

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	DNA二重鎖切断修復に関わるXRCC4/DNA ligase IV複合体の制御機構に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	福地命
Author(English)	Mikoto Fukuchi
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9922号, 授与年月日:2015年5月31日, 学位の種別:課程博士, 審査員:松本 義久,小栗 慶之,河野 俊之,松藤 成弘,岩崎 博史
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9922号, Conferred date:2015/5/31, 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

(2000字程度)

報告番号	乙 第 号	学位申請者	福地 命	
	氏 名	職 名	氏 名	職 名
論文審査員	主査 松本 義久	准教授	岩崎 博史	教授
	小栗 慶之	教授		
	河野 俊之	教授		
	松藤 成弘	教授		

本論文は「DNA二重鎖切断修復に関わるXRCC4/DNA ligase IV複合体の制御機構に関する研究」と題し、全6章から構成されている。

第1章「序論」では、放射線によって生じる種々のDNA損傷の中で、放射線生物作用に最も密接に関わると考えられるDNA二重鎖切断(以下、DSB)の修復機構について、現在までに明らかになっていることをまとめている。真核細胞においてDSBは主として、相同組換えと非同末端結合(以下、NHEJ)の2つの機構で修復されるが、XRCC4/DNA ligase IV複合体はNHEJの最終段階においてDNA末端同士の結合を司ると考えられている。XRCC4はDNA-PKをはじめとした種々のタンパク質リン酸化酵素による制御を受けることが知られ、多くの研究が行われている。一方、近年、DSB修復の制御においてSUMO化酵素やユビキチン化酵素が重要な役割を担うことが明らかにされ、XRCC4についてもSUMO化、ユビキチン化修飾を受けるといった報告があるが、機能はほとんど明らかになっていない。これらを踏まえ、本研究の目的は、ユビキチン化、SUMO化、アセチル化など種々の翻訳後修飾を受け得る可能性や、タンパク質間相互作用において重要な役割を担う可能性があるリジンに着目し、XRCC4/DNA ligase IVの制御機構を明らかにすることであると述べている。

第2章「XRCC4 リジン-アルギニン変異体の系統的作製と機能解析」では、まず、ヒトとニワトリのXRCC4のアミノ酸配列を比較し、両者の間で保存されている16個のリジン残基を抽出している。この中で、霊長類において他のアミノ酸に置き換わっているものを除外し、また、SUMO化を受け得ることが報告されている210番目のリジン(K210)を追加し、計16個のリジンをアルギニンに置換した変異体cDNAを作製している。次に、これらの変異体XRCC4 cDNAをXRCC4欠損細胞M10に導入して安定発現株を樹立し、4 Gyの γ 線照射後の生存率を指標としてDSB修復における機能を解析している。その結果、187番目および271番目のリジンをアルギニンに置換した変異体(以下、それぞれK187R、K271R)では生存率が著しく低下すること、すなわち、これらのリジン残基がDSB修復において重要であることを明らかにしている。

第3章「XRCC4 K271RおよびK210R変異体の解析」では、K271R変異体のDSB修復機能低下の原因を探るため、まず、蛍光顕微鏡観察による細胞内局在の解析を行い、正常XRCC4が核に局在するのに対し、K271Rは核への局在が失われることを示している。さらに、正常XRCC4を発現する細胞ではDNA ligase IVが核内に局在するのに対し、K271RではDNA ligase IVの核への局在が失われることを見出している。以上の結果から、K271RがXRCC4とDNA ligase IVの核局在に必要であることを明らかにしている。また、SUMO化部位として報告されているK210の変異体は、XRCC4自身、DNA ligase IVとともに核に局在することを示している。さらに、放射線感受性、 γ -H2AXフォーカス数を指標として、K271RはDSB修復機能が低下していること、K210Rはほぼ正常なDSB修復機能を有していることを明らかにしている。

第4章「XRCC4 K187R変異体の解析」では、K187R変異体のDSB修復機能低下の原因を探るため、まず、免疫沈降法によりDNA ligase IVとの結合を調べ、K187R変異体はDNA ligase IVとの結合が失われていることを示している。次に、 γ -H2AX免疫染色、 comet電気泳動法により、K187R変異体はDSB修復機能が低下していることを示している。さらに、K187R変異体は核に局在し、レーザーマイクロビームで生じたDNA損傷にリクルートされるが、DNA ligase IVの核への局在がほとんど起こらないことを見出している。以上の結果から、XRCC4は単独で核に局在し、DNA損傷部位にリクルートされること、また、DNA ligase IVの核局在にXRCC4との相互作用が必要であることを明らかにしている。

第5章「XRCC4とDNA ligase IVの相互作用の構造モデル解析」では、Protein Data Bankに登録されている三次元構造座標データを元に、ソフトウェアPyMOLを用いた解析を行い、K187がDNA ligase IVの酸性アミノ酸との相互作用に重要であること、K187をアルギニンに変えるとDNA ligase IVとの相互作用における立体障害が起こること、XRCC4四量体形成に有利に働くことを明らかにしている。

第6章「結論」では、以上の研究で明らかになったことをまとめて、結論を述べている。

これを要するに、本論文は、DNA二重鎖切断修復の最終段階においてDNA末端同士の結合を司るXRCC4/DNA ligase IV複合体の形成および核局在の制御機構に新規で重要な知見を与えるものであり、理學上貢献するところが大きい。よって、本論文は博士(理学)の学位論文として十分価値あるものと認められる。