

京都大学	博士（ 医科学 ）	氏 名	王 欣
論文題目	PTIP promotes DNA double-strand break repair through homologous recombination (PTIP は相同組換えによる DNA 二本鎖切断修復を促進する)		
(論文内容の要旨)			
DNA 二本鎖切断 (DNA Double-Stranded Breaks, DSBs) は、DNA 損傷の中で、もっとも重篤なものである。DSB が一定時間内に修復されないと、チェックポイント機構が活性化され、細胞がアポトーシスを実行する。DSB は、電離放射線、活性酸素などの変異原により形成される。一部の抗がん治療薬も DSB を作る。抗がん剤Etoposide と ICRF-193 は、トポイソメラーゼⅡの作用を抑制することにより、直接的に DSB を作る。抗がん剤カンプトテシン(camptothecin) は、トポイソメラーゼⅠの作用を抑制し、一本鎖 DNA 損傷を誘導する。その損傷鋳型鎖が複製される時に、損傷部位で DNA 複製フォークが停止することが原因で、DSB が形成される。DSB 修復は、主に非相同末端結合経路(Non-Homologous End-Joining, NHEJ) と相同組換え経路(Homologous Recombination, HR)により行われる。HR は、カンプトテシンにより誘導された DSB を修復する。これに対して、NHEJ は、ICRF-193 により誘導された DSB を修復する。Etoposide が誘導した DSB は、主に NHEJ 経路で修復され、一部は HR でも修復される。よって、遺伝子破壊細胞のカンプトテシン、ICRF-193 と Etoposide に対する感受性を調べることで、その遺伝子が機能する DSB 修復経路を推定することができる。 PTIP (Pax2 Transactivation domain-Interacting Protein) は、核タンパク分子で、6 つの BRCT (BRCA1 Carboxyl-Terminal) ドメインをもつ。siRNA により PTIP を除去したヒト細胞は、電離放射線に高感受性を示すので、PTIP は DNA 修復に関与することが示唆された。しかし、マウス <i>PTIP</i> 遺伝子破壊は胎生致死のため、<i>PTIP</i> 遺伝子破壊細胞株が作製できず、PTIP の機能には未解明な点が多かった。 PTIP の DNA 修復における機能を解明するために、ニワトリ B リンパ細胞 DT40 株から、<i>PTIP</i> 欠損細胞 (<i>PTIP</i>^{-/-}) を作製した。DT40 細胞は、標的組み換え効率が高く、かつ細胞の表現型が非常に安定という特徴をもつ。 <i>PTIP</i> 欠損細胞の表現型を解析した。野生型と比べ、<i>PTIP</i>^{-/-}細胞は成長速度が遅れていた。その原因の一つは、分裂中に一部の細胞がアポトーシスすることによる。そのアポトーシスが DSB により誘導されている可能性を検討するために、DSB マーカーであるリン酸化ヒストン H2AX 認識抗体で、細胞免疫染色を行った。その結果、<i>PTIP</i>^{-/-}細胞では、リン酸化 H2AX foci が多く観察されたので、分裂中に自然発生する DSB がアポトーシスの原因であることが分かった。DSB の自然発生は、多くの HR 欠損細胞で観察される表現型である。各種 DNA 損傷剤に対する感受性実験では、<i>PTIP</i>^{-/-}細胞はカンプトテシン、電離放射線に高感受性を示した。一方、ICRF-193 には感受性がなく、Etoposide に抵抗性を示した。これらの結果から、PTIP 欠損は、NHEJ 経路には影響がなく、HR 経路の機能を低下させることが示唆された。さらに、PTIP 欠損が HR 経路の機能を低下させることを実証するために、細胞に導入した人工 HR 基質を用い、HR 経路の修復効率の測定実験を行った。ニワトリ <i>PTIP</i> 欠損及び siRNA によるヒト PTIP 除去は、HR による修復効率を顕著に低下させた。以上の結果から、PTIP は、HR による DSB 修復を促進することが分かった。 PTIP は転写制御因子として機能することが報告されている。このため、HR 経路が低下する原因は、PTIP の欠損による、DNA 修復因子の遺伝子の転写量が変化することに起因する可能性もある。そこで、Microarray 解析を行った。<i>PTIP</i>^{-/-}と野生型細胞との間に、HR 経路に関与する既知遺伝子の発現は、顕著な変化が見られなかった。よって、PTIP の転写制御機能が HR による DSB 修復に影響する可能性は低いと考えられる。			

本論文は、遺伝学的な手法により、PTIP が HR による DSB 修復に機能するということを示唆した。PTIP の DNA 修復経路における機能の解明は、DNA 損傷を誘導することによって効果を発揮する抗がん剤の作用機序の理解を深めることから、有用な研究として評価できる。
（論文審査の結果の要旨） 本学位授与申請者は、PTIP (Pax2 Transactivation domain-Interacting Protein) の役割を解明するために、ニワトリ B リンパ細胞 DT40 株から、 <i>PTIP</i> 欠損細胞 (<i>PTIP</i> ^{-/-}) を作製し、表現型解析を行った。PTIP は、DNA 修復における機能が想定されていた分子であるが、マウス遺伝子破壊は、胎生致死のため、遺伝子欠損細胞を樹立できず、siRNA によって PTIP を一過性に減少させた細胞でしか、PTIP の機能解析はできなかった。申請者は、遺伝子破壊の技術を用いて、PTIP 遺伝子破壊細胞の樹立に成功した。PTIP 欠損細胞の放射線や抗がん剤などへの感受性試験の結果から、PTIP 欠損は、NHEJ (Non-Homologous End-Joining) 経路に影響なく、HR (Homologous Recombination) 経路を低下させることが示唆された。さらに、この推測を検証するために、人工相同組み換え基質 DNA を用いて、ニワトリ <i>PTIP</i> 欠損細胞とヒト PTIP 除去細胞とで相同組み換え効率を測定した。その実験結果から、PTIP は、HR による DSB (DNA Double-Stranded Breaks) 修復に機能することが分かった。 以上の研究は、PTIP の DSB 修復経路における役割の解明に貢献し、抗ガン治療の作用機序の更なる理解に資するところが多い。 したがって、本論文は博士 (医科学) 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 2 2 年 2 月 1 2 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格とみとめられたもの
要旨公開可能日： 年 月 日 以降