

論文審査の結果の要旨

氏名 漆原 佑介

放射線などによってゲノム上に生じる DNA 二本鎖切断 (DSB) は DSB 修復機構によって直されることが知られている。修復経路にはこれまでに Classical NHEJ、HR、Alternative NHEJ、ATM 型 NHEJ の 4 経路が存在することが知られているが、その相互間制御機構については明らかとなっていない。しかし、ATM や DNA-PK が修復経路間の制御に重要な役割を持つことを示唆する論文がいくつか報告されている。メダカ突然変異体 RIC1 系統はこれまでに放射線照射後のヒストン H2AX のリン酸化異常と DSB 修復遅延が報告されている。H2AX は ATM と DNA-PK によってリン酸化されることから、RIC1 系統では ATM もしくは DNA-PK の異常が DSB 修復異常をもたらしていることが示唆されていた。そこで、本論文では RIC1 系統を用いて ATM、DNA-PK による DSB 修復制御機構の解明を主テーマとして培養細胞を用いて放射線応答を解析した。

本論文は 3 章より構成されている。第 1 章では、まず RIC1 胚由来培養細胞における H2AX リン酸化異常の原因を明らかにするために、ATM 阻害剤及び DNA-PK 阻害剤処理後の H2AX リン酸化への影響を解析した。その結果、RIC1 細胞では DNA-PK の異常が H2AX リン酸化異常をもたらしていることを明らかにしている。次に、RIC1 細胞で報告されている DSB 修復の遅延の原因を解析する為に、DSB 各修復経路の修復能を解析して、RIC1 細胞が CAB 細胞に比べて HR 修復能が低下していることを明らかにした。また、DNA-PK 阻害剤処理後の HR 修復能を解析した結果、RIC1 細胞において DNA-PK の異常が HR 修復率の低下をもたらしていることを示唆された。

DNA-PK 酵素活性測定によって、RIC1 細胞は CAB 細胞より DNA-PK 活性が低下していたことから、RIC1 細胞では DNA-PK 活性低下が H2AX リン酸化異常、HR 修復能低下をもたらしていることが示唆された。これまでにいくつかの論文において DNA-PK 活性低下によって HR 修復能が低下することが報告され、DNA-PK による HR 修復制御モデルが提唱されており、RIC1 系統ではこの制御の破綻によって HR 修復能が低下していると考察した。

第 2 章では DNA-PK による HR 制御モデルの検証を行った。DNA-PK による HR 制御モデルでは、DNA-PK の自己リン酸化による DNA-PK の DSB 部位からの解離によって HR 修復因子の DSB 部位への結合が可能となる。DNA-PK 活性が低下すると DNA-PK 自己リン酸化の低下によって、HR 修復因子の DSB 部位への結合が阻害されて HR の進行が阻害されている例が報告されている。そこで、RIC1 細胞において DNA-PK 自己リン酸化と HR 修復因子である NBS1 の挙動を解析し、RIC1 細胞では DNA-PK 自己リン

酸化異常が存在し、NBS1 の DSB 部位への結合も阻害されていることを明らかにしている。これらの結果から、RIC1 細胞において DNA-PK による HR 制御が破綻していることが示唆された。

DNA-PK による HR 制御モデルで、HR 修復能低下をもたらす直接的な原因は提唱されていない。第 3 章では、DNA-PK 活性低下が HR 修復能の低下をもたらす直接的な原因を解析した。過去の報告から ATM 型 NHEJ は、DNA-PK の有無に影響されずに働いていることが示唆されている。そこで、DNA-PK 活性が低下した時には ATM 型 NHEJ がより強く働いている可能性を考え、ATM 型 NHEJ に働く 53BP1 の DNA 損傷後の挙動を解析した。その結果、RIC1 細胞では DNA 損傷部位への 53BP1 の集積量が CAB 細胞に比べて多いことを示した。これによって ATM 型 NHEJ が DNA-PK 活性低下時により強く働くことを示唆している。

本論文において DNA-PK 活性低下時に ATM 型 NHEJ が強く働くことで HR 修復能の低下をもたらされている現象を明らかにしている。DNA-PK は正常な状態では p53 のリン酸化を介して 53BP1 挙動を制御し、ATM 型 NHEJ を抑制している可能性を新たに示唆しており、DNA2 本鎖修復系路の制御解明につながる成果として評価されることから、論文提出者は学位授与に十分な資格および能力を有すると判断される。

以上 1806 字