

第 8 号様式

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)	氏名	沖本 聡志
学位授与の要件	学位規則第 4 条第① 2 項該当		
<p>論 文 題 目</p> <p>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)</p>			
<p>論文審査担当者</p> <p>主 査 教 授 神谷 研二</p> <p>審査委員 教 授 稲葉 俊哉</p> <p>審査委員 准 教授 鎌田 英明</p>			
<p>〔論文審査の要旨〕</p> <p>相同組み換え修復機構 (homologous recombinational repair, HR) は、DNA の二本鎖切断 (DNA double-strand breaks, DSBs) の主な修復機構の一つであり、損傷部位とその部位に相同な染色体 DNA との間での組換え反応を用いて DSBs を正確に修復する。RAD51 は HR で中心的な役割を果たしている DNA 組換え酵素であり、ゲノム損傷誘導後に核内ドメイン (RAD51 focus) を損傷部位に形成することが知られている。</p> <p>HR による DSBs 修復のためには、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、RAD51 の過剰発現は染色体不安定性を誘発すること、さらに放射線照射により RAD51 の核内濃度が一過性に増加することが報告されている。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 濃度を厳密に制御するシステムが存在すると考えられる。蛋白質の核内濃度の制御には、核膜孔を介した核-細胞質間輸送システムが関わっている。核-細胞質間輸送システムには、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。RAD51 は核内だけでなく細胞質にも多く存在することから、RAD51 の核内濃度の制御にも核-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。</p>			

核-細胞質間輸送システムの RAD51 機能制御への関与を検討するために、著者らは質量分析による RAD51 の蛋白質複合体解析を行い、核外輸送因子の一つである hCAS/CSE1L (Exportin2) が含まれていることを見いだした。そこで、本論文では hCAS/CSE1L が RAD51 の機能制御に関わっている可能性が検討された。

まず RAD51 と hCAS/CSE1L の蛋白質間相互作用を確認するため、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 が行われた。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 の蛋白質間相互作用が認められた。

hCAS/CSE1L の RAD51 細胞内局在制御における役割は、short-interfering RNA (siRNA) 法により hCAS/CSE1L を発現抑制した U2OS 細胞について、免疫ブロット法を用いて検討された。その結果、hCAS/CSE1L 発現抑制細胞では核内 RAD51 量の増加が観察され、特にこの傾向は放射線照射前の細胞で顕著であった。さらに、免疫蛍光抗体法による解析から、RAD51 focus の形成が hCAS/CSE1L 発現抑制により亢進することが明らかになった。

hCAS/CSE1L の HR 活性制御への関与については、Direct repeat green fluorescent protein (DR-GFP) HR reporter system を用いた HR 活性測定法で調べられた。その結果、hCAS/CSE1L の発現抑制により、HR 活性が上昇することが示された。染色体不安定性への関与については、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の Fluorescent in situ hybridization (FISH) 法を用いた解析が行われ、hCAS/CSE1L の発現抑制による 11q23 染色体転座陽性細胞の増加が認められた。

以上の結果から、本論文は核外輸送因子 hCAS/CSE1L が RAD51 の核外輸送を行うこと、損傷部位での核内ドメイン形成を抑制することにより、相同組換え修復活性を負に制御することで、ゲノム損傷の適切な修復を促進することが示された。本論文は、hCAS/CSE1L による相同組換え修復の負の制御に関する初めての報告であり、ゲノム修復機構の解明への新しい角度からの取組として非常に意義が高いと考えられる。よって審査委員会委員全員は、本論文が申請者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。