

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	
Title(English)	Biological Consequences of Ionizing Radiation Exposure and the Role of XRCC4 Protein Phosphorylation in DNA Double-strand Break Repair through Non-homologous End Joining
著者(和文)	AMIRIMoghaniAli
Author(English)	Ali Reza Amiri Moghani
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10967号, 授与年月日:2018年9月20日, 学位の種別:課程博士, 審査員:松本 義久,大貫 敏彦,千葉 敏,塚原 剛彦,岩崎 博史
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10967号, Conferred date:2018/9/20, 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	Ali Reza Amiri Moghani		
論文審査		氏名	職名		氏名	職名
審査員	主査	松本 義久	准教授	審査員	岩崎 博史	教授
	審査員	大貫 敏彦	教授			
		千葉 敏	教授			
		塚原 剛彦	准教授			

## 論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は、「Biological Consequence of Ionizing Radiation Exposure and the Role of XRCC4 Protein Phosphorylation in DNA Double-strand Break Repair through Non-homologous End Joining (電離放射線被ばくの生物影響と非相同末端結合による DNA 二本鎖切断修復における XRCC4 タンパク質のリン酸化の役割に関する研究)」と題し、全 6 章から構成されている。

第 1 章「Introduction」では、放射線による種々の DNA 損傷の中で最も重篤と考えられる DNA 二本鎖切断 (以下、DSB) 修復機構の研究についての現状を述べ、真核生物の DSB 修復機構の一つである非相同末端結合 (以下、NHEJ) における DNA 依存性プロテインキナーゼ (以下、DNA-PK) のリン酸化の重要性を指摘している。さらに、XRCC4 タンパク質が DNA-PK のリン酸化標的として重要であると考えられることを述べ、XRCC4 タンパク質のアミノ末端から 260 番目に位置するアミノ酸であるセリン (以下、セリン 260) に注目し、細胞内でのリン酸化状態とその DNA 損傷応答性、および DSB 修復におけるリン酸化の意義を明らかにすることを目的とすると述べている。

第 2 章「Experimental procedures」では、本論文を通して用いる実験材料や手法について述べている。まず、ヒト、マウスの細胞の培養条件 (培地および添加物、温度など)、継代の方法、凍結保存の方法などについて述べている。次に、放射線照射 (コバルト 60 線源を用いた  $\gamma$  線照射) および試料の調製方法について述べている。続いて、タンパク質の存在量や状態の分析のための電気泳動法およびウェスタン・ブロッティング法について述べている。

第 3 章「Generation of phosphorylation-specific antibody for XRCC4 Ser260」では、XRCC4 タンパク質のセリン 260 のリン酸化状態に特異的に反応するウサギポリクローナル抗体の作製について述べている。作製した抗体の反応性と特異性は、合成ペプチドを用いた酵素結合免疫吸着 (Enzyme-linked immunosorbent assay) 法と、ヒト培養細胞から精製した DNA-PK と組換え XRCC4 タンパク質を用いた試験管内リン酸化反応とウェスタン・ブロッティング法により確認している。

第 4 章「Evaluation of *in cellulo* phosphorylation status of XRCC4 Ser260 and its role in radiation sensitivity」では、第 3 章で作製した抗体を用いたウェスタン・ブロッティング法により、ヒト培養細胞で  $\gamma$  線 30-300Gy 照射後 30 分-1 時間で、XRCC4 タンパク質のセリン 260 のリン酸化が増加することを見出している。また、このリン酸化の増加が DNA-PK の特異的阻害剤である NU7441 で抑制されること、DNA-PK 触媒サブユニット (以下、DNA-PKcs) 遺伝子を欠損する細胞では見られないことから、放射線照射後に見られる XRCC4 タンパク質のセリン 260 のリン酸化は DNA-PK によって行われることを明らかにしている。さらに、DSB 修復におけるリン酸化の意義を明らかにするために、セリン 260 をリン酸化されないアラニンに置換した XRCC4 遺伝子 (以下、S260A 変異体) を作製し、これを内在性の XRCC4 遺伝子を欠損する細胞に導入した細胞株を作製し、この細胞株が、正常 XRCC4 を導入した細胞株に比べ、わずかではあるが有意に高い感受性を示すことを示している。さらに、S260A 変異体を導入した細胞株では正常 XRCC4 を導入した細胞に比べ、 $\gamma$  線 1-2Gy 照射後 4 時間において残存する DSB が多いことを示している。これらのことから、S260A 変異体を発現する細胞は正常 XRCC4 を発現する細胞に比べて DSB 修復能力が低いこと、すなわち、セリン 260 が DSB 修復において重要な役割を担うことを明らかにしている。

第 5 章「Analyses of phosphorylation of XRCC4 Ser320」では、セリン 260 とともに XRCC4 タンパク質における DNA-PK による主要なリン酸化部位であるセリン 320 について、リン酸化状態に特異的に反応するマウスモノクローナル抗体を作製している。また、作製した抗体を用いたウェスタン・ブロッティング法により、ヒト培養細胞に対して放射線照射を行った後の XRCC4 タンパク質のセリン 320 のリン酸化の検出に成功している。これまでに研究室で作製されていたウサギポリクローナル抗体に加えて、このマウスモノクローナル抗体により、均一な品質の抗体を無限に作製することが可能になると述べている。

第 6 章「Conclusion」では、以上の成果を総括し、本論文の結論を述べている。

これを要するに、本論文では XRCC4 タンパク質のセリン 260 のリン酸化状態特異的に反応する抗体を初めて作製し、この部位が放射線照射後に DNA-PK によるリン酸化を受けること、また、このリン酸化が DSB 修復において重要であることを示していることから、本論文は工学上および工業上貢献するところが大きい。よって、本論文は博士 (工学) の学術論文として十分価値あるものと認められる。

注意:「論文審査の要旨及び審査員」は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。