

(続紙 1)

京都大学	博士（ 人間・環境学 ）	氏名	柳原 啓見
論文題目	NBS1 Recruits RAD18 via a RAD6-Like Motif and Regulates Translesion DNA Synthesis (RAD6様モチーフを介したNBS1によるRAD18の損傷部位へのリクルートと損傷乗り越えDNA合成の制御)		
(論文内容の要旨)			
本論文は、DNA修復蛋白NBS1の紫外線損傷発生時に於ける修復機能を、細胞生物学ならびに分子生物学的手法を用いて検証したものである。 ナイミーヘン染色体不安定症候群（Nijmegen breakage syndrome; NBS）は電離放射線及び紫外線感受性、染色体不安定性、高発がん性を特徴とするヒト劣性遺伝病である。NBSの原因遺伝子NBS1は電離放射線照射後の細胞周期チェックポイントや相同組換え修復に機能することが知られているが、紫外線感受性の原因は不明である。 紫外線によるDNA損傷は、DNA構造の歪みにより複製や転写を阻害し、細胞死、突然変異などの細胞障害をもたらす。このため、真核生物細胞は防御機構として損傷乗り越えDNA合成機構によりこの危機を回避する。損傷乗り越えDNA合成は、RAD6/RAD18ユビキチン化酵素複合体がDNAクランプのPCNAをユビキチン化して、通常のDNA複製酵素から損傷乗り越え型複製酵素（Pol η）に交換することにより開始する。本研究は、NBS1がRAD18の損傷部位への集積に必要であり、その欠陥により引き起こされた損傷乗り越えDNA合成の機能停止が、細胞致死感受性や突然変異頻度の増加をもたらすことを示した。 初めに、NBS患者細胞やNBS1欠損マウス細胞を用いたコロニー形成法で解析したところ、一部の患者細胞を除いて紫外線高感受性が確認できた。さらに、siRNAを用いたNBS1ノックダウン細胞でも紫外線感受性が確認され、しかもノックダウンによりNBS1量が低下するに従い紫外線感受性が増加した。このことは、紫外線感受性を呈さない患者細胞ではNBS1蛋白が部分的に発現していることと一致する。続いて、NBS1が損傷部位に局在するかどうかを、紫外線局所照射法を用いて解析した。細胞核の局所に損傷を誘発し、損傷DNAを認識する抗体と修復蛋白NBS1の抗体を用いて細胞を二重蛍光免疫染色した結果、両蛋白が同じ部位に集積する共局在性が確認できた。また、DNA複製期の細胞においてのみNBS1の集積が観察されたことから、複製期に紫外線照射により生じたDNA損傷に対するNBS1の作用が示された。 NBS1のDNA複製期の細胞応答機能を検討するために、蔗糖密度勾配遠心法を用いて複製DNAの伸長速度を測定した。この結果、NBS1欠損マウス細胞では、紫外線照射後の複製DNAの伸長速度が有意に低下しており、損傷乗り越え合成が機能していないことが確認できた。これと一致して、NBS1欠損マウス細胞ではRAD18やPol ηの核内への集積が抑制され、PCNAのユビキチン化の低下が見られた。また、Pol ηノックダウン細胞と同様にNBS1ノックダウン細胞でも紫外線による突然変異頻度が増加し、しかも、両蛋白を同時			

にノックダウンした時でも突然変異がさらに増加する事はなかった。これらの結果から、NBS1はPol etaと同じ修復経路で機能することが示唆された。

次に、分子生物学的手法により、NBS1とRAD18の相互作用を検討した。細胞核抽出液を用いた免疫沈降法により、NBS1とRAD18が紫外線照射後に結合することが観察された。組換え蛋白を用いた*in vitro* 解析でも同様の結果が得られ、NBS1とRAD18が他の蛋白を介さずに直接結合することが確認できた。続いて、NBS1のRAD18結合部位を同定後、その結合部位を欠損した変異体を用いて解析した。この結果、RAD18結合部位欠損細胞では、PCNAのユビキチン化活性低下、RAD18やPol etaの損傷部位への集積異常、および紫外線感受性が確認できた。しかし、このNBS1変異体ではNBS1が正常に損傷部位に集積した。一方、NBS1やRAD6の各RAD18結合領域間でのアミノ酸配列の類似性が見られ、またNBS1とRAD18の結合が類似アミノ酸配列を有するRAD6により阻害された。このことから、NBS1とRAD6は構造的にも機能的にも競合して、RAD18と結合することが明らかとなった。

以上の結果より、損傷乗り越えDNA合成は、紫外線照射後にRAD6に置き換わってRAD18と結合したNBS1が、DNA損傷部位にRAD18を集積させることにより開始することが明らかとなった。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、細胞生物学ならびに分子生物学的手法を用いた実験系により、DNA修復蛋白NBS1の紫外線損傷の修復経路への関与を明らかにし、その制御メカニズムを解析した研究報告である。

