

氏 名	アリホセイ サベリ Alihossein Saberi
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3119 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 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 分 子 医 学 系 専 攻
学位論文題目	RAD18 and poly [ADP ribose] polymerase independently suppress the access of nonhomologous end joining to double strand breaks and facilitate homologous recombination mediated repair. (RAD18 とポリ ADP リボースポリメラーゼは独立に、非相同末端結合の二本鎖切断へのアクセスを抑制して相同組換えを促進する。)
論文調査委員	(主 査) 教 授 藤 堂 剛 教 授 松 本 智 裕 教 授 小 松 賢 志 教 授 松 田 文 彦

論 文 内 容 の 要 旨

現在臨床で使用されている抗がん剤の多くは、DNA を損傷することによって増殖細胞においてアポトーシスを誘導する。この機序で作用する抗がん治療には、シスプラチン（DNA と白金製剤とが架橋）、カンプトテシン（トポイソメラーゼ I 阻害剤、複製を阻害して二本鎖切断を誘導する、切断は相同組換えで修復される）、放射線（染色体 DNA を切断）が挙げられる。本研究では、カンプトテシンによって生じる DNA 損傷を修復する分子機構を、標的組換え効率の高いニワトリ B リンパ細胞株 DT40 を使い、逆遺伝学的手法を用いて解析した。

DNA 複製はデリケートな生化学反応である。複製 DNA ポリメラーゼは、 10^{-7} 塩基といった正確さを持つ反面、鋳型鎖が少しでも損傷していると、停止してしまう。停止は、相同組換え（HR）と複製後修復（Postreplicational repair=PRR）の 2 つの経路によって解除される。HR では、停止した新生鎖がもう 1 つの姉妹染色分体に鋳型をスワップして一時的に DNA 合成することによって、複製停止を解除する。PRR では、損傷した鋳型鎖を使って DNA を合成できる特殊な DNA ポリメラーゼ（損傷乗り越えポリメラーゼ）を動員して、複製ポリメラーゼをワンポイントリリースする。出芽酵母の Rad18（ユビキチン E3 リガーゼ）は PRR に必須の調節分子であるが、HR には関与しない。

過去に我々は、動物細胞でも Rad18 が PRR に関与することを示した（EMBO J. 2002）。今回、カンプトテシン感受性について系統的に調べる実験において、酵母の rad18 欠損株と違い、哺乳動物やニワトリ DT40 細胞の rad18 欠損は、カンプトテシンへの高感受性を示すことを見出した。しかも rad18 欠損 DT40 は、相同組換え効率も数倍程度低下していた。脊椎動物で主要な二本鎖修復経路である非相同末端結合（NHEJ）を Rad18 欠損 DT40 細胞でさらに欠損させると、HR による二本鎖切断修復が完全に回復したことから、脊椎動物では、Rad18 は NHEJ と HR のバランスを調節していると考えられた。我々の研究（EMBO J. 2002）からポリ ADP リボースポリメラーゼ 1（PARP1）を欠損する細胞のカンプトテシン高感受性も、NHEJ 欠損により正常化することが解明された。そこで parp1 と rad18 を二重欠損させると、カンプトテシンの感受性は相乗的に亢進した。この二重欠損株においてさらに NHEJ を欠損させると、カンプトテシンへの高感受性は正常化した。まとめると、高等脊椎動物では、複製フォークブロックの結果生じた二本鎖 DNA 切断を修復する場において、PARP1 と Rad18 が互いに独立に、NHEJ が HR の邪魔をするのを抑制していることが明らかとなった。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

Rad18 は酵母からヒトまで保存されている E3 ユビキチンリガーゼである。酵母 Rad18 は、シスプラチンなどによって生じた DNA 損傷で複製がブロックされた時に、その解除に重要な機能を持つ。しかし脊椎動物の Rad18 の機能は未解明であった。本研究では、ニワトリ体細胞株 DT40 細胞を用いた遺伝子破壊実験とヒト細胞の siRNA とによって、Rad18 の機能解析を行った。

Rad18 を欠損させると、酵母と異なり、動物細胞では、抗がん剤、カンプトテシンに高感受性を示すようになった。カンプトテシンは、複製中に DNA 二本鎖切断を誘導して細胞を殺す。その二本鎖切断は相同組み換えによって修復される。本研究によって、Rad18 は相同組み換えを促進することがわかった。Rad18 欠損株のカンプトテシン高感受性は、相同組み換えと競合する二本鎖切断修復経路である非相同末端結合修復に関与する遺伝子をさらに破壊すると完全に抑制された。よって、Rad18 による相同組み換えの促進は、Rad18 が非相同末端結合修復を抑制することによる。Rad18 単独破壊株は、紫外線、X 線、シスプラチンに対しても高感受性を示すが、興味深いことに、Rad18 と非相同末端結合修復との 2 重破壊株ではこの高感受性が少し弱まった。

以上の研究は、抗ガン剤によって生じた様々な DNA 損傷を修復する機構の解明に貢献し、その知見の臨床応用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19年3月6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。