

氏名(本籍)	桂 ^{かつら} 行 ^{ゆき} 孝 ^{たか} (東京都)		
学位の種類	博士(医学)		
学位記番号	博甲第4759号		
学位授与年月日	平成20年3月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	細胞内DNA二重鎖断裂修復活性の検出系の確立と微小相同配列を介した修復の分子機構解析		
主査	筑波大学教授	医学博士	坪井康次
副査	筑波大学准教授	医学博士	大原 潔
副査	筑波大学准教授	医学博士	内田和彦
副査	筑波大学講師	博士(医学)	小田 竜也

論文の内容の要旨

目的: 電離放射線などにより引き起こされる DNA 二重鎖断裂 (double strand break : DSB) の中心的修復メカニズムとしては、これまで相同組み換え (homologous recombination: HR) と、非相同末端結合 (non-homologous end joining: NHEJ) の二つのメカニズムが明らかにされている。さらに最近の研究からは microhomology-mediated end joining: MMEJ といったメカニズムも存在することが報告され注目を集めているがその詳細は不明である。そこで本研究では DNA の DSB に対する NHEJ と MMEJ の活性を *in vivo* で検出し定量化する系の確立を目指すとともに、NHEJ において重要な機能を持つ Ku80 と MMEJ の関連につき分子生物学的検討を行った。

対象と方法: 特定の制限酵素で切断するとその断端近傍に 10bp の相同配列が存在するような塩基をデザインし、それを pmaxGFP プラスミドに挿入した。このプラスミドは環状の状態のときにのみ GFP を産生して蛍光を発する仕組みである。これを修復基質として用い、正常の CHO 細胞、Ku80 を欠損した CHO 細胞である xrs6 細胞などに、複数の制限酵素で線状にした断端の異なる上記プラスミドを transfection し、それらが修復されて環状となったときに発せられる蛍光を経時的に測定した。さらに得られた値を時間に対する関数として解析し、それぞれの細胞での DSB の修復効率を算出した。その際、はじめから環状プラスミドを導入したときの蛍光量を基準値とした。また、修復されたプラスミドを回収して PCR にて増幅し、その産物のサイズと塩基配列を解析して、MMEJ による修復と NHEJ による修復を区別するとともに両者の比率を検討した。

結果: 著者らが作成した線状プラスミドを用いた結合アッセイにより NHEJ とともに MMEJ の活性も *in vivo* で定量的に評価できることが示された。蛍光量は時間とともに指数関数的に上昇し、近似式から細胞での DNA 二重鎖切断修復効率が算出された。また修復されたプラスミドの解析から MMEJ と NHEJ の比率も明らかとなった。正常の Ku80 を持つ CHO、Ku80 が欠損した xrs6 における実験からは、全体の修復効率、

NHEJ, MMEJ の全てが xrs6 で優位に低下していることが明らかになった。ただし, xrs6 における DNA の DSB 修復では MMEJ 割合が NHEJ よりも高いことが示された。

考察: 今回作成した線状プラスミドを用いた結合アッセイにより, NHEJ のみならず MMEJ も蛍光量を利用して定量的に評価できるということは重要な知見である。また, 細胞内の DSB が増加すると MMEJ の利用率が上昇することから, MMEJ が NHEJ で処理できなかった DSB に対する予備的, 相補的な修復メカニズムであることが推察される。Ku80 は NHEJ には必須の分子であるが, MMEJ を増加させる機能も持つこと, またその一方で MMEJ では Ku80 非依存性の経路も存在することが示唆された。以上から, Ku80 は MMEJ に対してもある程度関与していることが示されたが, そのメカニズムのさらなる解明は今後の研究に託されているといえる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

桂行孝氏は, 主に国立がんセンターでリサーチレジデントして本研究に専念してきた。参考論文としては本学位論文の基礎となる英語論文が第一論文として挙げられている。この論文は同氏が第一執筆者として最近「DNA repair」誌に出版されたものであり, 本研究内容が国際的にも評価されたことが支持されている。それに先行して発表された別の参考論文においても共同執筆者として名を連ねており, 本研究に貢献してきたことが示されている。

DNA 修復に関する基礎的な研究は, 発がん機序, 細胞の放射線感受性, 化学療法の効果, 宇宙放射線医学等の多くの研究分野で盛んに進められており競争が激しい。特に DNA 二重鎖切断の修復を定量的に計測する方法が望まれていたが, その点, 本論文の意義は大きいと評価できる。ただし, 本研究では DNA 修復という現象を, 人為的に構築された系の中で計測していることから, それが必ずしも実際の生体での現象を正確に反映しているのかどうかは定かではない。従って, 本論文で対象とした MMEJ という現象がどの程度実際の生体で起きている DNA 修復に関与しているのかはまだ明らかにはされていない。しかし, MMEJ という現象の定量化にこの線状プラスミド結合アッセイを応用した点や, DNA 修復の中心的メカニズムであった NHEJ に MMEJ が相補的役割を果たしていることを示唆するという研究結果は極めてユニークであり高く評価できる内容である。

よって, 著者は博士 (医学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。