

# 論文内容要旨

hCAS/CSE1L regulates RAD51 distribution and focus formation for homologous recombinational repair

(hCAS/CSE1L は RAD51 細胞内分布と核内 RAD51 focus 形成を制御し相同組換え修復に関与している)

Genes to Cells, 20: 9, 2015, in press.

主指導教員：田代 聡 教授

(原爆放射線医科学研究所 細胞修復制御)

副指導教員：木内 良明 教授

(統合健康科学部門 視覚病態学)

副指導教員：孫 継英 講師

(原爆放射線医科学研究所 細胞修復制御)

沖本 聡志

(医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻)

## 論文内容要旨

【研究背景】放射線などによる染色体 DNA の二本鎖切断 (DNA double-strand breaks, DSBs) は、一つでも修復されずに残存すると細胞死に至る重篤なゲノム損傷である。このため、細胞は、ゲノム損傷に対しての修復機構を備えている。DSBs の主な修復機構には、損傷部位とその部位に相同な染色体 DNA との間での組み換えを用いて DSBs を正確に修復する相同組み換え修復機構 (homologous recombinational repair, HR) と、断端を直接融合して修復する末端融合機構 (non-homologous end-joining repair) がある。RAD51 は HR で中心的な役割を果たしている蛋白質である。HR を行うために一定レベル以上の RAD51 が細胞核内に存在する必要がある一方で、核内の過剰な RAD51 は正常な染色体 DNA への間違った結合により組換え活性を上昇させて、染色体転座などを誘発する危険性がある。したがって、ゲノムの恒常性を維持するためには、核内の RAD51 濃度を一定のレベルに制御するシステムが存在すると考えられた。RAD51 は核内だけでなく細胞質にも存在し、放射線照射により RAD51 の核内濃度が一過性に増加し、さらに RAD51 フォーカスと呼ばれる核内高次構造体をゲノム損傷部位に形成することが知られている。このことから、RAD51 の機能制御には、核-細胞質間輸送システムが関与していることが示唆されるが、その詳細は未だ不明である。核-細胞質間輸送には、蛋白質の核内輸送に関与する Importin ファミリーや核外輸送を行う Exportin など様々な蛋白質が関与している。我々は核外輸送因子の一つである hCAS/CSE1L (Exportin2) が、RAD51 複合体に含まれていることを見いだした。そこで、hCAS/CSE1L が RAD51 の機能制御に関わっている可能性を検討した。

【研究手法と結果】RAD51 と hCAS/CSE1L の特異的な結合を証明するため、免疫沈降法、RAD51 と hCAS/CSE1L のリコンビナント蛋白質を用いた pull down assay、さらに fluorescent in situ PLA assay を行った。その結果、放射線によるゲノム損傷誘導の有無に関わらず RAD51 と hCAS/CSE1L の直接的な結合が確認された。次に、short-interfering RNA (siRNA) 法による hCAS/CSE1L の発現抑制した U2OS 細胞を用いた免疫ブロット法により、hCAS/CSE1L の RAD51 細胞内局在制御における役割を検討した。その結果、hCAS/CSE1L 発現抑制細胞では、特に放射線照射前の細胞で核内 RAD51 量の著しい増加が観察された。放射線照射後の RAD51 フォーカス形成について検討したところ、hCAS/CSE1L 発現抑制により核内 RAD51 フォーカス形成の亢進が認められた。さらに、DSBs 修復への影響を相同組み換え修復活性を緑色蛍光タンパク質の発現量で測定する Direct repeat green fluorescent protein (DR-GFP) HR reporter system を用いた HR 活性測定法で調べた。その結果、hCAS/CSE1L の発現抑制では、有意に緑色蛍光シグナル陽性細胞が増加し、HR 活性が上昇していることが示された。染色体不安定性については、トポイソメラーゼ II 阻害剤エトポシド処理による 11q23 染色体転座の発生頻度を Fluorescent in situ hybridization (FISH) 法を用いて解析したところ、hCAS/CSE1L の発現抑制により 11q23 染色体転座陽性細胞の増加が

認められた。これらの実験結果を検証するために、hCAS/CSE1L 発現抑制細胞について、siRNA 抵抗性 hCAS/CSE1L 発現ベクターを用いて hCAS/CSE1L の蛋白質量を正常レベルに戻す補完実験を行ったところ、核内 RAD51 蛋白質量の減少、RAD51 フォーカスの減少、さらに HR 活性の低下が確認された。

**【結論】** hCAS/CSE1L は RAD51 の核内濃度の増加を抑え、さらに RAD51 フォーカス形成を抑制することで HR 活性を抑制し、染色体安定性に寄与していることが示唆された。