

氏名	おかだ たかし 岡田 崇
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2596号
学位授与の日付	平成15年3月24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	医学研究科外科系専攻
学位論文題目	Involvement of Vertebrate Polκ in Rad18-independent Postreplication Repair of UV Damage (脊椎動物のDNAポリメラーゼκは、Rad18非依存的に紫外線DNA損傷の複製後修復に関与する)
論文調査委員	(主査) 教授 藤堂 剛 教授 丹羽 太貫 教授 小川 修

### 論文内容の要旨

DNAの損傷は、紫外線や化学物質などの環境要因だけでなく、細胞活動で生じる活性酸素のような内的要因によっても常に生じている。遺伝情報の正確な伝達や保持のためにはDNA損傷の修復は必須であり、DNA修復の異常は遺伝子の変異蓄積、染色体異常や細胞死、癌化・老化や遺伝疾患の原因になっている。

DNA修復タンパクのアミノ酸配列は大腸菌・酵母から高等動物まで高度に保存されている。修復タンパクの生化学的機能解析、あるいは修復遺伝子の欠損細胞株やKOマウス、ヒト遺伝疾患(色素性乾皮症など)の理解などに基づく遺伝学的解析により、いくつかのDNA修復経路が確立された。

DNAポリメラーゼκ(Polκ/POLK)は、大腸菌で複製後修復に関わるDNAポリメラーゼIV/DinBのホモログである。複製後修復とは、複製時に鋳型鎖に残存・生成した損傷をバイパス・修復する経路のことで、特殊なポリメラーゼ群が損傷を乗り越えてDNA合成を行い(損傷乗越え合成: TLS)複製を継続できること、このとき複製エラーが生じる可能性があること、また高等真核生物ではTLSの他、相同組換え(HR)も働いていることなどが近年明らかにされてきている。

この論文では、高等真核生物では未解明であったPolκの機能を、DT40細胞でKO細胞を作成することにより、遺伝的に解析した。ニワトリBリンパ細胞株であるDT40は、HRによる標的遺伝子組換え能が著しく亢進しており、酵母やES細胞同様、遺伝子破壊株が効率良く作成できる特徴をもつ。これまでの生化学的研究では、Polκはベンツピレン(BaP)、アセトアミノフルオレン(AAF)による損傷を乗越え合成できるが、紫外線損傷であるピリミジンダイマーは乗り越えられないとされていた。

DT40 POLK欠損株は野生株とほぼ同様の増殖能を示した。しかしDNA損傷の誘導処理を行った場合、BaP、AAFには野生株と同様の感受性を示したが、紫外線に対しては強い感受性を示した。この結果は細胞増殖阻止実験の他、染色体分析にも確認された。紫外線感受性はヒト及びニワトリPOLKの再発現により抑制され、細胞周期複製早期に特異的であった。以上の結果から、生化学的研究のデータはin vivoを必ずしも反映していないことが確認された。

POLKが既知の紫外線損傷修復系に属するかどうかを調べる目的でPOLKと、XPAあるいはRAD18との二重欠損株を作成した。XPAは紫外線損傷修復の主要経路であるヌクレオチド除去修復系の、RAD18は酵母で複製後修復の最上流にある遺伝子である。これら二重欠損株はいずれも、各単一遺伝子欠損株の相加的な紫外線感受性を表した。このことはPOLKが上記のいずれの経路とも異なる経路に属している可能性を示す。すなわち、POLKは紫外線損傷修復においてRAD18とは異なる複製後修復の経路に関与していると考えられた。

また、相同組換え能について、外来遺伝子の標的組換え能(TF)と姉妹染色分体交換現象(SCE)をPOLK欠損株と野生株で比較した。POLK欠損株でTFの減少がみられなかったことから、PolκはHRに直接関与するポリメラーゼではないと考えられた。また外的因子によるDNA損傷の誘導がない状態でも、欠損株でSCEが亢進していることから、Polκは染色体DNAの安定性に寄与すると考えられた。Polκは生化学的には複製エラーを起こし、高率に変異を誘導する

ポリメラーゼであることが分かっている。ある種の肺癌では Pol $\kappa$  の発現が亢進しており、発がんとの関連が示唆されている。今回の論文では、Pol $\kappa$  の染色体安定性への関与を示し、別の側面から Pol $\kappa$  の発がんとの関連性を示唆した。

#### 論文審査の結果の要旨

Pol $\kappa$  は、大腸菌で DNA 損傷の複製後修復に関わる DNA ポリメラーゼ IV/DinB の高等真核生物におけるホモログである（出芽酵母には存在しない）。ニワトリ DT40 細胞でノックアウト細胞を作成することにより、Pol $\kappa$  の機能を逆行遺伝学的に解析した。これまでの生化学的研究では、Pol $\kappa$  はベンゾピレン、アセトアミノフルオレンによる損傷を乗越え合成できるが、紫外線損傷であるピリミジンダイマーは乗り越えられないとされていた。

しかしながら今回の研究では、DT40 Pol $\kappa$  欠損株は、細胞増殖阻止実験で紫外線に感受性を示したが、ベンゾピレン、アセトアミノフルオレンには非感受性であった。紫外線感受性はヒト及びニワトリ Pol $\kappa$  の再発現により野生株レベルまで回復し、複製早期に特異的であった。また染色体分析にも紫外線感受性が確認された。以上の結果から、Pol $\kappa$  は紫外線損傷の複製後修復に関与していると考えられ、生化学的研究のデータは *in vivo* を必ずしも反映していないと考えられた。

出芽酵母で複製後修復の最初に機能すると考えられている遺伝子 RAD18 と Pol $\kappa$  の二重欠損株では、各単一遺伝子欠損株の相加的な紫外線感受性を示し、Pol $\kappa$  が RAD18 とは別の経路で機能している可能性を示した。すなわち、Pol $\kappa$  は RAD18 非依存的に紫外線損傷の複製後修復に関与していると考えられた。

以上の研究は DNA 修復機構の解明に貢献し、腫瘍の生成や進展の原因の究明など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15年2月19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。