽酵母のRad52ホモログ)は、照射後に活性型分子が集合してフォーカスを形成したが、このフォーカス形成も照射後約10世代にわたって持続した。フォーカス形成の遷延は、修復されずに残ったDSBや新規に産生されたDSBによるものとは限らず、損傷記憶の下流でエピジェネティックに制御されている可能性も示唆された。

以上の成果は、放射線応答の研究分野に貢献するもので、電離放射線による損傷の修復完了後に細胞応答が持続することを示した、極めて大きい意味をもつものである。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値のあるものと認められる。

なお、本学位授与申請者は、平成20年6月16日実施の論文内容とそれに関連した研究分野に関する諮問を受け、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