

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	西淵 いくの
学位授与の要件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論 文 題 目			
Reorganization of damaged chromatin by the exchange of histone variant H2A.Z-2 (ヒストンバリエント H2A.Z-2 の交換反応による損傷クロマチンの構造変換)			
論文審査担当者			
主 査	教授	神谷 研二	印
審査委員	教授	稲葉 俊哉	
審査委員	教授	菅野 雅元	
〔論文審査の要旨〕			
<p>DNA 二本鎖切断 (DNA double strand breaks, DSBs) の損傷応答の過程において、損傷クロマチンの構造変換は非常に重要な役割を担っている。DNA 損傷応答におけるクロマチン構造変換機構として、ヒストンの翻訳後修飾やヒストン交換反応に加え、ヒストンバリエントの交換反応も重要な役割を果たしていることが近年明らかとなってきた。ヒストン H2A には、H2A の代わりにヌクレオソーム形成に関わるバリエントが存在し、そのひとつである H2AX は DSBs 形成部位でリン酸化されフォーカスを形成し、DSBs 修復を活性化する。一方、ヒストン H2A のもうひとつのバリエントである H2A.Z は、遺伝子の発現調節や染色体分離に関係しているとされてきたが、最近、出芽酵母では DNA 修復に関与する可能性が示唆された。脊椎動物の H2A.Z には、H2A.Z-1 および H2A.Z-2 という 2 種類のアイソフォームが存在することが新たに報告された。H2A.Z アイソフォームのアミノ酸配列は極めて類似しており、ヒトやマウスでは 3 か所が異なるのみである。従来、H2A.Z と呼ばれていたものは H2A.Z-1 であり、酵母では H2A.Z アイソフォームの存在は報告されていない。脊椎動物において H2A.Z の損傷クロマチンにおける役割や H2A.Z アイソフォーム各々の機能の違いについてはいまだ不明であり、本研究では、DSBs 誘導後のクロマチン構造変換における H2A.Z アイソフォームの役割について検討した。</p>			

まず、DSBs 形成後の H2A.Z アイソフォームの動態を Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) および inverted FRAP 法により解析した。ヒト正常繊維芽細胞に Green fluorescent protein (GFP)-H2A.Z アイソフォームを各々発現させ、核の上半分に UV レーザーにより DSBs を導入した後、FRAP 法では DNA 損傷部およびコントロール部の GFP を帯状に褪色させ GFP シグナル強度の回復を経時的に観察した。その結果、GFP-H2A.Z-1 発現ヒト正常繊維芽細胞では、UV レーザーによる損傷導入部位の GFP 蛍光強度の回復がわずかであるのに対し、GFP-H2A.Z-2 発現ヒト正常繊維芽細胞では顕著な GFP 蛍光強度の回復がみられた。これにより、DNA 損傷部で H2A.Z-2 の取り込みが生じていることが示唆された。一方、inverted FRAP 解析の結果、DNA 損傷部の GFP シグナルは GFP-H2A.Z-1 発現細胞では残存しているが、GFP-H2A.Z-2 発現細胞では不明瞭となった。これは、DNA 損傷部で H2A.Z-2 の放出が生じていることを示唆しており、FRAP の結果と合わせると、損傷クロマチンにおいて H2A.Z-2 の交換反応が起こっていると考えられた。引き続き、2Gy 照射後のニワトリ B 細胞（野生型、H2A.Z-1 遺伝子破壊細胞、H2A.Z-2 遺伝子破壊細胞）の RAD51 フォーカス形成を免疫蛍光抗体法により比較した。RAD51 は相同組み換え修復に関わるタンパク質で、DSB 部位にフォーカスを形成することが知られている。その結果、照射後の RAD51 フォーカスの形成は H2A.Z-1 遺伝子破壊細胞は野生型と同様であったが、H2A.Z-2 遺伝子破壊細胞では抑制された。これにより、DNA 損傷誘導時の RAD51 フォーカスの形成は H2A.Z-2 により制御されている可能性が示唆された。そのメカニズムとしては、H2A.Z-2 が交換反応の際に何らかの翻訳後修飾を受け、RAD51 が損傷クロマチンにリクルートされるなどの可能性が考え得る。最後に、コロニーアッセイ法により、ニワトリ B 細胞およびヒト骨肉腫由来細胞（野生型、H2A.Z-1 発現抑制細胞、H2A.Z-2 発現抑制細胞）の放射線感受性を比較検討した。いずれの細胞株においても、H2A.Z-1 遺伝子破壊細胞、H2A.Z-1 発現抑制細胞では、野生型と同等であったのに対し、H2A.Z-2 遺伝子破壊細胞、H2A.Z-2 発現抑制細胞で放射線感受性が高かった。H2A.Z-2 発現抑制下では、DSBs 部位での RAD51 フォーカス形成が抑制され、その結果、相同組み換え修復の活性が低下し、放射線感受性に影響を与えている可能性が示唆された。以上の結果から、本論文は損傷クロマチンにおいて、DSBs 誘導後速やかに H2A.Z-2 の交換反応が生じていること、さらに、H2A.Z-2 は DSBs 部位での RAD51 フォーカス形成に必要であり、正常細胞および腫瘍細胞いずれにおいても放射線感受性に影響を与えることを示した点で高く評価される。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。