

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)	氏名	劉 寧 昂
学位授与の要件	学位規則第4条第1・2項該当		
論 文 題 目			
Regulation of homologous recombinational repair by lamin B1 in radiation-induced DNA damage. (放射線誘発 DNA 損傷の相同組換え修復における Lamin B1 による制御)			
論文審査担当者			
主 査	教 授	安 井	弥
審査委員	教 授	稻 葉	俊 哉
審査委員	教 授	永 田	靖
〔論文審査の要旨〕			
<p>DNA二本鎖切断(DNA double-strand breaks, DSBs)は、放射線により誘導されるDNA損傷の中で最も重篤な障害であり、適切に修復されない場合はゲノム不安定性、細胞死や発がんの原因となる。DSBsの修復には、二つの経路、すなわち相同組換え修復と非相同末端融合が存在する。相同組換え修復では姉妹染色分体を鋳型としてDNA修復を行うため、非相同末端融合より正確な修復を行うことが可能となる。RAD51は単鎖DNAに結合し、らせん状フィラメントを形成し、相同組換え反応を促進する相同組換え修復と細胞生存に必須のタンパク質である。しかし、DNA損傷によりRAD51がどのように活性化されるのかは、不明な点が多い。</p> <p>RAD51依存的な相同組換え修復のメカニズムを理解するために、著者らはヒト培養細胞を用いたタンパク質複合体解析を行い、RAD51複合体にB型Lamin の一つであるLaminB1が含まれていることを見いだした。B型Laminは、核ラミナを構成するタンパク質であり、発生の全ての段階で全ての細胞に発現が認められる。B型Laminは、DNA複製、転写、分裂期紡錘糸結合、酸化ストレス抵抗性、染色体分配など様々な生理学的反応に関与することが報告されている。しかし、B型LaminのDNA修復経路における役割は、未だ不明である。</p> <p>本研究では、LaminB1との相互作用がRAD51の機能調節にどのように関わっているの</p>			

かを明らかにするために、まず LaminB1 の発現抑制が RAD51 タンパク量にどのように影響するか検討した。免疫ブロット法を用いた解析により、siRNA による LaminB1 の発現抑制が DNA 損傷依存的な RAD51 のタンパク量増加を抑制することが明らかになった。

このため、LaminB1がどのようにRAD51タンパク量を調節しているのかを検討した。まず、RAD51の転写調節を介してHR活性を制御していることが報告されているA型Laminの発現へのLaminB1発現抑制の影響を検討した。免疫ブロット法を用いた解析により、LaminB1の発現抑制がLaminAの発現に影響しないことが示された。ついで、RAD51は、細胞周期依存的に発現量が増えるため、著者らはフローサイトメーターを用いたヒト骨肉腫細胞株U2OS細胞の解析を行った。その結果、LaminB1発現抑制による細胞周期への影響はほとんどないことが明らかになった。次に、LaminB1がRAD51の遺伝子発現やタンパク質の安定性を介したRAD51タンパク量の制御に関与している可能性を検討した。定量的RT-PCR法を用いたmRNAの解析から、U2OS細胞ではLaminB1発現抑制は、放射線照射の有無にかかわらずRAD51 mRNAの発現量に影響しないことが明らかになった。このため、LaminB1は、RAD51の遺伝子発現制御には関与していないことが示された。一方、LaminB1発現抑制による放射線照射後のRAD51タンパク量の増加の抑制は、プロテアソーム阻害剤MG132によるタンパク分解系の活性抑制により解除されることが明らかになった。これらの結果から、LaminB1は、プロテアソームによるタンパク質分解を抑制することにより、放射線照射後の細胞でのRAD51安定化に寄与することが示された。

ついで、LaminB1の放射線照射後のRAD51の核内フォーカス形成制御における役割を検討した。免疫ブロット法を用いた解析により、LaminB1発現抑制がDNA損傷依存的なRAD51の核内蓄積を抑制することが明らかになった。免疫蛍光抗体法による解析では、siRNAによるLaminB1発現抑制がゲノム損傷部位でのフォーカス形成を抑制することが示された。このため、LaminB1はRAD51の核内蓄積とともに損傷部位でのフォーカス形成を促進することが明らかになった。さらに、Direct Repeat-Green Fluorescent Protein (DR-GFP) 解析を用いた相同組換え修復活性の検討から、LaminB1発現抑制はHR活性を抑制することが示された。LaminB1による相同組換え修復の活性化は、Sister Chromatid Exchange (SCE) 解析を用いた検討で確認された。コロニー形成法を用いた放射線感受性の解析から、LaminB1発現抑制が放射線感受性を増強することが示された。

以上の結果から、本論文はLaminB1がRAD51のプロテアソームによる分解を抑制することでタンパク質安定化に寄与すること、損傷依存的なRAD51の核内蓄積と損傷部位でのフォーカス形成を促進することにより、相同組換え修復活性を正に制御することで、放射線によるゲノム損傷の修復を促進することを明らかにした。本論文は、B型Laminが相同組換え修復に関与することを示した初めての報告であり、本論文の放射線影響の基礎生物学的研究における意義はきわめて大きい。よって審査委員会委員全員は、本論文が劉寧昂に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。

