

論文審査の結果の要旨

氏名 橋本 拓磨

DNA は、遺伝情報を担う重要な生体分子であるが、活性酸素や放射線など様々な内的・外的要因により頻繁に傷害を受ける。多くの生物はこれらの傷害を速やかに修復する複数のメカニズムを備えているが、高線量の放射線照射など極端な傷害を受けた場合は修復を完了することができず、がん化や死に至る。緩歩動物門に属するヨコヅナクマムシ (*Ramazzottius varieornatus*) は、ヒトの半致死量をはるかに超える線量(約 4000 Gy)の放射線を照射されてもほぼ 100%の個体が生存する。こうした極めて高い放射線耐性を示すクマムシ類には、特有な防御・修復メカニズムが存在すると考えられるが、その分子的な実体はまったく分かっていなかった。論文提出者は本研究において、クマムシのクロマチン分画から同定されていたクマムシ固有な遺伝子がコードするタンパク質、S261 に着目し、遺伝子操作が容易なヒト培養細胞に発現することで、このタンパク質の分子機能、および放射線耐性への寄与を解析した。

本論文は 2 章からなる。第 1 章では、まず、クマムシ固有な遺伝子がコードする S261 タンパク質の機能解析を目的として、S261 の構成的発現コンストラクトをヒト培養細胞株 HEK293 に導入し、S261 を安定的に発現する細胞株を樹立した。この発現株に 5-10Gy の X 線を照射した後、生じた DNA 断片の量をコメットアッセイ法 (1 細胞電気泳動法) で解析した結果、DNA の断片化が親株と比較して約 50-60%に減少することを見いだした。この DNA 切断の減少は、 γ H2AX とよばれる、DNA 切断が修復された後も持続する DNA 切断マーカを指標とした場合でも観察されたことから、S261 は修復の促進ではなく切断の発生抑制に寄与することを示唆した。さらに、ショートヘアピン RNA を導入して S261 の発現を低下させると、DNA 保護効果が完全に消失することを示し、S261 がこれらの DNA 保護活性を担う実体であることを明らかにした。以上の解析結果を元に、このタンパク質を新たに **Damage Suppressor (Dsup)**と命名した。放射線による DNA 切断は直接作用のほか、放射線により励起された水分子から発生する活性酸素種を介した間接作用によって引き起こされる。そこで、活性酸素

種の一つである過酸化水素によって引き起こされる DNA 切断に対する影響を解析した結果、Dsup は過酸化水素による DNA 切断も抑制することが明らかになった。このことは Dsup による放射線からの DNA 保護も、放射線の間接作用の抑制が原因であることを示唆している。さらに、ほぼ致死線量の放射線（4Gy の X 線）を照射した後の細胞の増殖能を解析した結果、Dsup 非導入株やノックダウン株が増殖能を喪失したのに対し、Dsup 発現株では一部の細胞が増殖能を維持することを示し、Dsup がヒト培養細胞の放射線耐性を向上させることを明らかにした。

第 2 章では、Dsup タンパク質の 1 次構造について検討し、中央部に両親媒性 α ヘリックス構造、C 末端側に核局在シグナルを含み、塩基性アミノ酸に富む領域があることを見出した。各領域を欠失した変異体を作成して性状を解析した結果、C 末端側領域が核 DNA との共局在、および *in vitro* での DNA との会合に必要な十分であることを見出した。C 末端側領域を欠いた Dsup タンパク質では、DNA 保護活性や放射線耐性の向上能が低下することを示し、DNA の保護には DNA との共局在が重要であることを示唆した。一方で、C 末端側領域だけを発現させると、染色体 DNA の異常な凝集が観察され、安定的に維持できる細胞株は樹立できなかつた。Dsup の N 末端側領域や中央領域は、Dsup による染色体 DNA の異常な凝集を防ぎ、安定的な生命活動に寄与する可能性がある。

以上、本研究ではヨコヅナクマムシ固有な Dsup タンパク質の分子機能を解明し、クマムシの高い放射線耐性を支える分子基盤の一端を初めて明らかにした。本研究成果は、放射線耐性動物由来の遺伝子を導入することで動物培養細胞の放射線耐性が向上した初めての例であり、極限環境生物学分野の先駆的、かつ独自性の高い研究成果といえる。加えて DNA との会合に必要な領域を特定し、これが DNA 保護に必要な一方で、安定的な生命活動と両立させるためには他の領域も必須であることを示唆した。これらの成果は今後、クマムシのもつ高い放射線耐性機構の分子機構の解明に貢献するものと期待される。

なお、本論文は、榎本敦・宮川清・久保健雄・國枝武和（以上、東京大学）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（理学）の学位を授与できると認める。