

論文 / 著書情報
 Article / Book Information

題目(和文)	
Title(English)	Molecular Mechanism of the Recruitment of XRCC4 and DNA Ligase IV to DNA Double-Strand Breaks
著者(和文)	劉嗣誠
Author(English)	Sicheng Liu
出典(和文)	学位:博士(学術), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9367号, 授与年月日:2013年12月31日, 学位の種別:課程博士, 審査員:松本 義久,尾上 順,小栗 慶之,林崎 規託,塚原 剛彦,足立 典隆
Citation(English)	Degree:Doctor (Academic), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9367号, Conferred date:2013/12/31, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第	号	学位申請者氏名	劉 嗣誠	
		氏名	職名	氏名	職名
論文審査	主査	松本 義久	准教授	塚原 剛彦	准教授
		尾上 順	准教授		
審査員	審査員	小栗 慶之	教授	足立 典隆	教授
		林崎 規託	准教授		

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は、「Molecular Mechanisms of the Recruitment of XRCC4 and DNA Ligase IV to DNA Double-Strand Breaks (XRCC4 と DNA リガーゼ IV の DNA 二重鎖切断部位への動員の分子機構)」と題し、全 6 章から構成されている。

第 1 章「Introduction」では、まず、DNA 損傷およびその修復の分子機構の現状と問題点をまとめている。真核細胞において、DNA 二重鎖切断は主として非相同末端結合(non-homologous end joining、以下 NHEJ)と相同組換えの二つの機構によって修復される。NHEJ においては、DNA-PKcs、Ku86、Ku70、XRCC4、DNA ligase IV(以下 Ligase IV)、XLF が中心的な役割を担うことが明らかになっている。しかし、これらのタンパク質がどのようにして DNA 損傷部位で修復反応を行う複合体を形成するかについては未解明の部分が多く残されている。以上の現状を踏まえて、本研究の目的が Ligase IV と XRCC4 が DNA 二重鎖切断部位に動員される分子機構の解明であると述べている。

第 2 章「Experimental Procedures」では、本研究で用いた細胞、遺伝子、放射線源、実験手法について述べている。その中で、Ligase IV および XRCC4 分子のクロマチンへの結合の解析については、Kamdar と松本によって報告された方法に従い、界面活性剤 Nonidet P-40 の濃度を段階的に上げながら抽出して細胞分画を行い、各分画に含まれる Ligase IV および XRCC4 分子をウェスタン・ブロッティング法で検出したと述べている。

第 3 章「Role of Ligase IV in the Chromatin Binding of XRCC4」では、①ヒト B 前駆細胞白血病 Nalm-6 細胞由来の Ligase IV 欠損細胞では、Ligase IV のみならず、XRCC4 のクロマチンへの結合も失われること、②ヒト全長 Ligase IV cDNA を発現ベクターに挿入し、Ligase IV 欠損細胞に導入すると、Ligase IV とともに XRCC4 のクロマチンへの結合が回復すること、をそれぞれ示し、XRCC4 のクロマチンへの結合に Ligase IV が必要不可欠であることを明らかにしている。

第 4 章「Role of C-terminal Region of Ligase IV in Chromatin Binding」では、Ligase IV の中でクロマチンへの結合に必要な領域を明らかにするために、PCR を用いた部位特異的変異導入法により、①N 末端部分の触媒領域に存在する 278 番目のアルギニンをヒスチジンに置換したもの、②C 末端部分の BRCT I 領域に存在する 725 番目のトリプトファンをアルギニンに置換したもの(以下 W725R)、③C 末端部分の BRCT II 領域に存在する 893 番目のトリプトファンをアルギニンに置換したもの(以下 W893R)の 3 種類の点変異体を作製し、Ligase IV 欠損細胞に導入したところ、W725R と W893R において Ligase IV および XRCC4 のクロマチンへの結合の減少が認められることを示している。また、W725R あるいは W893R を発現する細胞が正常 Ligase IV を発現する細胞に比べて放射線感受性が高いこと、すなわち、これらのアミノ酸残基が DNA 修復に重要であることを示している。さらに、Ligase IV の C 末端部分断片(以下 LigIV-CT)の cDNA を Ligase IV 欠損細胞に導入すると、この部分断片とともに XRCC4 のクロマチンへの結合が回復することを示し、Ligase IV の C 末端部分が Ligase IV 自身および XRCC4 の結合に重要であることを明らかにしている。

第 5 章「Effects of Ligase IV C-terminal Fragment on Radiosensitivity and Radiation Response of HeLa-Fucci Cell」では、第 4 章の結果を踏まえ、LigIV-CT を発現させた場合に、放射線感受性や細胞周期の進行にどのような影響が現れるかを調べている。材料としては、Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator)を導入したヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞を用い、LigIV-CT を安定発現する細胞株を樹立している。まず、コロニー形成法により、LigIV-CT 発現細胞では放射線感受性が上昇することを示している。次に、蛍光顕微鏡を用いた経時的観察により、LigIV-CT 発現細胞は、G2 期チェックポイントを経て G1 期に入るまでは正常 HeLa-Fucci 細胞と同様であるものの、その後異常が現れることを示している。以上の結果から、LigIV-CT 発現細胞では、Ligase IV の機能が阻害され、DNA 二重鎖切断修復が不完全のまま G2 期チェックポイントを脱け出して G1 期に進入していることを放射線感受性上昇の理由として提示している。

第 6 章「Conclusions and Perspectives」では、以上の研究で明らかになったことを総括するとともに、今後の展望を述べている。

これを要するに、本論文は、分子生物学・生化学的手法を用いて、Ligase IV と XRCC4 の DNA 二重鎖切断部位への動員において Ligase IV の C 末端領域、その中でも 2 つの BRCT 領域が重要であることを明らかにし、放射線の生物・人体影響の鍵を握る DNA 二重鎖切断の修復の分子機構に新たな知見を与えるものであり、学術上貢献するところが大きい。よって、本論文は博士(学術)の学位論文として十分価値あるものと認められる。