



Title	Involvement of Rev1 in alkylating agent-induced loss of heterozygosity in <i>Oryzias latipes</i>
Author(s)	藤川, 芳宏
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/76232
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 藤川 芳宏			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	大阪大学教授	中国 慎一郎
	副 査	大阪大学教授	岡田 隆象
	副 査	大阪大学教授	谷内田 真一

論文審査の結果の要旨

DNAポリメラーゼはDNA1本鎖を正確に読み取り、相補DNA鎖を伸長することによりDNAを複製する酵素である。DNA損傷部位では、DNA複製は一旦停止するが、損傷乗り越え (TLS) DNAポリメラーゼによりDNA合成を行うことで複製を回復する。一方、TLSは突然変異を誘発することが示されている。

藤川らは、損傷乗り越え型ポリメラーゼの突然変異誘発や発がんにおける役割とその生物学的意義を解明するため、損傷乗り越え型ポリメラーゼの1つであるRev1遺伝子の発がん誘発/抑制機能を解析するという着想のもと、Rev1遺伝子変異体メダカを作成し、個体からゲノムレベルまでの包括的な解析を行った。dCMP転移酵素活性を欠損したRev1変異体では、化学変異原により野生株に比べ高頻度に肝臓がんが誘発された。化学変異原処理された変異体細胞のゲノムでは、ヘテロ接合性喪失の多発が確認され、これが発がんの一要因であることが示された。

これらの研究成果は、ヘテロ接合性維持におけるRev1の新機能を示唆するとともに、ゲノム恒常性維持機構の破綻による発がん機構の一端を明らかにしたものであり、博士 (医学) の学位授与に値するものと認める。

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	藤川 芳宏
論文題名 Title	Involvement of Rev1 in alkylating agent-induced loss of heterozygosity in <i>Oryzias latipes</i> (メダカRev1はアルキル化剤により誘発されるヘテロ接合性喪失に関与している)
論文内容の要旨	
〔目 的(Purpose)〕	
アルキル化剤はゲノムDNAにDNA損傷を誘発するが、それらは細胞の致死や突然変異の原因となり、最終的には発がんを引き起こす。ゲノム複製を司るDNAポリメラーゼによるDNA合成反応は損傷部位で阻害され、複製フォークを停止してしまう。複製フォークの停止はDNA二本鎖切断を誘発し、挿入・欠失・染色体異常のような染色体不安定性を引き起こす。一方、損傷乗り越え (TLS) ポリメラーゼは、損傷部位においても塩基挿入が可能であり、複製フォークの停止を回避できる。しかしながら、このDNA合成反応においては誤った塩基が挿入されやすく、点突然変異が誘発される。つまりTLSポリメラーゼは点突然変異を引き起こしてでも、DNA二本鎖切断による大規模なゲノム変異を抑制することで、発がんなどの最終影響を回避するユニークなDNAポリメラーゼである。本研究で着目したRev1はTLSポリメラーゼの1つであり、TLS反応において2つの重要な活性を持つ。1つは脱塩基部位やグアニン塩基損傷に対してシトシン塩基を挿入するdCMP転移活性である。もう1つは、C末端側領域を介した他のTLSポリメラーゼとの複合体形成による、DNA損傷部位でのTLS反応における足場タンパクとしての機能である。本研究では各々の機能を欠損した<i>rev1</i>変異体をメダカにおいて作成し、Rev1の発がん抑制における役割の解析を行った。	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<i>rev1</i>の発がんにおける役割を明らかにするために、メダカにおいてTILLING (Target Induced Local Lesion in Genome) 法を用いて3種類の<i>rev1</i>遺伝子変異体 (<i>rev1</i>ヌル欠損 (RX) 変異体、dCMP転移活性 (HN) 変異体、C末相互作用領域 (LX) 変異体) を作製した。これら変異体を用い、肝がんを誘発するアルキル化剤Diethylnitrosamine (DENA) による発がん実験を行った。各変異体に60 ppmのDENAを2週間曝露し、その後4ヶ月間通常飼育した後に、生き残った個体の肝臓での発がんの有無を組織病理学的に解析した。RXとLX変異体はDENA曝露4か月後には20%ほどしか生存していなかったが、生存個体での肝臓の発がんはほとんど見られなかった。一方、HN変異体は野生型と同様、DENA曝露4か月後には90%近く生存していたが、意外なことに生き残った個体のうち60%という高頻度で肝臓にがんが生じていた。このことからRev1のdCMP転移活性はDENA誘発の肝がんを抑制していることが明らかになった。次に、HN変異体でDENAにより誘発される突然変異を次世代シーケンサーにより解析した。各変異体の初期胚から培養細胞株を樹立し、これらを解析対象とした。DENA感受性をコロニー形成法で解析し、HN変異体と野生型細胞の生存率が5%になるようなDENAの濃度でそれぞれの細胞を曝露し、通常の培養液に戻した後4日間培養し変異を固定した。更に、細胞を薄く播き直し、単一細胞由来のコロニーを単離した。これらのコロニーからゲノムDNAを抽出し、次世代シーケンサーで19番染色体の前半領域 (約11 Mb) に生じた変異を解析した。その結果、DENA誘発変異の頻度とスペクトラムは野生型とHN変異体で大きな差はなかった。通常、変異は2本の染色体の片方にのみ誘発されるので、誘発変異はヘテロに生じるはずであるが、HN変異体においては変異がホモになっている場所が存在することを見出した。これはヘテロ接合性喪失 (LOH) が生じた可能性を示唆している。また、検出された変異のリード数の割合がヘテロとホモの中間の値を示す変異も見つかった。そこで、解析対象としている細胞集団中の各細胞の変異パターンを解析することとした。最初に単離した単一細胞由来の細胞集団を再度薄く播き直し、再びシングルコロニーを単離した後、LOHが生じた部位をキャピラリーシーケンサーで直接解析する、といった方法を用いた。その結果、HN変異体では野生型と比べて高頻度にLOHが生じていることが明らかになった。また、変異部位の一部では、ヘテロ変異とホモ変異いずれもが再単離したシングルコロニー中に検出されることから、DENA曝露による変異誘発・固定後、数回の細胞分裂の間にLOHのイベントが経時的に生じていることが示唆された。	
〔総 括(Conclusion)〕	
本研究により、Rev1のdCMP転移活性にはDENA誘発の肝がんを抑制する働きがあることが明らかになった。更に、dCMP転移活性によるLOHの抑制が、発がん抑制メカニズムであることが示唆された。以上の結果は、発がんの重要なステップであるLOHにTLS経路が関与しているという新たな知見であり、医学の発展に寄与するものである。	