The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Differential and collaborative actions of Rad51 paralog proteins in cellular response to DNA damage
Author(s)	米谷, 泰一
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46161
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【80】

氏　　名	米谷泰一（よねたに やすかず）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２０１３７　号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学　位　論　文　名	Differential and collaborative actions of Rad51 paralog proteins in cellular response to DNA damage （Rad51 パラログ蛋白は DNA 損傷に対して、特異的、協調的に機能する）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　吉川　秀樹 （副査） 教　授　金田　安史　　教　授　田中亀代次

論　文　内　容　の　要　旨

［目的］

抗がん剤として広く用いられるシスプラチンは、DNA 鎖に架橋構造を作り、複製阻害に伴う DNA 損傷を作り細胞死を誘導する。その修復経路を知ることは、効果的なシスプラチン使用を考える上で重要になる。Rad51 蛋白が中心的な役割を果たす相同 DNA 組換え（Homologous Recombination＝HR）修復には、５つの Rad51 パラログ蛋白（Rad51B、Rad51C、Rad51D、XRCC2、XRCC3）が関与する。これらの破壊細胞株は、いずれもシスプラチンに対して高感受性を示す。Rad51 パラログは、HR の初期段階とされる、損傷部位に形成された一本鎖 DNA への Rad51 蛋白の集合（nucreofilament 形成）を促進する。それぞれの破壊細胞の表現型は互いに似ており、特に放射線照射後の Rad51 フォーカス形成の低下を認めることから、５つの Rad51 パラログが HR の初期段階に協調的に作用するという仮説をたてた。しかし、生化学実験から、少なくとも二つの複合体（Rad51B/C/D/XRCC2、Rad51C/XRCC3）の存在が示唆され、加えて、HR 後期段階で Holliday junction の解離に関与するという報告がなされた。今回、パラログ間の遺伝学的相互関係を明らかにすべく、異なる複合体間（XRCC3/Rad51D）と、同一複合体内（Rad51B/Rad51D）で、二重破壊株を作成し解析した。

［方法］

本研究は、標的組換え効率が動物細胞の中で例外的に高いニワトリ B リンパ球 DT40 細胞を用いて、遺伝子破壊実験を行った。Rad51 パラログの二重破壊株を作成するため、loxP シグナルではさんだ Rad51D cDNA を、Rad51D 欠損細胞に導入した。この細胞で、それぞれ XRCC3 と Rad51B 遺伝子を破壊したのち、Cre 組換え酵素により Rad51D cDNA を削除し、二重破壊細胞株 *xrcc3/rad51d* と *rad51b/rad51d* を樹立した。

表現型の解析では、放射線およびシスプラチンに対する感受性、Rad51 や Rad54 のフォーカス形成、シスプラチン誘導後の染色体断裂について検討した。

［結果］

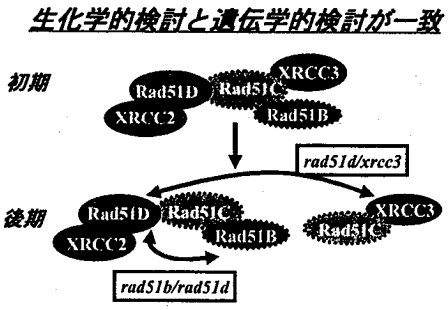
単独欠損株、及び二つの二重欠損株は放射線感受性、及び照射後の Rad51、Rad54 フォーカス形成の低下について、すべて同じ表現型を示した。このことから、放射線に対して、５つの Rad51 パラログは HR の早期段階では協調的に働くと結論した。

