

氏 名	ふくしまとおる 福 島 徹
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2489 号
学位授与の日付	平 成 14 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Genetic analysis of the DNA-dependent protein kinase reveals an inhibitory role of Ku in late S-G2 phase DNA double-strand break repair. (DNA 依存性にタンパクをリン酸化するキナーゼの構成タンパク質 Ku が後期 S-G2 期における DNA 二本鎖切断修復において抑制的に働く役割に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 丹 羽 太 貫 教 授 平 岡 眞 寛 教 授 千 葉 勉

論 文 内 容 の 要 旨

細胞のゲノム DNA は電離放射線によって二重鎖切断 (DSB) が誘導され、これらは 1 個でも修復されないと細胞死の原因となる。高等真核細胞における DSB の修復経路には相同組換え修復 (Homologous Recombination; HR) と非同源性二本鎖末端結合 (non-homologous end-joining; NHEJ) の二種類が知られている。前者では、DSB に Rad51, Rad54 等が結合し、その DNA・タンパク質複合体が相同な塩基配列を他の染色体などから探し、それを鋳型にして DNA 合成を伴って損傷を修復する。一方後者では、まず Ku70/80 ヘテロダイマーが DSB 末端に結合して DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) を活性化し、DNA 断端同士を直接的に結合する。これら二つの経路は相補的に働き、特に G1-early S 期では NHEJ が、late S-G2 期では HR が優位であるとされている。この点に着目して今回、ニワトリ B 細胞株 DT40 において Ku70, DNA-PKcs の欠損細胞株と Ku70/DNA-PKcs 二重欠損細胞株を樹立し、それぞれの表現型を調べて NHEJ と HR の競合の存在について検討した。

これらを用いて γ 線照射による感受性検索を行ったところ、Ku70 欠損細胞株は γ 線に対して野生型より HR が優位である late S-G2 期にのみ耐性となった。この現象をさらに解析するために、DNA-PKcs 欠損細胞株を作製して解析したところ、late S-G2 期では野生型より感受性となった。そこでこれらの二重欠損細胞株を検索したところ、KU70 単独欠損細胞株と同レベルの感受性を示した。これらの結果から、DNA-PKcs の有無ではなく Ku70 の有無で放射線感受性が変化することがわかった。この変化は late S-G2 期に特異的に起るので、Ku70 の有無で NHEJ の効率が変化するのではなく HR の修復効率が変化することが示唆された。

次に、Ku の非存在下では HR がむしろ促進されるという仮説を直接的に検証するために、M. Jasin らが作成した、特殊な制限酵素 I-Sce I を発現させて人工的に DSB を誘導し、HR の活性を解析するコンストラクトを各細胞株にノックインし、それぞれの株での相同組換え頻度を測定した。その結果、Ku70 欠損細胞株で野生型より相同組換え頻度の 2 倍以上の増加が認められたことから、Ku タンパクが HR による修復を抑制すると結論づけた。

以上より、DSB 修復において NHEJ と HR の 2 種類の経路は、HR が優位である late S-G2 期において互いに競合すると結論づけた。NHEJ 経路が HR 経路と競合するのは、Ku70 が DSB に結合することによると考えられた。

DSB を誘導するタイプの癌治療である電離放射線照射やアルキル化剤、クロスリンカーなど抗癌剤の効果に、これら修復経路の活性が多大な影響を及ぼすことが知られている。今回の研究成果は、癌治療後の、細胞側の応答反応の全貌の解明と、治療法の選択の改良点を見出す方法に貢献できるものと考えられた。

論文審査の結果の要旨

細胞の DNA は、電離放射線や抗癌剤によって二重鎖切断 (DSB) が誘導されると細胞死の原因となる。高等真核細胞の DSB 修復経路には、相同組換え修復 (HR) と非相同性二本鎖末端結合 (NHEJ) の二種類が知られている。これらの経路は G1-earlyS 期では NHEJ が、late S-G2 期では HR が優位とされているが、二経路が制御される詳細な機構はまだ解明されていない。本研究で申請者らは、ニワトリ B 細胞株 DT40 を用いて、NHEJ で DSB に結合して働く Ku70, DNA-PKcs の欠損株と Ku70/DNA-PKcs 二重欠損株を樹立し、NHEJ と HR の競合の仕組みについて検討した。

γ 線照射による感受性検索では、HR 優位である late S-G2 期では Ku70 欠損株が野生型より耐性となり、DNA-PKcs 欠損株は感受性となったが、これらの二重欠損株は Ku70 欠損株と同程度の耐性を示した。更に、制限酵素 I-Sce I を発現させて細胞に人工的な DSB を誘導して相同組換え頻度を調べた実験では、Ku70 欠損株で野生型より 2 倍以上の頻度の増加が認められた。これらの結果から、二種類の DSB 修復経路は late S-G2 前において互いに競合し、Ku70 が DSB に結合することが HR を抑制すると示唆された。

以上の研究は、DSB を誘導する癌治療における細胞の反応機構の解明に貢献し、腫瘍医学の進展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認める。なお、本学位授与申請者は、平成14年 2 月 20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。