

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
中村君代	主査 教授 田 窪 孝 行 副査 教授 林 秀 行 副査 教授 花 房 俊 昭 副査 教授 石 坂 信 和
<p>主論文題名</p> <p>Involvement of SLX4 in interstrand cross-link repair is regulated by the Fanconi anemia pathway</p> <p>(鎖間共有結合の修復における SLX4 の働きは、ファンconi貧血経路によって制御される)</p>	
学位論文内容の要旨	
<p>《背景と目的》</p> <p>鎖間共有結合 (Interstrand cross-link, ICL) は、転写と複製をブロックし、細胞毒性の強い DNA 損傷である。ファンconi貧血 (Fanconi anemia, FA) は、小児遺伝性疾患で、進行性骨髄不全、高発癌性が特徴的である。FA の原因として、ICL 修復の異常が知られており、近年、多数の原因遺伝子群による FA 経路が同定されてきた。</p> <p>複製ブロックにより活性化した 8 種の FA コア複合体は、FANCD2-FANCI をユビキチン化し、FANCD2-FANCI-UB 複合体は DNA 損傷部位に集積し FAN1 を誘導する。ICL 処理には、SLX1-SLX4 と結合する MUS81-EME1 と XPF-ERCC1 といった、相同組換中間産物を解消するヌクレアーゼも関わるということが既知だが、これらの因子がどのように DNA 損傷部位にリクルートされるか不明であった。今回申請者らは、SLX4 がヌクレアーゼの足場として働き、ICL による傷の修復現場に誘導するという仮説を提唱し、ジーンターゲットング効率が高いニワトリ DT40 細</p>	

胞にて SLX4 や FA 経路主要因子 FANCC の遺伝子破壊を行った。

また、FA 経路の伝達ではユビキチン化が重要な役割を持つ為、SLX4 内ユビキチン結合 (Ubiquitin-binding zinc finger, UBZ) ドメインにも着目し、仮説を検証した。

《方 法》

標的組換え技術を用いた遺伝子破壊、tet off システムを用いた条件的破壊、transgene を用いた遺伝子高発現により、①SLX4 条件的破壊細胞 (*SLX4^{cko}*)、②wt-SLX4 発現細胞 (*SLX4-wt*)、③UBZ ドメインを欠く SLX4 発現細胞 (*SLX4-UBZΔ*)、④SLX4^{cko} と FANCC の二重破壊細胞 (*SLX4^{cko}/FANCC^{-/-}*)、⑤SLX4-UBZ と FANCC の二重破壊細胞 (*SLX4UBZΔ/FANCC^{-/-}*)、を作製し、以下のアッセイを行った。

1. *SLX4^{cko}* 細胞もしくは *SLX4^{cko} tet off* 細胞にて、成長曲線と細胞周期分析を行った。
2. *SLX4^{cko}* 細胞もしくは *SLX4^{cko} tet off* 48 時間後の *SLX4* 欠損細胞にて、 γ 線照射後 3 時間後の条件で染色体分析を行った。この方法では、 γ 線照射時点で G2 期（姉妹染色体が存在し、DNA 二重鎖切断は相同組換えにより修復される）の細胞の評価が可能である。
3. *SLX4-wt* 細胞もしくは *SLX4-UBZΔ* 細胞にて、ICL 誘起薬剤を含む薬剤への感受性を調べた。
4. SLX4-wtGFP、もしくは SLX4-UBZΔGFP 融合タンパク質を発現する野生型細胞を用い、免疫染色法にて、ICL へ集積する SLX4 と FANCD2 との関係を調べた。次に ICL 誘起薬剤処理後の、同じく上記 2 種類の細胞を用い、抗 GFP 抗体にて免疫沈降を行い SLX4 と FANCD2 の結合を調べた。
5. *SLX4-UBZΔ/FANCC^{-/-}* 細胞にて薬剤感受性と染色体断裂数変化を見ることで、SLX4 の役割が FA 経路に依存的かを調べた。

