論 文 の 内 容 の 要 旨

論文題目　　メダカ野生集団において許容されるDSB修復遺伝子の種内変異の検証

氏　　名　　五十嵐　健人

【序論】

DNA 二本鎖切断（DSB）は放射線などによって誘発される重篤な DNA 損傷の一つである。DSB は突然変異や細胞死の原因となるため、一連のタンパク質（DSB 修復因子）群の相互作用（修復経路）により速やかに修復される。突然変異により DSB 修復因子表面のアミノ酸が変化すると、分子間の相互作用が変化させられ DSB 修復効率を変化させ得ることから、野生動物集団に分布する DSB 修復因子の非同義多型の中には DSB 修復効率を変化させるものが含まれると予想される。

修復効率の低下を招く突然変異は生存に不利に働くため、やがて集団から消失すると考えられる。しかしヒトではがんなどの疾患リスクの上昇と関連する DSB 修復遺伝子の多型が数多く報告されており、実際には消失されずに集団内に維持されている。DSB 修復遺伝子の多型は局面によっては生存上のメリットをもたらし得るために集団内に維持されているものと予想され、これには野生動物集団の遺伝的多型に基づく検証が必要である。

霊長類を対象とした先行研究により複数の DSB 修復遺伝子に正の自然選択の痕跡が示唆されている（Demogines, 2010）。霊長類野生集団に見られる変異を対象として DSB 修復因子の機能差を検証することは困難であることから、本研究ではモデル生物としてメダカに着目し、東京大学および NBRP において系統維持される野生由来のメダカ集団の示す大きな種内遺伝的多様性を利用した実験生物学的アプローチを試みた。DSB 修復因子である NBS1 遺伝子の特定の多型が機能にもたらす影響を実証するとともに、修復効率の低下を招く遺伝子変異が野生集団内で高頻度に維持される要因について集団遺伝学的検討を加えた。

【結果と考察】

1. olNbs1 Q170H 変異は機能変化をもたらす候補として同定された

ヒト NBS1 は多型性を示し、Q185 残基にグルタミン酸への変異をもつ E185 アリルが高頻度に存在する（東京での Q185 アリル頻度は 45%, イタリアでの頻度は 31%）。この Q185E はがん罹患リスクの低下との関連が報告されており、DSB 修復機能上重要なアミノ酸残基であると考えられる（Berardinelli 2013）。近交系メダカ 5

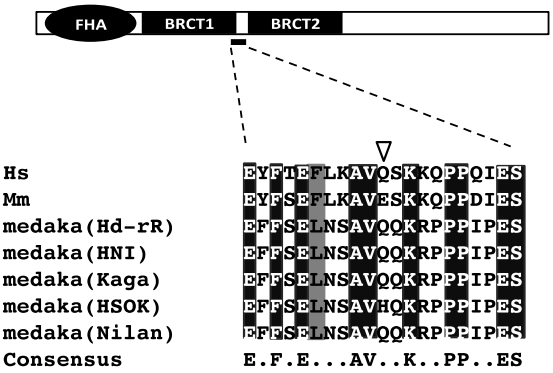


図 1. ヒト NBS1 の 2 次構造模式図(上段)。

ヒト NBS1 Q185 残基周辺 21 アミノ酸のアライメント(下段: Hs, human; Mm, mouse; medaka)。ヒト NBS1 Q185 残基の位置を矢じりで示す。

系統間のゲノム情報をもとに olNbs1 の非同義多型を探索した。東韓集団由来の近交系 HSOK 系統メダカにのみ見られた Q170H 変異は、がん罹患リスクとの相関が報告されているヒト NBS1 の Q185 残基と対応するアミノ酸残基として位置しており、その機能的な重要性が予想された（図１）。

野生由来メダカ系統 56 個体より抽出したゲノム DNA を解析したところ、東韓集団の大多数のメダカが Q170H 変異を有し、南北日本メダカ集団及び中国メダカ集団では見られなかった（図 2）。この結果から *olnbs1* H170 アリルは東韓集団に高頻度に広がる派生型であると考えられた。

