

氏 名	とみ だ じゅん や 富 田 純 也
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3250 号
学位授与の日付	平 成 20 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 生 理 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	DNA damage induced ubiquitylation of RFC2 subunit of RFC complex (DNA 損傷によって誘導される RFC 複合体サブユニット RFC2 のユビキチン化)
論文調査委員	(主 査) 教 授 武 田 俊 一 教 授 高 田 穰 教 授 松 本 智 裕

論 文 内 容 の 要 旨

DNA の複製や修復に関わる多くのタンパク質が翻訳後修飾を受けることが知られており、取り分けユビキチン化は DNA 損傷応答においてそれらのタンパク質が機能を果たす上で重要な役割を担っていると考えられている。PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) は DNA の複製や修復に関わる様々なタンパク質に対する sliding clamp としての機能を持つタンパク質であるが、DNA が損傷を受けた細胞中では RAD6-RAD18 複合体によってモノユビキチン化を受け、更に RAD5-MMS2-UBC13 複合体によってポリユビキチン化を受ける事が示されている。ユビキチン化された PCNA は、損傷乗り越え型の DNA ポリメラーゼを損傷箇所にリクルートして error-prone pathway を活性化させるか、あるいは損傷を回避するために未知の機構による error-free pathway を活性化させる。

本研究によって、PCNA だけがユビキチン化されるのではなく、PCNA を DNA 上にロードする役割を持つ RFC (Replication Factor C) 複合体サブユニットの hRFC2 もまた alkylating agent もしくは H₂O₂ の処理を受けた細胞中の Chromatin 上でユビキチン化を受けることを見出した。更に、このユビキチン化は RAD18^{-/-}細胞では、大きく減少することを明らかにした。

Saccharomyces cerevisiae の Rfc4 (ScRfc4) は human の RFC2 と相同性がある。Rpa1 (Replication Protein A1) との相互作用が弱くなった ScRfc4 変異体が報告されている。この ScRfc4 で変異しているアミノ酸残基は、hRFC2 では 228 番目のアスパラギン酸 (D) に相当する。228 番目の D をアラニン (A) に置換した hRFC2 変異体 D228A を作成し細胞内に導入すると、D228A は DNA 損傷無しでも Chromatin 上でユビキチン化を受ける事を明らかにした。また、D228A によるユビキチン化も RAD18^{-/-}細胞では、大きく減少することを明らかにした。

さらに RFC2 のユビキチン化が RAD6-RAD18 複合体によって起こる事を、*in vitro* の実験系を用い証明した。この時、PCNA の RAD6-RAD18 によるユビキチン化は RPA の存在に依存しないが、RFC2 のユビキチン化は RPA によって阻害される事を明らかにした。

以上の結果は、人の細胞中で、RPA は DNA 損傷応答において RFC2 のユビキチン化を抑制するという調節的な役割を果たしているという事を示唆している。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

DNA の複製や修復に関わる多くのタンパク質が翻訳後修飾を受けることが知られている。とりわけユビキチン化は、DNA 損傷応答において重要な役割を担っており、例えば PCNA は、DNA 損傷によりモノユビキチン化およびポリユビキチン化を受け、損傷乗り越え DNA 合成に重要な役割を果たしている事が知られている。本研究では、PCNA を DNA 上にロードする役割を持つヒト RFC (Replication Factor C) 複合体の RFC2 サブユニットが、アルキル化剤もしくは H₂O₂ の処理を受けた細胞がクロマチン上でユビキチン化を受けることを見出した。更に、このユビキチン化は、PCNA 同様に

RAD6-RAD18複合体に依存している事を、RAD18^{-/-}細胞を用いた *in vivo* 解析ならびにリコンビナント蛋白を用いた *in vitro* 再構成系から示した。

出芽酵母の RFC2 変異体では RPA と RFC2 の相互作用が弱くなることが知られている。そこで、酵母の変異と相同な部位に変異を持つヒト RFC2 (D228A) を作製した結果、DNA 損傷の有無に関わらず細胞中でユビキチン化を受ける事が示された。また、これと一致して *in vitro* 再構成系においてユビキチン化が RPA により阻害された。これらの事から、RPA が RFC2 のユビキチン化制御に重要な役割を果たしている事が明らかとなった。

以上の研究結果は、ゲノム恒常性維持機構の解明に寄与するところが多い。

従って、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 20 年 2 月 25 日実施の論文内容とそれに関連した諮問を受け、合格と認められたものである。