

学位授与番号：甲 1051 号

氏 名：山本 武徳

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 29 年 12 月 13 日

学位論文名：

Interaction between RNF8 and DYRK2 is required for the recruitment of DNA repair molecules to DNA double-strand breaks.

（RNF8 と DYRK2 の相互作用は DNA 二本鎖切断部位への DNA 修復因子の集積を制御する）

学位論文審査委員長：教授 本間定

学位論文審査委員：教授 朝倉正 教授 武山浩

論文要旨

氏名	山本 武徳	指導教授名	吉田 清嗣
主論文 Interaction between RNF8 and DYRK2 is required for the recruitment of DNA repair molecules to DNA double-strand breaks. (RNF8 と DYRK2 の相互作用は DNA 二本鎖切断部位への DNA 修復因子の集積を制御する) Takenori Yamamoto, Naoe Taira Nihira, Satomi Yogosawa, Katsuhiko Aoki, Hiroyuki Takeda, Tatsuya Sawasaki and Kiyotsugu Yoshida FEBS letters. 2017 年 3 月 6 日 ; Volume 591 ページ 842~853			
要旨 多段階的な変異の蓄積によって癌が発症することが明らかにされており、p53 は癌の抑制において重要な役割を果たしている。DNA が修復できない程の重篤な損傷を受けた場合は、p53 の 46 番目のセリンがリン酸化されることで細胞死が誘導される。過去の研究により、細胞死を誘導する分子として DYRK2 が同定されている。浸潤性の乳癌腫瘍組織において、DYRK2 の発現レベルの減少が報告されているため、細胞内で分解または抑制されていることが示唆された。このことから、DYRK2 は細胞内でユビキチン化による翻訳後修飾を受けている可能性が考えられた。 そこで本研究において、無細胞タンパク合成系を用いたリング型 E3 ユビキチンリガーゼのスクリーニングを行った結果、DYRK2 と会合する分子として RNF8 が同定された。細胞内における RNF8 と DYRK2 の会合は免疫沈降実験により確認した。RNF8 が DYRK2 をユビキチン化し分解に導くことが予想されたが、RNA 干渉により RNF8 を消失させた条件において、DYRK2 の発現量の変化は認められなかった。この結果から、私は DYRK2 が RNF8 を制御している可能性について検討した。RNF8 は DNA 損傷のマーカである γ H2AX をユビキチン化する分子であり、DNA 修復への関与が明らかになっている。DYRK2 が RNF8 と協調して DNA 修復に寄与する可能性が考えられたため、分子機構の解明を目指した。 RNA 干渉により DYRK2 を消失し、抗癌剤を処理した結果、 γ H2AX のモノユビキチン化レベルの減弱と主要な DNA 損傷応答タンパクである 53BP1 のフォーサイ形成の抑制が認められた。また、X 線照射によって、DYRK2 は核で γ H2AX と共局在した。従って、DYRK2 が DNA 修復に寄与する可能性が示唆された。そこで、DYRK2 と RNF8 が協調して DNA 修復に寄与するかどうか確認するために、GFP 融合 DYRK2 と mCherry 融合 RNF8 を導入し、X 線照射をした結果、核での共局在が観察された。さらに、DYRK2 が DNA 修復に寄与するという直接的な証拠を得るために、DNA 修復効率の定量化に必要な DR-GFP レポーターを導入し、安定発現させた U2OS 細胞株を用いて解析を行った。RNA 干渉により DYRK2 を消失させた結果、DNA 修復効率の減少が認められた。以上の結果から、DNA 損傷に応じて、DYRK2 と RNF8 が会合することにより、DYRK2 は DNA 修復に寄与することが明らかになった。			

学位論文審査結果の要旨

平成 29 年 11 月 17 日、山本武徳氏の学位論文審査は審査委員長 本間 定 (悪性腫瘍治療研究部教授)、委員 朝倉 正 (アイソトープ実験研究施設教授)、武山 浩 (乳腺・内分泌外科教授)のもとに行われた。席上、審査担当者より以下の質問がなされた。

1. DYRK2 の活性は本来備わったものか、または、他の分子から制御をうけるのか？
2. DYRK2 が核内移行をするのは特別なシグナルがあるのか？
3. DYRK2 による DNA 修復は RNF8 の多寡により影響されるか？
4. DYRK2 と RNF8 の両方がないと DNA 修復ができない理由は何か？
5. RNF8 は機能的にはなぜ DYRK2 に結合する必要があるのか？
6. 蛍光顕微鏡では DYRK2 と RNF8 の会合は核内ではなく細胞質で起きているようにみえるが、どうか？
7. DNA 修復において、論文では DYRK2 のみ siRNA 処理された結果が提示されているが、RNF8 と DYRK2 の両方を siRNA で knockdown した結果はどうか？
8. 本研究により DYRK2 の DNA 修復という新たな機能が発見されたが、従来より報告されている細胞死を誘導するという DYRK2 の機能とどのような整合性があるのか？
9. RNF8 と DYRK2 の相互作用は腫瘍細胞の EMT の誘導に関与はないのか？
10. その他

上記の質問に対して申請者の山本氏は自身の研究成果、過去の論文報告の知見などをもとに適切に回答した。本研究により従来細胞死を誘導する機能が報告されていた DYRK2 が DNA 修復機能も有していたこと、この機能を発現するために DYRK2 と RNF8 の相互作用が必要であるということが新たな知見として示されました。この発見は今後の悪性腫瘍治療法の開発に重要な新知見を与えたと考えられます。朝倉、武山両教授と審査の結果、本論文は医学博士の学位授与に適するものと判断しました。審査後の thesis、論文要旨の修正は要しませんでした。