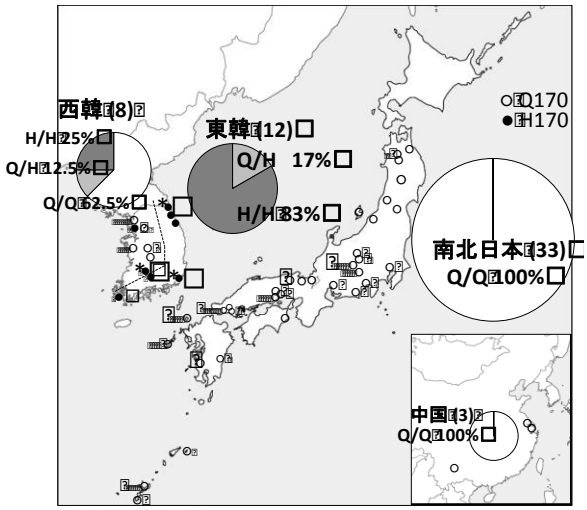
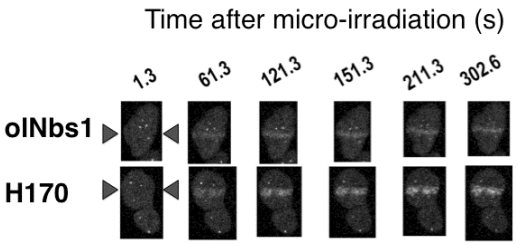


図 2. 野生メダカ集団における olNbs1 (○), olNbs1 (H170; ●)の分布。各集団の遺伝子型の構成を円グラフで示す。ヘテロ個体の観察された地点を*で示す。

2. olNbs1(H170)は DSB への集積が強く、DSB 修復を遅延させる

ヒートショックプロモーター下で 41ºC 2 時間の処理により蛍光タグをつけた野生型 olNbs1 (olNbs1-Venus) あるいは変異型 olNbs1 (olNbs1(H170)-Venus)が安定的に発現誘導されるメダカ胚由来細胞株を樹立した。NBS1 はガンマ線やレーザー照射により生じる DSB 部位に速やかに集積することが知られている。405 nm レーザー照射により生きた細胞内局所に DSB を生成させた後、15 秒ごとに画像取得し、細胞核内局所の DSB 領域における蛍光タンパク質の集積動態をライブイメージングした。olNbs1(H170-Venus は、olNbs1-Venus 発現細胞と集積ピーク到達時間は同じであったが、より多くの olNbs1(H170)-Venus が DSB 領域に集積した（図３）。



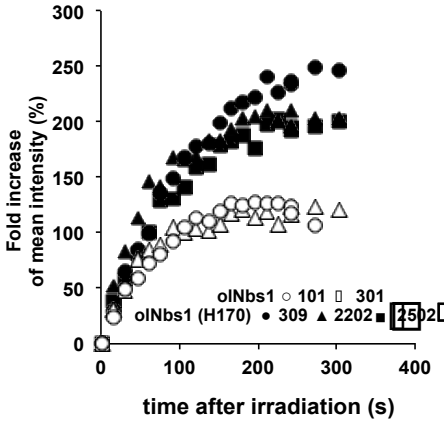
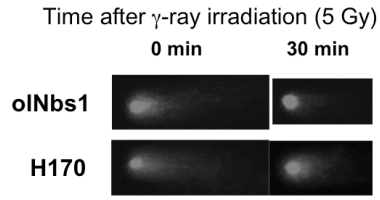


図 3. 細胞内局所 DSB 領域に対する olNbs1−Venus タンパク質の集積。 縦軸に照射領域の平均輝度の増加分を示した。

樹立した細胞株間で中性コメットアッセイを実施し、Casp software によって算出した各コメット像の Tail moment score（Tm 値）をもとにガンマ線（5Gy）照射後の DSB 量を評価した。解析した細胞株間でガンマ線照射直後の Tm 値に有意差は見られなかった。ガンマ線照射 30 分後には、olNbs1(H170)-Venus 発現細胞株では olNbs1-Venus 発現細胞株と比べて Tm 値が高く、DSB 修復が遅れ