《結 果》

1. *SLX4*破壊により細胞は致死で、細胞周期では G2 期に集積した。
2. γ 線照射後 3 時間後の *SLX4*破壊細胞では、染色分体断裂ではなく染色体断裂に関しても増加を認めた。
3. *SLX4-UBZ Δ* 細胞は、全 ICL 誘起薬剤に高感受性であったが、その他の薬剤には感受性を示さなかった。
4. ICL に対して、*SLX4* は *FANCD2* の集積と共局在したが、*FANCC* 欠損や *FANCD2* のユビキチン化サイトの変異、また *SLX4-UBZ* のない背景で局在は認めなかった。このことより、ユビキチン化した *FANCD2* と、*UBZ* ドメインの存在に依存して、*SLX4* は ICL の損傷に集積することを示した。また免疫沈降により、*SLX4* とユビキチン化した *FANCD2* は複合体を作り、これも *UBZ* ドメイン依存を示した。
5. *SLX4-UBZ Δ /FANCC⁻* 細胞では、*SLX4^{cko}/FANCC⁻* と *SLX4-UBZ Δ* 細胞に比し、より ICL 誘起薬剤に高感受性であった。このことにより、ICL 修復に関して、FA 経路は *SLX4* とは独立した経路を支配する可能性があり、また、*SLX4* も FA 経路以外の経路により支配を受けている可能性がある。

《考 察》

今回申請者らは、*SLX4* が組換え中間体を解消することにより、相同組換え修復に必要であることを示した。また ICL 修復に関し、*SLX4-UBZ* ドメインが存在することで ICL 修復を行うことが出来ること、そして、*SLX4-UBZ* ドメインを介し *FANCD2-UB* と複合体を形成し、DNA の損傷に集積することを示した。最近の報告で、FA 患者から *SLX4-UBZ* ドメインに変異が同定されたことも、*SLX4* は *FANCD2* の下流で ICL 修復に関わることを裏付ける。以上より、ICL 修復に対し、FA 経路による制御の元、*SLX4* が誘導する *MUS81-EME1* と *XPF-ERCC1*、そして *FAN1* が共に働いていると考えられる。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	中 村 君 代
論文審査担当者		主 査 教 授 田 窪 孝 行	
		副 査 教 授 林 秀 行	
		副 査 教 授 花 房 俊 昭	
		副 査 教 授 石 坂 信 和	
主論文題名			
Involvement of SLX4 in interstrand cross-link repair is regulated by the Fanconi anemia pathway (鎖間共有結合の修復における SLX4 の働きは、ファンconi貧血経路によって制御される)			
論文審査結果の要旨			
<p>放射線治療や鎖間共有結合 (Interstrand cross-link, ICL) をはじめとした抗癌剤の多くは、DNA を傷つけて、特に分裂能の高い細胞 (癌細胞) を細胞死に導く事で、癌細胞を殺す。ファンconi貧血 (Fanconi anemia, FA) の患者細胞は、抗癌架橋剤に対して特に感受性の強いことから、ICL によって誘導された DNA 損傷の修復に関わるメカニズムに異常があると考えられている。FA の原因遺伝子群は近年になって多数発見され、ICL 損傷を受けた DNA 修復に必須の FA 経路が同定された。しかし、どのようにして損傷を受けた DNA の除去を行っているのか、など解明されない点が多く残っていた。</p> <p>今回、申請者らは、DNA 損傷の除去を行う酵素群のまとめ役として機能する、SLX4 について解析を行った。SLX4 をその UBZ を変異させた時、ICL に対して細胞が感受性となる事から、SLX4 は ICL による DNA 損傷の修復に関わる事を見いだし、さらに、SLX4 が UBZ を通じて DNA 損傷箇所に集積される事を明らかに</p>			

した。また、FA 経路の変異した細胞では、SLX4 の DNA 損傷部位へ集積が見られないことから、FA 経路によって SLX4 が集積され、SLX4 が取りまとめている様々な DNA 切断酵素によって、DNA 損傷部位修復を実行するメカニズムを発見した。今回の発見で、FA 経路が、SLX4 を DNA の傷口に呼び込んで、壊れた DNA の修復作業を開始することが解明された。

SLX4 は ICL による DNA 損傷を修復する事で、抗癌架橋剤の癌細胞への効果を低下させていると考えられる。この酵素活性を阻害する薬品と架橋剤の併用をする事で、治療効果をあげることが期待できる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States
of America 108(16): 6492-6496, 2011