京都大学	博士（医　学）	氏　名	OLIVEIRA DOUGLAS VINICIUS NOGUEIRA PEREZ DE
論文題目	Histone chaperone FACT regulates homologous recombination by chromatin remodeling through interaction with RNF20 （ヒストン・シャペロン FACT は RNF20 との相互作用を介したクロマチン・リモデリングにより相同組換えを制御する）		

（論文内容の要旨）

大腸菌からヒトまで保存されている相同組換え修復機構は電離放射線や酸化ストレスなどにより誘発される DNA 二重鎖切断を再結合させる。相同組換え修復は BRCA1 および RAD51 複合体が DNA 切断端に作用して、3’側 overhang 単鎖 DNA を生成、続いて細胞内の相同配列 DNA の検索により開始する。これら初期反応の蛋白が DNA に接近するにはクロマチン構造が緩む必要がある。先行する研究により、ユビキチン E3 リガーゼ RNF20 がヒストン H2B のユビキチン化によりクロマチン構造を緩めて、損傷 DNA への相同組換え蛋白の到達を可能にすることが報告された。しかし、RNF20 蛋白自体がこのクロマチン構造を超えて損傷 DNA にどのように接近するかは未解決のままである。

本研究は、この相同組換えのクロマチン・リモデリングにおいてヒストン・シャペロン FACT (facilitates chromatin transcription)が重要であることを明らかにした。FACT は SUPT16H と SSRP1 から構成される複合体で、転写ではヌクレオソームに結合してヌクレオソーム構造を緩ませると言われる。細胞の免疫染色により、SUPT16H は放射線照射後に DNA 二重鎖切断部位に集積することが確認できた。そこで同蛋白をノックダウンしたところ、放射線照射後の相同組換え蛋白の損傷部位への集積低下、レポーター遺伝子でアッセイした相同組換え能の低下、さらに放射線とマイトマイシン C に対する高感受性がみられた。これらは RNF20 が欠損した細胞での観察結果と同じであり、また SUPT16H 蛋白のノックダウンにより RNF20 の損傷部位への集積も低下することが確認できた。従って、SUPT16H が RNF20 経路に関わっていると思われる。実際、SUPT16H が放射線照射依存的に RNF20 と結合することが確認できた。RNF20 の RING-finger ドメインの変異により結合が出来なくなることから、同ドメインで両蛋白が結合していると思われる。そこで、RING-finger ドメインに変異を導入した細胞を用いて免疫染色を行ったところ、RNF20、RAD51、BRCA1 の損傷部位への集積が異常になるが、SUPT16H の集積には影響しなかった。このことから、SUPT16H が RNF20 経路の上流にあることが判明した。興味深いことに、転写では PAF1 蛋白が、SUPT16H と RNF20 の結合を仲介しているとされるが、同蛋白をノックダウンしても相同組換え修復における RNF20 経路への影響は見られなかった。一方、SUPT16H のノックダウンが RNF20 による H2B ユビキチン化とそれに続くクロマチン・リモデリング因子 SNF2h の損傷部位への集積を阻害したことから、同蛋白がクロマチン・リモデリングを制御していることが示唆された。これは、SUPT16H ノックダウンでみられた相同組換え蛋白の集積異常や H2B ユビキチン化の低下がクロマチン構造弛緩剤処理により緩衝されることで確認できた。

以上より、FACT は RNF20 を損傷部位にリクルートして、相同組換え修復に必要なクロマチン・リモデリングを開始することが示された。相同組換え機構に異常を呈する疾患のほとんどが高発がん性であり、また同患者細胞の多くは放射線高感受性である。一方、相同組換えが低下した細胞が PARP 阻害剤に対して高感受性であることを利用したがん治療の臨床研究も進んでいる。本研究成果は将来の放射線発がん機構の解明やがん治療研究へ有用な情報を提供すると期待される。

（論文審査の結果の要旨）

相同組換え修復は放射線照射後のゲノム安定化に必須である。また、その欠損が薬剤に対する感受性を亢進させることから、有力ながん治療法としても研究が行われている。相同組換え修復においては、RNF20 蛋白によるヒストン H2B のユビキチン化がクロマチン構造を緩めて相同組換え蛋白の損傷 DNA への到達を可能にさせる。しかし、RNF20 蛋白自体がこのクロマチン構造をどのように乗り超えるかは不明であった。本研究は、ヒストン・シャペロン FACT の構成成分 SUPT16H のノックダウンにより、損傷部位への相同組換え蛋白やクロマチン・リモデリング因子 SNF2h の集積異常、およびその結果として相同組換え能が低下することを示した。SUPT16H 蛋白のノックダウンおよび RNF20 の RING-finger ドメインの変異により RNF20 および相同組換え蛋白の集積に異常をきたすが、RNF20 のノックダウンおよび RING-finger ドメイン変異は SUPT16H の集積に影響を与えないことから、SUPT16H が RNF20 経路の上流にあることがわかった。このように、FACT が RNF20 を損傷部位に集積させ、相同組換えに必要なクロマチン・リモデリングを開始することが示された。

以上の研究は相同組換え機構の解明に貢献し、がん治療と放射線発がん研究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みとめる。

なお、本学位授与申請者は、平成２６年１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