

(続紙 1)

京都大学	博士 (人間・環境学)	氏名	斎藤 裕一郎
論文題目	Regulatory mechanism of damage-dependent homologous recombination (DNA損傷量に依存した相同組換え修復制御機構の解明)		
(論文内容の要旨)			
<p>本論文は、DNA二重鎖切断修復機構である相同組換えの経路選択とその制御機構を生化学、細胞生物学および分子生物学的手法を用いて解析したものである。</p> <p>DNA二重鎖切断(以下二重鎖切断)は最も重篤なDNA損傷の一つであり、もし修復されずに残存すれば、たった一つの二重鎖切断が細胞死や遺伝子突然変異を引き起こす可能性がある。このため、Rad51蛋白質を中心とした相同組換え修復機構が二重鎖切断修復機構として機能し、原核生物から真核生物まで広く保存されている。一方、脊椎動物では相同組換え修復修復に加えて非相同末端再結合が機能することで、二重鎖切断は二経路のどちらかで修復される。二重鎖切断を誘発する放射線照射実験の結果から、脊椎動物細胞において中・高線量照射後の修復では非相同末端再結合が優位に機能することが知られているが、生理条件から低線量域での両経路の寄与およびその制御機構は明らかになっていない。そこで本研究では、まず分裂酵母を用いて生理条件での蛋白質複合体精製手法を確立し、その手法を応用して相同組換え蛋白質Rad51を二重鎖切断部位にリクルートするRad22蛋白質の放射線非照射時と照射後の活性制御機構を解析した。また、レポーター遺伝子を導入したヒト細胞を用いて低線量での両経路の活性を定量解析することで、両経路の寄与度が高線量の場合と異なることを示した。</p> <p>初めに、細胞から活性を保持したまま蛋白質複合体を精製する手法を確立するために、RNA分解酵素MRPの構成因子にエピトープタグを導入してMRP複合体の精製を試みた。分裂酵母の細胞粗抽出液から高純度のMRP複合体を精製し、その構成因子をプロテオーム解析した結果、既知の10因子を含む11種の蛋白質の同定に成功した。さらに精製した複合体が実際に十分な活性を保持していることを<i>in vitro</i>消化実験で確認した。次に、この手法を用いて相同組換え制御因子Rad22複合体を精製し、定常状態における相同組換え活性制御因子を探索した。プロテオーム解析により同定された16種の結合因子の強発現による相同組換え活性への影響を測定した結果、プロテアソーム蛋白質Bag101が相同組換えを抑制的に制御することが示唆された。<i>bag101</i>の強発現株、欠損株およびドメイン欠損株を作製して詳細な解析を行った結果、Bag101はRad22蛋白質とBAGドメインを介して結合し、プロテアソーム依存的にRad22蛋白質の分解を促進することで相同組換え修復を抑制することが明らかとなった。一方、放射線照射により二重鎖切断が誘発された</p>			

際には両蛋白質が解離し、その結果、Rad22蛋白質が安定化することで相同組換え修復が促進される。

酵母と異なり、ヒト細胞での放射線照射後の二重鎖切断修復では非相同末端再結合が優勢であるとされている。そこで初めに、レポーター遺伝子を導入したヒト細胞にさまざまな線量の γ 線を照射した後の両経路の活性を定量解析した結果、相同組換えは少数の二重鎖切断で迅速に活性化した後一定レベルで飽和するのに対して、非相同末端再結合は二重鎖切断量に依存して活性化がおり、飽和は見られなかった。この高線量で特異的に相同組換えが抑制される機構を探索するため、免疫染色法を用いてヒト細胞での放射線照射後のRAD51蛋白質の動態を解析した。その結果、高線量では早くても照射後8時間程度でRAD51が二重鎖切断部位に集積するのに対し、低線量では照射後1時間程度でこの集積が観察された。続いてRAD51の上流で一本鎖DNAに結合し、RAD51のリクルートに必要なRPA蛋白質の動態を観察した結果、RAD51と違いRPAの二重鎖切断部位への集積は高線量でも遅延しなかった。そこで、RPAの線量依存的なリン酸化に着目し、RPAのリン酸化に機能する非相同末端再結合の中心的蛋白質DNA-PKcsのノックダウン細胞の表現型を解析した。その結果、DNA-PKcsの消失により高線量照射後のRPAの集積が抑えられ、RAD51の二重鎖切断部位への集積が照射1時間後から観察された。

以上の結果より、非照射の生理条件、低線量から高線量照射条件下の両修復経路の活性化機構として以下のような制御モデルが示唆される。非照射時には両経路は抑制されており、低線量照射により発生した少数の二重鎖切断は相同組換えを活性化し、相同組換えにより選択的に修復される。さらに高線量照射により二重鎖切断量が増加するとDNA-PKcs蛋白質による相同組換えの抑制が起り、非相同末端再結合による修復が優位になることで、DNA損傷量に応じた修復経路の選択が行われる。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文は生化学、細胞生物学および分子生物学的手法を用いた一連の実験により、放射線非照射、そして低線量から高線量照射で発生したDNA二重鎖切断（以下二重鎖切断）量に応じた修復経路の選択性と制御機構を解析した研究である。