ていることが示唆された（図 4）。



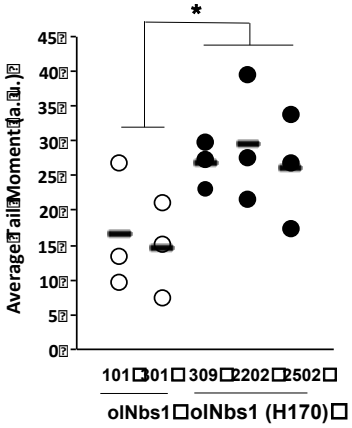


図 4 コメットアッセイによる DSB 修復能の比較（n =100, N = 3）。統計検定には Welch's *t* test を用いた。*: *p* < 0.01

3. olNbs1（H170)は DNA-PKcs と独立に DSB 修復を阻害する

DNA-PKcs は DSB 末端上で複合体（DNA-PK）を形成し修復に必要な因子群をリン酸化する。DNA-PKcs T2609 残基は DNA-PK 自身あるいは他のキナーゼによりリン酸化され HR 経路や NHEJ 経路に必要な因子のリクルートを促すシグナルとなる。抗リン酸化 DNA-PK (pT2609)抗体を用いた免疫蛍光染色を実施した結果、olNbs1-Venus 発現細胞ではリン酸化 DNA-PK 陽性細胞（> 30 foci/cell）の割合が 50%であったのに対し、olNbs1(H170)-Venus 発現細胞ではリン酸化 DNA-PK 陽性細胞の割合が 15%であり、olNbs1(H170)-Venus 発現により DNA-PKcs のリン酸化が低下していることが分かった。ここまでの結果から、olNbs1(H170)は olNbs1-Venus と比べて DSB 部位への集積が亢進し、DNA-PKcs のリン酸化の低下を介して DSB 修復の遅延をもたらすことが推測された。

変異原処理により作出された変異体メダカライブラリより DNA-PKcs キナーゼドメイン直前にナンセンス変異（R3715X)をもつ変異体メダカ（DNA-PKcs 欠損メダカ）が見出されている。このナンセンス変異をホモ接合でもつメダカ胚より DNA-PKcs 欠損細胞を作製した。ガンマ線（5Gy）照射 30 分後の DNA-PKcs 欠損細胞 e17 株の DNA-PKcs pT2609 フォーカス数は野生型細胞 e13 株と比べて少なく、e17 細胞ではナンセンス変異により DNA-PK のキナーゼ活性が喪失していると確認された。抗リン酸化ヒストン H2AX（γ-H2AX）抗体を用いた免疫蛍光染色により検出されるγ-H2AX フォーカス数をもとに細胞内の DSB 量を評価した。ガンマ線（5Gy）照射 30 分後の e17 細胞株のγ-H2AX フォーカス数は e13 細胞株と変わらないが、6 時間後のγ-H2AX フォーカス数は e13 細胞株と比べて多く観察され、e17 細胞では DSB 修復が遅延してγ-H2AX フォーカスが残存しているものと考えられた（図 5A）。