本研究は初めに、ヒト劣性遺伝病のナイミーヘン染色体不安定性症候群 (NBS) の原因遺伝子NBS1の欠損細胞が紫外線高感受性かどうかを検証している。一部のNBS患者細胞やNBS1欠損マウス細胞で紫外線高感受性が観察された。さらにsiRNAを導入したノックダウン細胞では、NBS1の発現量の低下に伴って紫外線感受性が増加することを確認した。逆に紫外線高感受性が見られない患者細胞では、NBS1が部分的に発現していることから、NBS1の欠損が紫外線高感受性をもたらすという結論は一貫しており、合理的である。

DNA修復蛋白の多くが核内フォーカスとして観察される損傷部位への集積を示すことが知られている。NBS1もまた紫外線照射後に核内フォーカスを形成するので、紫外線損傷の修復に関与していると推論した。実際、このことは、NBS1欠損マウス細胞では、損傷乗り越えDNA合成機構に機能する複製酵素Pol etaの核内フォーカスが有意に減少したこと、またDNA長の直接測定により複製後修復能が有意に低下することから実証されている。次に、NBS1がPol etaと同経路で機能しているかどうかを検証している。Pol etaをノックダウンした細胞と同様に、NBS1をノックダウンした細胞でも突然変異頻度が増加し、紫外線高感受性を示した。さらに、両蛋白を同時にノックダウンしても、さらなる紫外線感受性および突然変異の増加が見られないことから、NBS1とPol etaが同経路で損傷乗り越えDNA合成に機能していると結論づけている。これは、NBS1欠損の患者細胞やマウス細胞およびNBS1ノックダウン細胞が紫外線に起因するDNA損傷に高い感受性を示すことと一致しており、妥当な結論である。

上記の結果は、NBS1がPol etaの損傷部位への集積の上流過程で機能することを示唆しているので、次にNBS1の損傷乗り越えDNA合成の開始における役割を解析している。損傷乗り越えDNA合成の開始には、損傷部位にユビキチン化酵素であるRAD18/RAD6が集積し、DNAクランプのPCNAをユビキチン化することが必要である。実際、NBS1欠損マウス細胞を用いた免疫染色実験では、RAD18のフォーカスの形成に異常がみられ、PCNAのユビキチン化活性も低下していた。続いて、NBS1の様々な変異体を作製しRAD18との結合を解析したところ、C末端側の650-665アミノ酸配列を欠失した変異体ではRAD18と結合できないことを発見している。従って、NBS1のこの領域がRAD18との結合ドメインであると結論している。このことは、同領域が紫外線感受性、RAD18およびPol etaフォーカス形成、ならびにPCNAのユビキチン化に必須であることにより確認している。また、興味深いことに、同部位欠失NBS1変異体でもNBS1が紫外線照射後に正常のNBS1フ

オーカスを形成できることを観察している。これらことから、NBS1がRAD18と結合して、同蛋白を損傷部位に集積することが損傷乗り越えDNA合成の開始に必要であると結論づけている。この結論は論理的であり、また慎重な実験により実証されている。

次にRAD18のC末端側の特定領域を欠失した変異体でもNBS1と結合できないことを観察している。この領域はRAD6との結合に必要であることが既に知られているので、アミノ酸配列を解析した。この結果、NBS1及びRAD6の各RAD18結合領域間に類似の構造を発見している。さらに組換え蛋白を用いた実験により、RAD6の添加によりNBS1とRAD18の結合が阻害されることから、構造的にも機能的にもNBS1とRAD6が競合関係にあると結論づけている。これらのことから申請者は、紫外線照射後にRAD6に置き換わってRAD18と結合したNBS1が、RAD18をDNA損傷部位にリクルートすることにより損傷乗り越えDNA合成を開始する機構を提唱している。これは、極めて興味深い発見に基づいた合理的なモデルである。

本研究は、NBS1が、先行研究の電離放射線照射後のチェックポイント制御や相同組換え修復だけでなく、損傷乗り越えDNA合成という新たな紫外線損傷の修復制御に関わっていることを実証している。今後の紫外線の人体への影響研究分野での貢献が期待できる。なお、本論文の主要部分は高く評価され国際学術雑誌に掲載された。

従って、本学位申請論文は、自然と人間の調和的な共生を可能にする新しい科学・技術のあり方を探求する関連環境学専攻の目的にふさわしい内容を備えたものと言える。

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23年9月7日の公聴会において、論文内容とそれに関した事項について諮問を行った結果、合格と認めた。

Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降