

# 論文審査の結果の要旨

氏名 日高 征幸

本論文は3章からなり、第1章は *ric1* 初期胚由来細胞における DNA 損傷応答の解析、第2章は *ATM*<sup>-/-</sup>細胞と *p53*<sup>-/-</sup>細胞を用いた DNA 損傷応答の解析、第3章は *ric1* 候補遺伝子 *PES1* の発現解析と遺伝子配列解析について述べられている。メダカの培養細胞は、薬剤やウイルスによる形質転換を経ずに半永久的に培養することが可能である。そのため、メダカの培養細胞を用いた実験系は、*in vivo* における DNA 損傷応答の基礎実験を行うのに適している。メダカ胚由来培養細胞に見られる  $\gamma$  線誘発の DNA 損傷応答を、*RIC1* 細胞と *ATM*<sup>-/-</sup>細胞、あるいは *p53*<sup>-/-</sup>細胞と比較した結果、*ric1* メダカでは、DNA 損傷後の初期応答に異常が見られ、その結果、細胞周期チェックポイント、DNA 修復、アポトーシスにも異常が見られたことを示した。

本論文の第1章では、 $\gamma$  線誘発の DNA 損傷応答を野生型細胞 *CAB-e3*、および *HdrR-e3* と、*RIC1* 細胞を比較して、*RIC1* 細胞に見られる DNA 損傷応答の異常を明らかにした。申請者は、*time-lapse* 撮影により  $\gamma$  線を照射した細胞を細胞単位で継時的に観察する実験形を樹立し、アポトーシスと細胞分裂の停止を定量的に解析することに成功した。DNA 修復をコメットアッセイ法により、アポトーシスと細胞周期チェックポイントの定量化を *time-lapse* 撮影による顕微鏡観察により解析した結果、*RIC1* 細胞は、DNA 修復、アポトーシスといった複数のゲノム維持機構に異常を示すことが明らかになり、*RIC1* 細胞において DNA 損傷後の初期応答に異常があることが予測された。 $\gamma$  線誘発の *DSB* 生成直後に見られるリン酸化ヒストン *H2AX* ( $\gamma$ *H2AX*) のフォーカス形成を、免疫組織化学染色法により解析した結果、*RIC1* 細胞は  $\gamma$ *H2AX* のフォーカスを形成するが、フォーカスの数が少ない傾向が見られ、かつ、野生型細胞よりも早期にフォーカスが消失することが明らかになった。*RIC1* 細胞の DNA 損傷応答においては、 $\gamma$ *H2AX* のフォーカス形成が維持されないために、細胞周期チェックポイント、DNA 修復、アポトーシスに異常が見られることが示唆され、DNA 損傷応答の初期のシグナル伝達経路において、*ric1* が  $\gamma$ *H2AX* のフォーカス維持に影響を与えている可能性が示唆された。

本論文の第2章では、DNA 損傷後の初期応答においてゲノム維持機構にシグナルを伝達する中心的なタンパク質である *ATM*、あるいは *p53* を欠損したメダカ胚由来の培養細胞を用いて、DNA 損傷応答の解析を行い、*RIC1* 細胞の結果と比較した。解析の結果、*RIC1* 細胞に *ATM* の活性の異常は見られなかった。一方、*p53*<sup>-/-</sup>細胞に見られた DNA 損傷応答の特徴は、*RIC1* 細胞と非常に似ていて、DNA 修復の異常、アポトーシス抵抗性、細胞分裂停止後の早期の分裂再開、 $\gamma$ *H2AX* の早期消失が見られた。*RIC1* 細胞と *p53*<sup>-/-</sup>細胞の両方において、DNA 損傷応答のごく初期のシグナル伝達経路において見られる  $\gamma$ *H2AX* のフォーカス形成に異常が見られ、また、ゲノム維持機構に見られた異

常が非常に似ていたことから、**ric1** は **p53** と共通のシグナル伝達経路において  $\gamma$  **H2AX** のフォーカス維持に寄与し、**DSBs** 損傷部位に集積する DNA 損傷応答タンパク質を介した、ゲノム維持機構へのシグナルの伝達に影響を与えていることが強く示唆された。

本論文の第 3 章では、**RIC1** 細胞を用いた DNA 損傷応答の解析結果を基にして、**ric1** 候補遺伝子を選別し、発現解析と遺伝子配列解析を行った。**ric1** は損傷部位において  $\gamma$  **H2AX** のフォーカスの維持に影響を与えていることが示唆されたことから、DNA 損傷応答においてタンパク質が損傷部位に結合するためのドメインである **BRCT** を持つ **PES1** を選別した。**RIC1** 細胞の **PES1** の cDNA 配列をシーケンスにより解読した結果、アミノ置換を伴う一塩基対の変異があることが明らかとなった。

これらの研究成果は 2 つの重要な側面を持つ。一つは、**ric1** がゲノム安定性のために重要である **p53** と共通の経路で機能し、**ric1** メダカが DNA 損傷応答の解析を行うモデルとして有用であることを示したことである。もう一つは、アポトーシスや細胞周期チェックポイントといった DNA 損傷応答を、分子の動きではなく細胞の形態変化による現象として、一細胞レベルで定量化することに成功したことである。

なお、本論文第 1 章は **Oda S.**、**Kuwahara Y.**、**Fukumoto M.**、**Mitani H.**との共同研究で **Journal of Radiation Research** 誌に公表済みであり、論文提出者が筆頭著者として主体となって解析、および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。