本研究では初めに、分裂酵母を用いて活性を保持したまま蛋白質複合体を精製し機能解析する手法を確立している。RNA分解酵素MRPの構成因子にエピトープタグを融合して発現させ、免疫沈降法で複合体を精製した。精製産物をプロテオーム解析した結果、既知の複合体因子である10種の蛋白質に加えて1種の新規蛋白質が構成因子として同定された。また、精製産物が既知の基質を効率よく分解することからも機能的複合体が精製されたと判断している。本研究で用いた二段階の精製法は既存の精製法と比べても十分な精製度であり、生理機能を保持したまま精製できたことから複合体の機能解析に有用だとする結論は妥当である。

次に、この手法を用いて二重鎖切断修復機構の一つである相同組換え修復蛋白質Rad51を二重鎖切断部位にリクルートするRad22蛋白質複合体の機能解析を行っている。プロテオーム解析の結果16種の結合因子が同定され、それぞれの強発現株を作製して相同組換え活性への影響を解析した。その結果、プロテアソーム蛋白質Bag101が相同組換えを抑制的に制御することを明らかにした。これらは、相同組換え検出レポーター実験とRad22フォーカス形成を指標に慎重に制御因子を探索し、相同組換えの活性化因子および抑制因子を網羅的に解析した有用な実験結果である。bag101の強発現株、欠損株を作製して相同組換え活性の定量や修復活性の定量を行い、Bag101が相同組換えを抑制することを確認している。また、免疫沈降法を用いてBag101がBAGドメインを介してRad22と結合し、蛋白質分解を促進することで相同組換えを抑制すること、逆に放射線照射後に両蛋白質が解離してRad22が安定化することにより相同組換えが活性化する機構を発見している。非照射時には過剰な組み換えがおこらないように相同組換えを抑制し、照射時にはBag101とRad22が解離して相同組換えの速やかな活性化につながるという結論は合理的であり、損傷の有無により修復蛋白質の発現を制御する新しい機構と考えられる。

高線量の放射線照射を用いた研究によりヒト細胞の二重鎖切断修復には相同組換えよりも非相同末端再結合の寄与が大きいことが示されているが、生理条件および低線量での両経路の寄与について詳細に解析した報告は皆無である。そこで、本論文では修復レポーター遺伝子を組み込んだヒト培養細胞を用いて照射線量の違いによる修復経路の選択性を解析している。その結果、少数の二重鎖切断存在下では相同組換

え経路が活発であるが、二重鎖切断量が増加すると一定レベルで飽和してそれ以上は活性化しないことを見いだした。逆に、非相同末端再結合は二重鎖切断量に依存して活性化し、結果として先行する報告に見られるように非相同末端再結合の寄与が大きくなる。これまでの二重鎖切断修復研究において二重鎖切断量により両経路の活性化パターンに違いが生じるかどうかを検証した例はなく、修復研究におけるこの発見の意義は大きい。

次に、照射線量により異なる修復経路が選択される機構を解明するために、免疫染色法によりヒト細胞のRAD51蛋白質の核内動態を解析した。その結果、高線量照射の場合には二重鎖切断部位へのRAD51の集積が遅く、低線量照射では早くなることを発見している。さらに、照射線量によりRAD51の集積速度が異なる原因として、照射線量に比例して活性化するDNA依存的リン酸化酵素DNA-PKcsに着目し、DNA-PKcsのノックダウン実験を行っている。DNA-PKcsノックダウン細胞では高線量照射時でもRAD51の早い集積が見られることから、DNA-PKcsが高線量での相同組換えを抑制しているのではないかと推察している。このような分子レベルの解析から、放射線のDNA損傷修復研究において極めて重要なモデルを提唱している。

本研究は放射線非照射時の生理条件、低線量から高線量照射までのそれぞれの状態における一連の修復活性制御について解析し、酵母とヒト細胞を用いて普遍的な相同組換え修復制御機構の解明を試みている。今後、二重鎖切断に起因する細胞死や発癌機構の解明ならびに放射線被ばくのリスク評価に貢献すると期待できる。なお、本論文の主要部分は2報の国際学術誌に掲載された。

従って本学位申請論文は、人間と環境との良好な関係を創生する自然科学的考究を目的とする相関環境学専攻分子・生命環境論講座の理念にかなったものと言える。よって、本論文は博士（人間・環境学）の論文として価値あるものと認める。また、平成27年1月16日の公聴会において、論文内容とそれに関する事項について諮問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては当分の間、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日： 2015年 6月 23日以降