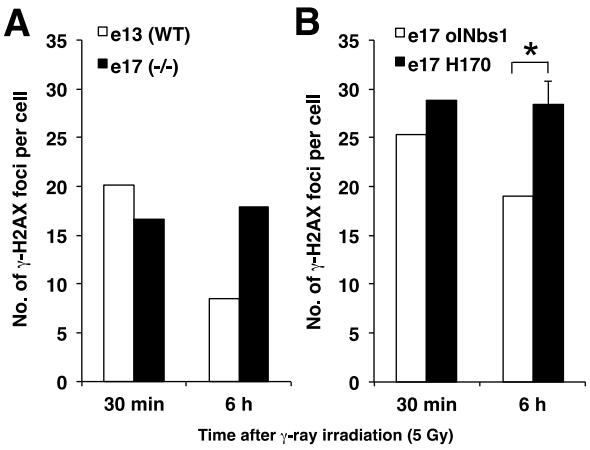


図 5. DNA-PK 欠損細胞ではγ-H2AX フォーカスがより多く残存した（A）。olNbs1(H170)-Venus を過剰発現する DNA-PKcs 欠損細胞ではγ-H2AX フォーカスが相加的により多く残存した（B）。それぞれガンマ線(5Gy)照射 30 分後及び 6 時間後の細胞あたりのγ-H2AX フォーカス数を示す。エラーバーは標準偏差を示す。有意差検定は Welch's *t* test を用いた。*: *p* < 0.05

e17 細胞において olNbs1-Venus あるいは olNbs1(H170)-Venus を過剰発現させ、ガンマ線 5Gy 照射 6 時間後のγ-H2AX フォーカス数により残存する DSB 量を評価した。olNbs1(H170)-Venus を発現する細胞では olNbs1-Venus を発現する細胞と比べてγ-H2AX フォーカス数が多く($p < 0.05$)、olNbs1(H170)-Venus の発現によって DSB 修復が相加的に阻害されていることが示唆された(図 5B)。この結果から Nbs1 の多型は DNA-PKcs キナーゼ活性に依存しない修復経路の阻害を介して DSB 修復に影響を引き起こすことが示唆された。

4. 東韓集団における *olnbs1* H170 アリルの拡大要因

野生集団 56 個体及び近縁種 2 種 2 個体の *olnbs1* Q170 残基周辺 326bp の配列を取得し、勝村啓史博士（岡山大学）とともに *Gst* 値、Tajima's *D* 値の算出及び系統ネットワーク解析を行った。*olnbs1* Q170 を含むエキソン 5 (104 bp)の *Gst* 値は、上流のエキソン 4 (158 bp)及び中間のイントロン 4 (76 bp)と比べて高く、エキソン 5 が特に遺伝的に分化していることが示された。近縁種 2 種を含めたエキソン 5 の系統ネットワーク解析から *olnbs1* Q170 が祖先型であり、H170 が派生型であることが示され、H170 は東韓集団において頻度を増した可能性が考えられた。さらに東韓集団において Tajima's *D* の値は負の値を示した（$D = -1.65$, $0.1 > p > 0.05$）。今後 *olnbs1* 遺伝子やその他の中立進化領域を対象としたさらなる解析をすることで、個体群動態の影響を考慮しつつ、H170 が頻度を増した原因のより詳細な解明が可能となる。

【結論】

本研究では、近交系メダカ 5 系統間の配列比較から olNbs1 Q170H 変異を見出した。メダカ培養細胞内で発現させた olNbs1(H170)-Venus は DSB 部位により多く集積し DNA-PKcs のリン酸化低下と DSB 修復の遅延をもたらした。olNbs1(H170)-Venus を DNA-PK を欠損するメダカ培養細胞で発現させた場合には DSB 修復が相加的に遅延した。これらの結果は olNbs1(H170)の発現が DNA-PK に依存しない DSB 修復経路を阻害していることを示唆している。東韓集団において特異的に見出された *olnbs1* H170 は、何らかの選択圧により高頻度に維持されている、あるいは、遺伝的浮動によって高頻度に存在している可能性が考えられる。これらは本研究において得られた DSB 修復における NBS1 の作用機序に関する分子レベルでの新知見であり、また今後の検証により DSB 修復因子の機能喪失型変異が特定の集団においては生存上のメリットをもたらす可能性に実証を与えることが期待される。機能低下を招く遺伝子変異が野生集団内で高頻度に維持される要因を実証的に解明する上での野生メダカ集団の多型に着目したアプローチの有効性を示した。