



TITLE:

UBC13-Mediated Ubiquitin Signaling Promotes Removal of Blocking Adducts from DNA Double-Strand Breaks(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Akagawa, Remi

CITATION:

Akagawa, Remi. UBC13-Mediated Ubiquitin Signaling Promotes Removal of Blocking Adducts from DNA Double-Strand Breaks. 京都大学, 2020, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2020-09-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k22730>

RIGHT:

京都大学	博士 (医学)	氏 名	赤 川 礼 美
論文題目	UBC13-Mediated Ubiquitin Signaling Promotes Removal of Blocking Adducts from DNA Double-Strand Breaks (UBC13 を介したユビキチン経路による DNA 二重鎖切断端の付加体除去の促進)		
(論文内容の要旨) <p>DNA 二重鎖切断 (DSB) は、1 つでも発生後一定時間再結合されないまま残ると細胞自殺を起こす。DSB の発生が、放射線治療と化学療法 (トポイソメラーゼ II 阻害剤、エトポシド) の作用機序である。DSB は、非相同末端結合経路と相同組換え経路によって修復 (再結合) される。非相同末端結合経路は、G1 期では全ての DSB を、S/G2 では 80% 以上の DSB を修復する。非相同末端結合の修復効率が、放射線治療とエトポシドの治療効果を決定する。</p> <p>非相同末端結合経路では、DSB 切断端に 5'リン酸基、3'水酸基をもつ「きれいな」DSB しか、リガーゼ酵素が再結合できない。すなわち、DSB 切断端に 5'リン酸基、3'水酸基の両方をもたない「汚い」DSB を、非相同末端結合経路は再結合できない。非相同末端結合経路に関与する分子は、抗体遺伝子 V(D)J 組換えの解析を使い、ほぼ全部同定されている。非相同末端結合経路では、汚い DSB は、リガーゼ酵素による再結合の前に、5'リン酸基と 3'水酸基をもつきれいな DSB に変換される必要がある。この汚い DSB からきれいな DSB に変換する分子機構は全くわかっていない。本研究の目的は、その変換の分子機構を解明することにある。</p> <p>電離放射線は、切断端において多種多様な化学反応を起こし、その汚い DSB 端にある各化学修飾が除去される過程を正確に追うことはできない。一方、エトポシドは切断端 5' にトポイソメラーゼ II (TOP2) 分子が共有結合した汚い DSB を発生させるが、TOP2 が切断端から除去される速度を細胞において正確に測定できる。本研究では、TOP2 を切断端から除去するのに必要な分子を同定した。次に、それらの多くが電離放射線が作った DSB 端の化学修飾を除去することを示唆するデータを得た。</p> <p>本研究では、次の 4 つの方法をとった。(i) 汚い DSB からきれいな DSB に変換する分子の候補を、文献検索により決めた。その候補分子の遺伝子の破壊細胞もしくはノックダウン細胞を作製した。(ii) (i) で作った細胞がエトポシドのパルス曝露後に TOP2 を切断端から除去する速度を測定した。(iii) 一過性に活性化された制限酵素がつくったきれいな DSB の修復速度を正確に測定できるバイオアッセイを新たに樹立した。(iv) (i) で作った細胞で、制限酵素がつくるきれいな DSB の修復速度と放射線がつくる汚い DSB の修復速度とを比較した。</p> <p>(iv) の実験結果から、予想通り、非相同末端結合はきれいな DSB の修復に必須であった。そして汚い DSB の修復はきれいな DSB の修復に比べ 5 倍以上時間がかかることを発見した。すなわち汚い DSB からきれいな DSB に変換するステップが放射線治療で生じた DSB を再結合する律速段階であることを証明した。この律速段階に関与する酵素として、UBC13 ユビキチン結合酵素、BRCA1、MRE11 DNA 分解酵素を同定した。これらの分子は、UBC13、RAP80、BRCA1 が MRE11 の局在を制御する結果、TOP2 を切断端から除去することも証明した。</p> <p>本研究では、今まで見逃されていた、汚い DSB からきれいな DSB へと変換する過程を初めて評価するバイオアッセイを樹立し、その過程に必要な遺伝子を同定した。将来、それら分子を阻害することで、エトポシドや放射線治療の効果を高めることが期待される。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

三大抗がん治療の中で、放射線治療と化学療法 (トポイソメラーゼ II (Top2) 阻害剤、エトポシド) は DNA を標的として DNA 二重鎖切断 (DSB) を発生させる。放射線やエトポシドによる DSB 切断端には、塩基損傷や阻害された Top2 が共有結合しているいわゆる「汚い」傷を生じる場合がある。こうした「汚い」傷は、非相同末端結合によって DSB 切断端が再結合できない。DSB 切断端の再結合のためには、「汚い」部分が DSB 切断端から除去され、5'リン酸基と 3'水酸基を保持した「きれいな」傷に変換する反応が必須である。

本研究は、エトポシドによって引き起こされる「汚い」傷除去の分子メカニズムを解析した。その結果、「汚い」傷を「きれいな」傷に変換する反応において、UBC13 依存的ユビキチン化経路が重要な機能を担っていることを発見した。分子メカニズムとして、切断端にできたユビキチン鎖を BRCA1/RAP80 複合体が認識し、この複合体が MRE11ヌクレアーゼを切断端にリクルートすることを明らかにした。また、放射線 (「汚い」傷) と制限酵素 (「きれいな」傷) による DSB 修復速度を比較し、放射線によって発生する「汚い」傷修復に UBC13 依存的ユビキチン経路が関与していることも明らかにした。

以上の研究は、放射線治療と化学療法の治療効果を高める技術開発に向けた基礎的知見を提供するものと期待される。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 2 年 7 月 2 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降