

京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書

平成23年12月 5日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 辻 井 昭 雄 様

所属部局・研究科 医学研究科 放射線遺伝学

職 名・学 年 博士課程2年

氏 名 津 田 雅 貴

助 成 の 種 類	平成23年度 ・ 若手研究者在外研究支援 ・ 在外研究中期助成		
研 究 課 題 名	日仏共同研究によるDNA修復因子、PDIP38の機能解析		
受 入 機 関	CNRS研究所 (フランス)		
渡 航 期 間	平成23年 9月 1日 ～ 平成23年11月30日		
成 果 の 概 要	タイトルは「成果の概要／報告者名」として、A4版2000字程度・和文で作成し、添付して下さい。「成果の概要」以外に添付する資料 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有()		
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	750,000円	
	使用した助成金額	750,000円	
	返納すべき助成金額	0円	
	助成金の使途内訳	交通費(航空運賃含む):220,000円	
		宿泊・日当:530,000円	

成果の概要／津田雅貴

日仏共同研究による DNA 修復因子、PDIP38 の機能解析

平成 23 年 9 月から三ヶ月間、貴財団の援助を受け、フランスのマルセイユにある CNRS 研究所で DNA 修復因子、PDIP38 の機能解析を行った。最初に PDIP38 の機能を調べるにあたり、今回の研究の背景として、TLS について説明する。

DNA 複製は複雑で脆弱なシステムであり、それは頻繁に DNA 損傷によって止まってしまう。このような複製ブロックは損傷乗り越え修復経路(TLS)や相同性組換え修復(HR)によって解除される。TLS は Pol η や Pol ζ を含む多くの TLS ポリメラーゼによって行われえる。Pol η は複製ブロック発生した箇所で数塩基、挿入する。その後、再び DNA 合成を開始する為に Pol ζ によって合成が開始する。一方、HR は鋳型鎖として傷ついていない姉妹染色分体を用いて複製ブロックを解除する。

今回の研究ではニワトリ B リンパ球の DT40 細胞株を用いて解析を行っている。この細胞株は、複製ブロック解除を含む DNA 修復の分子メカニズムを解析する上で非常に有用である。その理由は以下の通りある。ターゲティングインテグレーションを用いた遺伝子操作が非常に簡単で、遺伝子欠損株の作製が簡単である。また、DT40 細胞では培養するだけで IgV 遺伝子座が多様に変化するという特徴がある。この多様性は G/C 塩基における変異(Ig hypermutation)を起こすか、あるいは、遺伝子変換(Gene Conversion)によって引き起こされ、両方のプロセスには AID という酵素を介して行われる。Ig hypermutation は TLS に依存しており、一方、Gene Conversion は鋳型鎖として偽 V 遺伝子を用いて HR に依存している。

TLS はいくつかのメカニズムによって制御されている。第一に、Rev1、Pol η 、Pol κ 、Pol ζ のような TLS ポリメラーゼと相互作用する事で TLS を促進している。さらに、PCNA は複製ポリメラーゼと TLS ポリメラーゼのスイッチを促す分子としては非常に重要である。染色体上の DNA ポリメラーゼである Pol δ の機能は PCNA と相互作用する事で制御されている。複製ブロックに反応して、PCNA は Rad6 と Rad18 によってモノユビキチン化される。このモノユビキチン化した PCNA と TLS ポリメラーゼのユビキチン結合ドメインとの間で親和性が上昇する。このメカニズムにより、TLS ポリメラーゼは複製ブロックにリクルートされる。

一方、PDIP38 は、Pol δ のサブユニットの一つである p50 と PCNA に相互作用する事が示された。さらに、PDIP38 は Pol η と Pol ζ にも結合する。また、PDIP38 をノックダウンしたヒト細胞株では、Pol η の foci が減少し、UV に対して感受性が増した。これらの知見から、PDIP38 が Pol η や Pol ζ を介して TLS を制御していると推測された。しかしながら、PDIP38 が TLS に関してこれらのポリメラーゼを制御しているかどうかは不明である。そこで、私は PDIP38 が Pol η 、Pol ζ と相互作用する事を発見した Dr. Robert Fuchs の研究室で DT40 細胞を用いて研究を行う事とした。

留学前に、野生型 DT40 細胞株に対して PDIP38 破壊コンストラクトをトランスフェクションし、*PDIP38*^{-/-}DT40 細胞株の作製をサザンブロットニングにより確認した。*PDIP38*^{-/-}細胞株は野生型とほぼ同じ速さで増殖し、薬物感受性は野生型 DT40 細胞株とほぼ同じであった。

次に、今回の留学の目的である PDIP38 が TLS を制御しているかを調べる為に、野生型 DT40 細胞株と *PDIP38*^{-/-}DT40 細胞株における、Ig hypermutation と Gene conversion を解析した。実験方法は、AID を 2 週間、過剰発現させ、各細胞株からゲノムを抽出し、IgV 領域を PCR で増幅させ、pBluescriptII プラスミドに挿入させ、シーケンス解析した。すると、*PDIP38*^{-/-}細胞株では有意に Ig hypermutation が減少している事が確認された。つまり、PDIP38 は効率的に TLS を行うのに重要である事が分かった。次に、PDIP38 は Polη と Polζ に結合し、TLS を制御しているかを調べる為に、*PDIP38*^{-/-}*POLH*^{-/-}*POZ*^{-/-}細胞株を作製した。すると、細胞増殖、薬物感受性ともに、*POLH*^{-/-}*POLZ*^{-/-}細胞株と同じであった。

今回の留学によって、PDIP38 が TLS を促進しているという事が明らかになった。今後、さらに、*PDIP38*^{-/-}*POLH*^{-/-}*POLZ*^{-/-}を用いて、PDIP38 が Polη や Polζ を介して TLS を促進しているかを解析する予定である。