

京都大学	博士（医学）	氏名	小林 俊介
論文題目	<p>Rad18 and Rnf8 facilitate homologous recombination by two distinct mechanisms, promoting Rad51 focus formation and suppressing the toxic effect of nonhomologous end-joining  (Rad18 と Rnf8 は、2つの異なった機構 (Rad51 のフォーカス形成の促進及び非相同末端結合の毒性効果の抑制) によって相同組換えを促進する)</p>		
(論文内容の要旨)			
<p><b>【背景と目的】</b> がん治療に用いられる電離放射線や抗がん剤 (カンプトテシン) は、DNA に 2 重鎖切断を生じさせる。電離放射線による 2 重鎖切断は、相同組換えと非相同末端結合という 2 つの経路で修復される。一方、カンプトテシンによる 2 重鎖切断は、DNA 複製中に生じ、相同組換えのみにより修復される。ユビキチン連結酵素である Rad18 及び Rnf8 は、2 重鎖切断の修復に関与している。これまでの研究は主に RNAi という手法を用いており、Rad18 または Rnf8 を完全欠損させた時の 2 重鎖切断の修復への影響を観察していない。また、Rad18 と Rnf8 のユビキチン連結酵素間に機能的関連性があるかについては、これまで報告がなかった。</p> <p><b>【方法】</b> ニワトリ B リンパ球細胞株 DT40 から、Rad18 と Rnf8 をそれぞれ完全欠損させた細胞株 (<i>RAD18</i><sup>-/-</sup>と <i>RNF8</i><sup>-/-</sup>細胞) を作った。また、両酵素の機能的関連性を調べるために、Rad18 と Rnf8 を両方欠損させた 2 重欠損細胞株 (<i>RAD18</i><sup>-/-</sup>/<i>RNF8</i><sup>-/-</sup>細胞) を作製した。以上の変異細胞について電離放射線並びにカンプトテシンへの感受性、染色体異常の頻度、相同組換え酵素である Rad51 の DNA 損傷部位への集積効率を調べた。</p> <p><b>【結果】</b></p> <p>(i) 野生型と比べて <i>RAD18</i><sup>-/-</sup>、<i>RNF8</i><sup>-/-</sup>、<i>RAD18</i><sup>-/-</sup>/<i>RNF8</i><sup>-/-</sup>細胞は、カンプトテシンに対して同程度の高感受性を示した。また <i>RAD18</i><sup>-/-</sup>細胞にて、非相同末端結合に必須の因子である Ku70 を欠損させた細胞 (<i>RAD18</i><sup>-/-</sup>/<i>KU70</i><sup>-/-</sup>細胞) では、カンプトテシンに対する感受性が回復する。同様に <i>RNF8</i><sup>-/-</sup>/<i>KU70</i><sup>-/-</sup>細胞でも、カンプトテシンに対する感受性が回復したのを確認した。さらにカンプトテシン処理下でのラジアル染色体の発生頻度を調べた。ラジアル染色体は、複数種類の染色体が連結したような形状をもつ染色体である。野生型と比べて <i>RAD18</i><sup>-/-</sup>、<i>RNF8</i><sup>-/-</sup>、<i>RAD18</i><sup>-/-</sup>/<i>RNF8</i><sup>-/-</sup>細胞のラジアル染色体の頻度は増加しており、かつ増加は変異細胞間で同程度であった。一方 <i>RAD18</i><sup>-/-</sup>/<i>KU70</i><sup>-/-</sup>、<i>RNF8</i><sup>-/-</sup>/<i>KU70</i><sup>-/-</sup>細胞では、ラジアル染色体の頻度が顕著に減少した。以上の結果は、カンプトテシンに対する <i>RAD18</i><sup>-/-</sup>細胞と <i>RNF8</i><sup>-/-</sup>細胞の感受性は、非相同末端結合の亢進によるものであり、Rad18 と Rnf8 は共同して非相同末端結合を抑制することで相同組換えを促進していることを示唆している。</p> <p>(ii) 電離放射線に対する感受性は、<i>RAD18</i><sup>-/-</sup>、<i>RNF8</i><sup>-/-</sup>細胞で、野生型と比べて重度であった。カンプトテシンに対する感受性の場合と異なり、<i>RAD18</i><sup>-/-</sup>/<i>RNF8</i><sup>-/-</sup>細胞ではさらに重篤であった。また、電離放射線照射後の Rad51 の DNA 損傷部位への集積効率は、<i>RAD18</i><sup>-/-</sup>、<i>RNF8</i><sup>-/-</sup>細胞で野生型と同程度であったのに対し、<i>RAD18</i><sup>-/-</sup>/<i>RNF8</i><sup>-/-</sup>細胞では顕著な減少がみられた。以上の</p>			

結果は、電離放射線によって生じた 2 重鎖切断の修復において Rad18 と Rnf8 は、DNA 損傷部位への Rad51 の集積に互いに独立して寄与することを示している。

**【考察】**

本研究で、同じ 2 重鎖切断でも電離放射線由来もしくはカンプトテシン由来によって、修復時に Rad18 と Rnf8 のあいだの機能的関連性が異なる、すなわち互いに独立して機能する場合も共同して機能する場合もあることが明らかになった。この結論は、将来のがん治療において、治療法を選択するときには有益である。

(論文審査の結果の要旨)

近年、DNA 2 重鎖切断の細胞応答にユビキチンを介したシグナル伝達が重要である事が報告され、ユビキチンライゲースである Rnf8 がこのシグナル伝達に重要である事が分かった。本研究では、Rnf8 を完全欠損させた時の 2 重鎖切断修復への影響を調べる為に、ニワトリ B リンパ球 DT40 細胞を用いて Rnf8 完全欠損細胞株を作製した。

結果、Rnf8 は相同組換え修復で機能する事がわかった。同じユビキチンライゲースである Rad18 も相同組換えに関与する事が報告されており、これらのタンパク質の機能的関連性を調べた。その結果、Rnf8 と Rad18 は 2 重鎖切断の由来によって、その関係性が変わることが分かった。抗がん剤と電離放射線による 2 重鎖切断の相同組換え修復経路で、前者では同一経路で働くのに対し、後者では互いに独立して機能していた。さらに詳しく解析した所、抗がん剤由来の 2 重鎖切断の場合、Rnf8 と Rad18 は非相同末端結合経路を抑制することで相同組換え修復を促進しているのに対し、放射線由来では、Rad51 のフォーカス形成を互いに独立して促進していることが明らかになった。

また、Rnf8 のユビキチンライゲースとしての活性は、2 重鎖切断形成後の細胞の生存に必須であるのに対し、Rad51 のフォーカス形成には部分的に必要であった。

以上の研究は、同じ 2 重鎖切断であっても、由来によって Rnf8 と Rad18 の関係性が変化する事を明らかにした。Rnf8 は肺がんや大腸がん由来の細胞で高発現が認められることから、これらのがんの治療においてより効果の高い治療法の確立に寄与する所が多い。

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、本学位授与申請は、平成 27 年 2 月 16 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