

Title	Homology-directed Fanconi anemia pathway cross-link repair is dependent on DNA replication
Author(s)	中西, 康詞
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59782
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【134】

氏名	中 西 康 詞
博士の専攻分野の名称	博 士 (医学)
学位記番号	第 25599 号
学位授与年月日	平成24年8月21日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Homology-directed Fanconi anemia pathway cross-link repair is dependent on DNA replication (ファンコニ貧血遺伝子による相同組換え DNA 架橋修復機構は DNA 複製に依存する)
論文審査委員	(主査) 教授 大 菌 恵一 (副査) 教授 金 倉 謙 教授 仲 野 徹

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

哺乳類における DNA は日常より数々の因子により損傷を受けているが、その損傷の種類によって修復される機構も異なっている。私は DNA 二重鎖間が架橋され、DNA 複製の際に障害となる DNA 架橋の修復に注目し、細胞が DNA 架橋に特異的に高い感受性を示す疾患、ファンコニ貧血に焦点をおき研究を行ってきた。ファンコニ貧血遺伝子に異常を持つ細胞と自然型細胞を比較し、DNA 架橋修復過程での差異を見出すことによって研究した。

ファンコニ貧血は稀な劣性遺伝病であり、再生不良貧血、発達異常、高発癌性を特徴とする。DNA 架橋修復に欠陥があり、細胞はそれを形成する因子、例えばシスプラチンなどの抗癌剤に高感受性を示す。責任遺伝子は FANCA と呼ばれ、これまで 15 種類が見出されている。例えばファンコニー A 型の原因遺伝子は FANCA であり、同様に B,C,D1、D2 などが存在する。

FANCD2, FANCI はお互い結合し、DNA 損傷に応じてモノユビキチン化される。また、家族性乳がん遺伝子として知られる BRCA2 もファンconi 貧血の原因遺伝子の一つである (FANCD1)。また、損傷した DNA を修復する方法は単一ではない。そのうち一つが相同組み換えと呼ばれる修復方法である。私は参考論文で DNA 二重鎖切断を修復する際に遺伝子相同組換えを研究し、ファンconi 貧血細胞においては相同組換えが若干低下していることを見出した。しかしファンconi 貧血細胞は一般に DNA 架橋因子には高感受性を示すが、放射線照射など DNA 二重鎖切断には感受性を示さない。今回の目的はそういった矛盾を解決し、DNA 二重鎖架橋修復の経路を解明し、それを数値にて定量化する方法を開発することである。

〔方法ならびに成績〕

遺伝子組換えの定量で一般的な方法として、DR-GFP レポーターを用いたアッセイがある。DR-GFP はプラスミドとして実験室に保存され、一般にゲノムに統合されて用いられる。DR-GFP は稀切断酵素である I-SceI サイトに隣接したストップコドンをもつ、不活化された GFP 部分 (SeeGFP) と、本来の GFP 配列を持つが一部のみである部分 (iGFP) から成る。I-SceI によって DNA が切断されるとそれを修復すべく、iGFP を鋳型として遺伝子の相同組換えが行われる。その結果、I-SceI サイトとストップコドンは通常の GFP 遺伝子に置き換えられ、GFP が発現し、発光する。相同組換えが低下した細胞においては、GFP 発光をする細胞の頻度が有意に低下する。DNA 二重鎖架橋と相同組換えの関係を研究するために特異的部位に架橋を起こすことが可能な Triplex Forming Nucleotides (TFO) という二重鎖 DNA に配列特異的に接着し、三重鎖 DNA を形成するオリゴヌクレオチドにソラレンを結合したものをを用い、DR-GFP の二重鎖切断サイトを TFO 配列に変更したものをを用いた。このアッセイを TR-GFP アッセイと名付けた。DR-GFP アッセイと違い、プラスミドそのものを細胞に導入し、2 日後プラスミド間で起こった相同組換えを調査した。

まず、特定の遺伝子がノックアウトされたマウスの ES 細胞を用い、TR-GFP アッセイを行った。その結果、相同組換えが低下していることが知られている BRCA1 ノックアウト細胞では二重鎖切断、架橋後ともに相同組換えが低下しており、このアッセイが有意義であることが示された。相同組換えと共に主な DNA 修復経路である非相同末端再結合の責任遺伝子である Ku70 ノックアウト細胞においては、二重鎖切断修復においては相同組換えが相補的に上昇していたが、DNA 架橋修復では変化がなかった。また、ファンconi 遺伝子ノックアウト細胞では二重鎖切断、架橋後ともに 1.5~2 倍の差がでたにとどまった。

次にヒトの細胞、正常細胞として骨肉腫細胞 U2OS とファンconi 貧血細胞 GM6914 とそれを FANCA 遺伝子で補足された細胞で実験を行った。通常、プラスミドは細胞内で複製されず速やかに分解されるが、今回 EB ウィルスの抗原である EBNA1 を発現した細胞で、自己複製が可能な OriP 配列を持つプラスミド、TR-OriP を使用し、DNA 複製と DNA 修復の関係を調査した。DNA 自己複製型プラスミドを使用することによってファンconi 細胞では、DNA 架橋後の相同組換えが DNA 増幅依存性に著しく低下しており、DNA 架橋修復は二重鎖切断修復と違い DNA 増幅依存性に、相同組換えを主な経路として示唆された。

〔総括〕

今回、私は初めて DNA 架橋の修復が DNA 複製依存性に相同組換えを主に修復されることを明らかにした。これらのアッセイは簡便であり、今後細胞の抗癌剤などの感受性を確認する手段としても有益であると思われる。

論文審査の結果の要旨

哺乳類における DNA は日常より数々の因子により損傷を受けているが、その損傷の種類によって修復される機構も異なっている。私は DNA 二重鎖間が架橋され、DNA 複製の際に障害となる DNA 架橋の修復に注目し、細胞が DNA 架橋に特異的に高い感受性を示す疾患、ファンconi 貧血に焦点をおき研究を行ってきた。

〔方法ならびに成績〕

相同組換えの定量で一般的な方法として、DR-GFP レポーターを用いたアッセイがある。DR-GFP は一般にゲノムに統合されて用いられる。今回、それを改変し特異的に架橋を起こすために Triplex Forming Nucleotides (TFO) という二重鎖 DNA に配列特異的に接着し、三重鎖 DNA を形成するオリゴヌクレオチドにソラレンを結合したものをを用い、DR-GFP の二重鎖切断サイトを TFO 配列に変更したものをを用いた。このアッセイを TR-GFP アッセイと名付けた。

まず、特定の遺伝子がノックアウトされたマウスの ES 細胞を用い、TR-GFP アッセイを行った。ファンconi 遺伝子ノックアウト細胞では二重鎖切断、架橋後ともに 1.5~2 倍の差がでたにとどまった。通常、プラスミドは細胞内で複製されず速やかに分解されるが、今回 EB ウィルスの抗原である EBNA1 を発現した細胞で、自己複製が可能な OriP 配列を持つプラスミド、TR-OriP を使用し、DNA 複製と DNA 修復の関係を調査した。

DNA 自己複製型プラスミドを使用することによってファンconi 細胞では、DNA 架橋後の相同組換えが DNA 増幅依存性に著しく低下していることが明らかになった

〔総括〕

今回、私は初めて DNA 架橋の修復が DNA 複製依存性に相同組換えを主に修復されることを明らかにした。

これらのアッセイは簡便であり、今後細胞の抗癌剤などの感受性を確認する手段としても有益であると思われる。