

審査の結果の要旨

氏名 五十嵐 健人

本研究は脊椎動物におけるモデル動物の一つであるメダカ (*Oryzias latipes*) の地域集団間の配列比較から、NBS1 遺伝子の多型 (Q170H) を見出し、このアミノ酸変異による DSB 修復機能の変化を明らかにしたものである。

第 1 章では、近交系メダカ 5 系統間の配列比較によって Nbs1 Q170H 変異を見出した。において Q170 型 Nbs1 (野生型)あるいは H170 型 Nbs1 (変異型)を過剰発現する、Hd-rR 系統メダカ胚由来の培養細胞 Hd-rRe3 株において Venus タグ融合 Nbs1 タンパク質の集積動態を比較し、H170 型 Nbs1 がより多く DSB 部位へ集積することを明らかにした。中性コメットアッセイより DSB 修復の遅延がもたらされることが明らかとなった。また γ -H2AX フォーカスを指標として DSB 修復能を評価した場合においても H170 型 Nbs1 過剰発現細胞において修復能が低下していることが示唆された。DNA-PK は DSB 修復において重要な役割を果たす因子であるが、Nbs1 との機能的な関わりは明らかになっていない。DNA-PK T2609 残基は DSB をきっかけとして、ATM や DNA-PK キナーゼによってリン酸化を受け、NHEJ 経路による修復をすすめ、HR 経路による修復を促進するシグナルとなると考えられる。ガンマ線 (5Gy) 照射 30 分後において、H170 型 Nbs1 過剰発現細胞は Q170 型 Nbs1 過剰発現細胞と比べて、リン酸化 DNA-PK フォーカス数の減少がみられていた。次に DNA-PK 阻害剤あるいは ATM 阻害剤を処理した Q170 型 Nbs1 過剰発現細胞においてリン酸化 DNA-PK フォーカスの減少がみられた。これに対し H170 型 Nbs1 過剰発現細胞においては DNA-PK 阻害剤処理によってはリン酸化 DNA-PK フォーカスは減少せず、ATM 阻害剤処理によりリン酸化 DNA-PK フォーカスの減少がみられた。以上の結果から H170 型 Nbs1 を過剰発現する細胞においては、DSB 部位へ H170 型 Nbs1-Venus が多く集積し、DNA-PK の自己リン酸化が抑制された結果、DSB 修復遅延が招かれたと考えられた。

第 2 章では、DNA-PKcs R3715X 変異をもつ DNA-PK 欠損メダカ系統の胚より DNA-PK 欠損メダカ細胞を作製した。DNA-PK 欠損細胞は野生型細胞と比較してコロニー形成能の低下を示し、ガンマ線に対し高感受性を示した。DNA-PK 欠損細胞において Q170 型 Nbs1-Venus を過剰発現させた場合は、ガンマ線 5Gy 照射 30 分後から 6 時間後にかけて γ -H2AX フォーカスが減少しており、過剰発現した Q170 型 Nbs1 によって修復が勧められているものと考えられた。これに対し、DNA-PK 欠損細胞において H170 型 Nbs1 を過剰発現させた場合には、ガンマ線 5Gy 照射 30 分後から 6 時間後にかけて γ -H2AX フォー

カスの減少はみられておらず、H170 型 Nbs1 の過剰発現は DNA-PK の修復効率の低下を相補しないと考えられた。以上の結果から、H170 型 Nbs1 は DNA-PK のキナーゼ活性に依存しない DSB 修復経路を阻害し、DSB 修復の遅延を招いていることが示された。

第 3 章では、H170 型 Nbs1 が東韓集団において高頻度に分布する要因を明らかにするため、野生集団由来メダカサンプル 56 個体より取得した *nbs1* 遺伝子部分配列 (*nbs1* Q170 残基周辺の 341 bp) より集団遺伝学的解析を実施した。*nbs1* Q170 を含むエキソン 5 (104 bp) の配列について系統ネットワーク解析によるところ、Q170 型が 4 つの地域集団全てと近縁種 (*O. luzonensis*, *O. curvinotus*) に共有される祖先型であることがわかり、東韓集団においては派生型である H170 型 *nbs1* が高頻度に分布していることがわかった。東韓集団におけるエキソン 5 配列は他の 3 つの地域集団から遺伝的に分化している傾向を示した。東韓集団メダカ 12 個体より取得した 24 本の *nbs1* 遺伝子部分配列 (Q170 周辺 341bp) より算出した Tajima's *D* 値は負の値 (-1.65) を示したが、 β 分布近似による 95%信頼区間と照らして検定した結果、統計的有意性は示されなかった。本論文では、メダカ Nbs1 において Q 型に対し、H 型変異は、DSB 修復機能の低下を招くことを明らかにしたが、東韓メダカ集団における高頻度 H 型変異の成立過程を検討するには、さらなるゲノムの多型性解析が必要である。

本論文第 1 章は京都大学 小林純也准教授、第 3 章は岡山大学 勝村啓史博士他との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。

以上 1995 字