一方、シスプラチンに対する感受性は、同一複合体内の破壊株（*rad51b/rad51d*）は *rad51b* と同レベルであったが、異なる複合体間の破壊株（*xrcc3/rad51d*）では各単独破壊株より強い感受性を示した。しかしながら、シスプラチン処理後の Rad51、Rad54 フォーカス形成はいずれの破壊株においても差を認めなかった。一方、シスプラチン処理後の染色体断裂は、chromosome-type（姉妹染色体の同じ場所に断裂がある）、Exchange が優位で、断裂数は感受性の強さとよく相関していた。以上の結果から、シスプラチンによる DNA 損傷に対し、5つの Rad51 パラログは HR 修復の初期段階では協調して働くが、後期段階では少なくとも二つの複合体を形成して、独立して働いていると結論した。

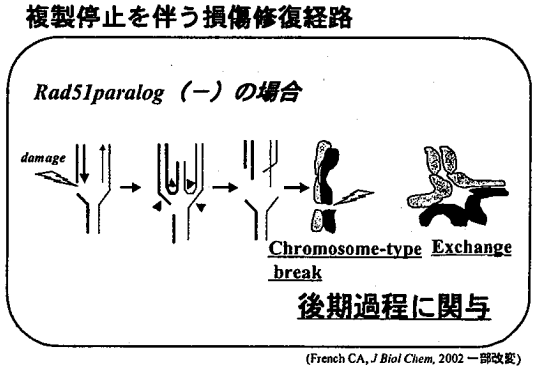
［考察］

本研究では、遺伝学的解析により、Rad51 パラログの二つの異なる働きが明らかになった。放射線による直接的な DNA 二本鎖切断後の HR 修復では、5つの Rad51 パラログは協同して機能すると考えられる。これは HR の初期段階の指標となる Rad51 フォーカス形成や、それ以降の反応も含めた最終結果の指標となる感受性が、どの Rad51 パラログ単独破壊細胞でも全く同じ傾向を示すからである。

また、シスプラチンによる DNA 損傷の場面では Rad51 パラログはもう一つの働き方をする。*xrcc3/rad51d* 細胞は、シスプラチンに対する感受性がそれぞれの単独破壊株より強くなり、*rad51b/rad51d* 細胞は、*rad51b* 破壊株と等しくなった。しかし、DNA 損傷後の Rad51 フォーカス形成の低下には差が無かった。つまりシスプラチンによる DNA 損傷後の HR 修復過程においては、初期段階では、5つの Rad51 パラログは協同的に働き、後期段階では異なる組み合わせの複合体を形成して働いていると考えられた。この組み合わせは、生化学実験から定義された二つの複合体（BCDX2、DX3）の存在を裏付けている。さらに、シスプラチン感受性に対応して、chromosome-type や、exchange 型の断裂が増加したことは、姉妹染色体が対合した後の HR 後期段階で、Rad51 パラログが作用していることを示唆している。恐らく生化学的研究から報告されているように、Rad51 パラログは Holliday junction が解消される段階で働いているのかもしれない。本研究では、パラログ分子の詳細な機能解析により、DNA 複製に関係した HR 修復の特別な側面が明らかになった。



本研究での二重破壊株
生化学的検討と遺伝学的検討と一致



パラログ欠損による
chromosome-type 断裂発生モデル

論文審査の結果の要旨

高等動物細胞の DNA 組換え修復において、中心的役割をもつ Rad51 蛋白の活性を調節する Rad51 パラログ（Rad51B、C、D、XRCC2、3）は、それぞれの遺伝子破壊細胞の表現型がお互いに似ていることから、5つすべてが初期段階に協調的に働いていると考えられていたが、生化学実験から、少なくとも二つの複合体（Rad51B/C/D/XRCC2、Rad51C/XRCC3）の存在が示唆されている。今回、異なる複合体間（xrcc3/rad51d）と、同一複合体内（rad51b/rad51d）で、二重欠損株を作成・検討することで、異なる損傷においても初期段階である Rad51 活性刺激については協調的に働くが、シスプラチン損傷においては、DNA 組換え修復の後期段階に少なくとも二つの複合体を形成していることが遺伝学的に示された。この研究は抗がん剤の作用を効果的する方法を考える上で意義があり学位の授与に値すると考える。