

京都大学	博士 (医学)	氏名	清水直登
論文題目	The MRE11 nuclease promotes homologous recombination not only in DNA double-strand break resection but also in post-resection in human TK6 cells (MRE11ヌクレアーゼは、DNA切断端の削り込み以後の過程にも機能し、相同組換えを促進する)		
(論文内容の要旨)			
<p>DNA二重鎖切断(DSB)は、1つでも発生後一定時間再結合されないまま残ると細胞自殺を起こす。DSBの発生が、放射線治療の作用機序である。DSBは、非相同末端結合経路と相同組換え経路によって修復(再結合)される。非相同末端経路は、細胞周期を通じてDSB修復を行うのに対し、相同組換え経路はS/G₂期で活性化する。相同組換え欠損細胞では、放射線に超感受性を示すことから、DSB修復における相同組換えの役割は極めて大きい。相同組換えの修復効率は、放射線の治療効果を決定する。</p> <p>相同組換えは、DSB切断端の5'末端からヌクレアーゼによる削り込みを受ける(ステップ1)ことで開始される。削り込みによってできる3'末端が突出した一本鎖DNAは、RAD51蛋白質依存的に姉妹染色分体の相同領域に侵入する(ステップ2)。侵入した一本鎖DNAの3'末端からDNA合成が起こる。DNA合成後、DNA四本鎖からなる中間体、Joint molecule構造が生じる。このJoint molecule構造は、構造特異的エンドヌクレアーゼGEN1などによって切断され(ステップ3)、相同組換えが完結する。</p> <p>MRE11ヌクレアーゼは、相同組換え修復の初期反応であるDSB切断端の5'末端の削り込み反応に関与すると言われている。マウスのMRE11ヌクレアーゼ活性欠損MEF細胞は、MRE11正常細胞に比べ、削り込み反応が50%程度減弱する。以前の報告で、50%程度の削り込み反応低下では、相同組換え頻度に影響を与えないことが示されている。酵母及び哺乳類細胞におけるMRE11ヌクレアーゼ活性欠損及び遺伝子欠損の表現型は、極めて重篤な相同組換え欠損を示す。したがって、削り込み反応におけるMRE11の機能だけでなく、MRE11変異による重篤な組換え欠損が説明できるかは不明である。本研究の目的は、相同組換えにおけるMRE11のDSB切断端の5'末端の削り込み反応以外の機能を解明し、MRE11変異による重篤な組換え欠損を示す原因を明らかにすることである。</p> <p>本研究では、MRE11を条件的に欠損(MRE11^{fl})あるいはヌクレアーゼ活性欠損(MRE11^{H129N})することが可能なヒトTK6細胞を使った。相同組換え進行を調べるために、DSB発生に応答して形成されるRAD51 fociの経時変化を調べた。RAD51は、姉妹染色分体の相同領域に侵入する反応(ステップ2)に必須であり、相同組換え進行を解析する分子マーカーである。MRE11^{fl}及びMRE11^{H129N}細胞は、放射線照射後、RAD51 foci形成が野生型細胞と同程度であった。一方で、これらの細胞では、RAD51 foci消失が遅れた。これらのことは、5'末端の削り込み反応以降の相同組換え過程にMRE11が重要な機能を担っていることを意味していた。またMRE11^{fl}及びMRE11^{H129N}細胞では、野生型に比べ、相同組換え中間体(Joint molecule構造)であるIso-chromatid breakが顕著に増加した。GEN1ヌクレアーゼの過剰発現によって、放射線照射によって増加したIso-chromatid break形成が抑制された。このことから、TK6細胞において、MRE11ヌクレアーゼは、5'末端の削り込み反応以降に形成される組換え中間体の解消(ステップ3)に重要な役割を果たしていることがわかった。将来、相同組換えに複数の機能を担うMRE11を阻害することで、放射線治療の効果を高めることが期待される。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

DNA二重鎖切断(DSB)は、最も重篤なDNA損傷とされる。DSBは、非相同末端結合経路と相同組換え(HR)経路によって修復される。相同組換え欠損細胞は、DSBを発生させる放射線に対し超感受性を示すため、DSB修復における相同組換えが果たす役割は大きい。本研究は、HRの開始反応(DNA切断端の削り込み)に機能することが知られているMRE11ヌクレアーゼの機能解析を行い、相同組換えにおける新しいMRE11の機能を示唆する結果を得た。

ヒトTK6B細胞から樹立したMRE11欠損細胞を使い、放射線によって発生するDSBのHR修復の進行を、RAD51 fociを検出することによって調べた。このMRE11欠損及びヌクレアーゼ欠損細胞では、HR開始反応は正常であったが、HR反応の中間体が蓄積していた。HR中間体の解消に機能するGEN1ヌクレアーゼの過剰発現によって、MRE11ヌクレアーゼ欠損によって蓄積したHR中間体が解消された。このことは、GEN1の基質となるHR中間体がMRE11ヌクレアーゼ欠損細胞において蓄積していること、MRE11ヌクレアーゼ活性が、GEN1とは独立して、中間体の解消を行なっていることを示唆していた。以上の研究は、HR反応のMRE11ヌクレアーゼによる新しい制御機構解明に貢献し、放射線治療の増感剤開発に向けた基礎的知見を提供するものと期待される。

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、令和2年11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 日以降