

氏 名	おか だ たかし 岡 田 崇
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2596 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 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 外 科 系 専 攻
学位論文題目	Involvement of Vertebrate Pol κ in Rad18-independent Postreplication Repair of UV Damage (脊椎動物の DNA ポリメラーゼ κ は, Rad18 非依存的に紫外線 DNA 損傷の複製後修復に関与する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 藤 堂 剛 教 授 丹 羽 太 貫 教 授 小 川 修

論 文 内 容 の 要 旨

DNA の損傷は、紫外線や化学物質などの環境要因だけでなく、細胞活動で生じる活性酸素のような内的要因によっても常に生じている。遺伝情報の正確な伝達や保持のためには DNA 損傷の修復は必須であり、DNA 修復の異常は遺伝子の変異蓄積、染色体異常や細胞死、癌化・老化や遺伝疾患の原因になっている。

DNA 修復タンパクのアミノ酸配列は大腸菌・酵母から高等動物まで高度に保存されている。修復タンパクの生化学的機能解析、あるいは修復遺伝子の欠損細胞株や KO マウス、ヒト遺伝疾患（色素性乾皮症など）の理解などに基づく遺伝学的解析により、いくつかの DNA 修復経路が確立された。

DNA ポリメラーゼ κ (Pol κ /POLK) は、大腸菌で複製後修復に関わる DNA ポリメラーゼ IV/DinB のホモログである。複製後修復とは、複製時に鋳型鎖に残存・生成した損傷をバイパス・修復する経路のことで、特殊なポリメラーゼ群が損傷を乗り越えて DNA 合成を行い（損傷乗越え合成：TLS）複製を継続できること、このとき複製エラーが生じる可能性があること、また高等真核生物では TLS の他、相同組換え（HR）も働いていることなどが近年明らかにされてきている。

この論文では、高等真核生物では未解明であった Pol κ の機能を、DT40 細胞で KO 細胞を作成することにより、遺伝学的に解析した。ニワトリ B リンパ細胞株である DT40 は、HR による標的遺伝子組換え能が著しく亢進しており、酵母や ES 細胞同様、遺伝子破壊株が効率良く作成できる特徴をもつ。これまでの生化学的研究では、Pol κ はベンゾピレン（BaP）、アセトアミノフルオレン（AAF）による損傷を乗越え合成できるが、紫外線損傷であるピリミジンダイマーは乗り越えられないとされていた。

DT40 POLK 欠損株は野生株とほぼ同様の増殖能を示した。しかし DNA 損傷の誘導処理を行った場合、BaP、AAF には野生株と同様の感受性を示したが、紫外線に対しては強い感受性を示した。この結果は細胞増殖阻止実験の他、染色体分析にても確認された。紫外線感受性はヒト及びニワトリ POLK の再発現により抑制され、細胞周期複製早期に特異的であった。以上の結果から、生化学的研究のデータは in vivo を必ずしも反映していないことが確認された。

POLK が既知の紫外線損傷修復系に属するかどうかを調べる目的で POLK と、XPA あるいは RAD18 との二重欠損株を作成した。XPA は紫外線損傷修復の主要経路であるヌクレオチド除去修復系の、RAD18 は酵母で複製後修復の最上流にある遺伝子である。これら二重欠損株はいずれも、各単一遺伝子欠損株の相加的な紫外線感受性を表した。このことは POLK が上記のいずれの経路とも異なる経路に属している可能性を示す。すなわち、POLK は紫外線損傷修復において RAD18 とは異なる複製後修復の経路に関与していると考えられた。

また、相同組換え能について、外来遺伝子の標的組換え能（TF）と姉妹染色分体交換現象（SCE）を POLK 欠損株と野生株で比較した。POLK 欠損株で TF の減少がみられなかったことから、Pol κ は HR に直接関与するポリメラーゼではないと考えられた。また外的因子による DNA 損傷の誘導がない状態でも、欠損株で SCE が亢進していることから、Pol κ は染色体 DNA の安定性に寄与すると考えられた。Pol κ は生化学的には複製エラーを起こし、高率に変異を誘導する

ポリメラーゼであることが分かっている。ある種の肺癌では Polκ の発現が亢進しており、発がんとの関連が示唆されている。今回の論文では、Polκ の染色体安定性への関与を示し、別の側面から Polκ の発がんとの関連性を示唆した。

論文審査の結果の要旨

Polκ は、大腸菌で DNA 損傷の複製後修復に関わる DNA ポリメラーゼ IV/DinB の高等真核生物におけるホモログである（出芽酵母には存在しない）。ニワトリ DT40 細胞でノックアウト細胞を作成することにより、Polκ の機能を逆行遺伝学的に解析した。これまでの生化学的研究では、Polκ はベンゾピレン、アセトアミノフルオレンによる損傷を乗越え合成できるが、紫外線損傷であるピリミジンダイマーは乗り越えられないとされていた。

しかしながら今回の研究では、DT40 Polκ 欠損株は、細胞増殖阻止実験で紫外線に感受性を示したが、ベンゾピレン、アセトアミノフルオレンには非感受性であった。紫外線感受性はヒト及びニワトリ Polκ の再発現により野生株レベルまで回復し、複製早期に特異的であった。また染色体分析にても紫外線感受性が確認された。以上の結果から、Polκ は紫外線損傷の複製後修復に関与していると考えられ、生化学的研究のデータは *in vivo* を必ずしも反映していないと考えられた。

出芽酵母で複製後修復の最初に機能すると考えられている遺伝子 RAD18 と Polκ の二重欠損株では、各単一遺伝子欠損株の相加的な紫外線感受性を示し、Polκ が RAD18 とは別の経路で機能している可能性を示した。すなわち、Polκ は RAD18 非依存的に紫外線損傷の複製後修復に関与していると考えられた。

以上の研究は DNA 修復機構の解明に貢献し、腫瘍の生成や進展の原因の究明など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15年2月19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。