

論文の内容の要旨

論文題目 Rad54B の DNA 損傷応答における役割

氏名 安原 崇哲

細胞には恒常性を維持する機構が備わっており、多くの疾患はその機構の破綻によって起こると考えられる。特に、がんにおいては、その多くの場合が遺伝子機能の異常によって起こる細胞周期の制御機構の破綻であり、そのような遺伝子機能の異常は、細胞が日々受けている DNA 損傷が引き金となって起こることが想定される。DNA 損傷を受けた後の細胞の反応には、主に DNA を修復して生存を選択する場合と、アポトーシスに代表されるような細胞死を選択する場合がある。最も代表的ながん抑制遺伝子である p53 は、DNA 損傷下における細胞周期の制御や、アポトーシス経路を制御することが知られており、微妙な p53 レベルの調整によって、DNA 損傷後の応答の選択がなされることが明らかとなってきた。p53 の発現量を調節する機構は多数同定されており、その一つに、MDM2、MDMX のヘテロ二量体による p53 のユビキチン化の機構がある。MDM2 は MDMX と結合することにより、ユビキチン化活性が高まり、p53 の分解を促進することが明らかとなっていた。

DNA 損傷の中で最も致命的な DNA 二重鎖切断がおこった場合に活性化さ

れる機構の一つに、相同組換え修復があり、ゲノムの構造変換を行う酵素である Rad54 は、その機構の中で中心的な役割を果たすことが知られていた。Rad54B は Rad54 の相同遺伝子として見つかった経緯から、DNA 損傷修復の中でも特に相同組換え修復において役割を果たしていると考えられてきた。しかしながら、DNA 損傷修復における役割は、Rad54 の補助的な役割と位置づけられるにとどまっていた。

本研究ではまず、Rad54B の DNA 損傷修復における役割を明らかにするため、その細胞内局在を調べた。その結果、Rad54B は定常状態、DNA 損傷後のいずれにおいても、核内にびまん性に分布していた。次に、Rad54B の発現を低下させた細胞において DNA 損傷後の DNA 損傷量の推移を調べたが、DNA 損傷の有意な増加は認められなかった。以上のことから、Rad54B が DNA 損傷修復において補助的な役割しか担っていないということが示唆された。一方で、DNA 損傷後の Rad54B の発現レベルは非常に動的な制御を受けており、DNA 損傷応答の初期において発現が誘導され、その後期においては p53 依存的に抑制されていた。従って、Rad54B は DNA 損傷応答において、DNA 修復における役割の他に、何らかの機能を果たしていると考えられた。

実際、Rad54B は定常状態、DNA 損傷後のいずれにおいても、p53 タンパク質の量と機能を抑制していた。Rad54B は、p53 タンパク質を不安定化し、ユビキチン化された p53 タンパク質の量を増加させていた。そのメカニズムとして、Rad54B が MDM2-MDMX ヘテロ二量体の形成を促進していた。さらに、Rad54B は MDM2 と MDMX の両方に直接相互作用しており、Rad54B が

MDM2 に MDMX を誘導するための足場となることでヘテロ二量体の形成を促進していることが明らかとなった。

このような Rad54B による p53 の抑制によって、DNA 損傷 G1/S チェックポイントおよび G2/M チェックポイントの両方が抑制され、DNA 損傷後の細胞周期の進行を促進することが明らかとなった。特に、Rad54B によって DNA 損傷 G2/M チェックポイントが無効化された場合には、染色体の断片化が誘導された。一方、Rad54B の発現を増加させた正常細胞を解析したところ、DNA 損傷を与えた後の p53 タンパク質の量が減少し、DNA 損傷 G1/S チェックポイントが無効化された。さらに、Rad54B は DNA 損傷後の細胞の長期生存を促進し、ゼノグラフトモデルにおいても、Rad54B は DNA 損傷薬剤の治療効果を低下させることが明らかとなった。従って、このような DNA 損傷下での細胞周期進行の促進は、正常細胞が腫瘍化する際の第一歩となることが想定され、Rad54B は、がんの発生や、がんの悪性化を導くメカニズムに関与していることが示唆された。

最後に、データベースを用いて臨床検体における Rad54B の発現量を解析したところ、種々の固形腫瘍において Rad54B の有意な上昇が見られ、大腸良性腫瘍においては全てのサンプルにおいて Rad54B 発現量の上昇が見られることが明らかとなった。また、脳腫瘍サンプルにおける Rad54B の発現量の増加は生存率の低下と関係しており、Rad54B は新たながん治療の標的となりうることが示唆された。

このように本研究では、Rad54B の新たな機能として、p53 のレベルおよび機

能を抑制することを発見した。そのメカニズムとして、**Rad54B**が**MDM2**および**MDMX**と直接結合することでそれらのヘテロ二量体の形成を促進し、**p53**のユビキチン化を介して、分解を促進していることを明らかにした。さらにこの**p53**抑制機構は、DNA損傷下において**G1/S**および**G2/M**チェックポイント機構を無効化することで細胞周期を進行させ、細胞の生存を促進する一方、ゲノムの不安定性を誘導することを明らかにした。さらにデータベースの解析から、**Rad54B**の過剰発現は多くのがんにおいて観察され、脳腫瘍においては予後不良と関与することも示された。以上のことから、**Rad54B**は**p53**を介してDNA損傷後の細胞周期の進行を制御することで、がんの発生や悪性化の過程の基盤となるメカニズムに関与していると考えられ、その機能を抑制することは、新たながん治療戦略となることが示唆された。