

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	APTX複合体のDNA損傷修復における役割
Title(English)	
著者(和文)	今村力也
Author(English)	Rikiya Imamura
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12676号, 授与年月日:2024年3月26日, 学位の種類:課程博士, 審査員:松本 義久,塚原 剛彦,片淵 竜也,鷹尾 康一郎,木村 宏
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12676号, Conferred date:2024/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	融合理工学 原子核工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： 博士 Academic Degree Requested Doctor of	(理学)
学生氏名： Student's Name	今村力也		審査員主査： Chief Examiner	松本義久

要旨 (和文 2000 字程度)

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

本論文は“APT_X 複合体の DNA 損傷修復における役割”と題し、全 5 章から構成されている。第 1 章の“序論”では、DNA 損傷修復の必要性およびその修復機構を理解することの重要性を述べている。中でも、Aprataxin (APT_X) は核酸末端のアデニル化を解消する活性を持つ酵素であり、足場タンパク質である XRCC1 および XRCC4 と結合し複合体を形成することから塩基除去修復・DNA 一本鎖切断修復・DNA 二本鎖切断修復に関与することが示唆されているが、APT_X 変異患者由来細胞を用いた実験では DNA 損傷誘導剤に軽微な感受性しか示さず、細胞内での APT_X 複合体の役割が不明であることを指摘している。そこで本研究では、ゲノム編集やライブセルイメージングといった技術を導入し、細胞内での APT_X 複合体の役割を解明することを目的としたことを示した。

第 2 章の“実験材料と方法”では、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いた APT_X 欠損細胞、XRCC1 欠損細胞の樹立、緑色蛍光タンパク質 (GFP) をタグ付けした APT_X 融合遺伝子 (GFP-APT_X) など本研究で用いたゲノム編集技術、遺伝子工学やライブセルイメージング法について説明し、それらを応用した細胞内における APT_X 複合体の解析手法を示した。

第 3 章の“DNA 二本鎖切断修復における APT_X 複合体の役割”では、ゲノム編集により樹立した APT_X 欠損細胞が DNA 二本鎖切断を誘発する放射線 (γ 線)、I 型 Topoisomerase 阻害剤 Camptothecin (CPT) に感受性を持つことを示した。さらに、DNA 一本鎖切断修復能および DNA 二本鎖切断修復能を DNA 一本鎖切断マーカー ADP-ribose と DNA 二本鎖切断マーカー γ H2AX をそれぞれプローブとして用いて解析すると、APT_X 欠損細胞では対照細胞と比較して過酸化水素処理により ADP-ribose 強度の上昇、 γ 線照射または CPT 処理により多くの γ H2AX フォーカスが残存することを確認し、APT_X が DNA 一本鎖切断修復と DNA 二本鎖切断修復の両方に必要であることを示した。次に、細胞に GFP-APT_X を導入し、ランダムインテグレーションを用いて GFP-APT_X 安定発現細胞を作製し、RNA 干渉法により内在性 XRCC1 または XRCC4 の発現を抑制後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて Laser micro-irradiation およびライブセルイメージング法により GFP-APT_X の DNA 損傷部位への集積を解析した。XRCC1 抑制下では GFP-APT_X の集積が抑制されたが、XRCC4 抑制下では集積が抑制されないことを示した。加えて、APT_X と XRCC4 の γ 線照射による DNA 二本鎖切断修復能を解析すると、APT_X/XRCC4 抑制細胞は XRCC4 抑制細胞より残存する γ H2AX フォーカス数が相加的に増加することが確認し、GFP レポーターにより DNA 二本鎖切断修復の割合をフローサイトメトリー法で確認すると、APT_X/XRCC4 抑制細胞は APT_X 抑制細胞および XRCC4 抑制細胞と比較して修復の割合が相加的に減少することを示した。これらのことから、APT_X は XRCC4 とは別の機構により DNA 二本鎖切断修復に関与することを明らかにした。

第 4 章の“PARP1/2 阻害剤による DNA 損傷の修復における APT_X 複合体の役割”では、ゲノム編集により樹立した APT_X 欠損細胞、XRCC1 欠損細胞が PARP1/2 阻害剤 (PARPi) に対して感受性を持ち、XRCC1 依存的であることを示した。加えて、XRCC1 欠損細胞の PARPi 処理後の DNA 損傷応答を解析すると、DNA 一本鎖切断量が野生型より増加していることを示した。また、XRCC1 欠損細胞は S 期に高い ADP-ribose 強度を示し、これは DNA 複製阻害剤により抑制されることを確認した。さらに、CDK 阻害剤を PARPi と共に処理すると XRCC1 欠損細胞が呈する DNA 一本鎖切断量が減少することを示した。よって、APT_X-XRCC1 複合体は DNA 複製に起因した DNA 一本鎖切断修復に関与することで、PARP1/2 阻害剤の感受性に寄与していることを明らかにした。

第 5 章の“結論”では、本研究で得られた成果をまとめ、結論と今後の展望や課題を述べた。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、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。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)
Doctoral Program

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of Graduate major in	融合理工学 原子核工学	系 コース	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	（理学）
学生氏名： Student's Name	今村力也		審査員主査： Chief Examiner	松本義久	

要旨（英文 300 語程度）

Thesis Summary (approx.300 English Words)

This dissertation entitled "The Role of the APTX Complex in DNA Damage Repair" consists of five chapters.

Chapter 1 describes the need for DNA damage repair and the importance of understanding the repair mechanism. Among these, aprataxin (APTX) is an enzyme that resolves an adenylation of nucleotide ends and forms a complex with the scaffold proteins XRCC1 and XRCC4, suggesting that it is involved in base excision repair, DNA single-strand break repair and DNA double-strand break repair. However, studies using cells derived from patients with APTX mutations showed mild sensitivity to DNA damage inducers, indicating that the role of the APTX complex in cell is unknown. Therefore, in this study, we used technologies such as genome editing and live cell imaging to reveal the role of the APTX complex in cells.

Chapter 2 describes material and methods in this study.

Chapter 3 indicates APTX is involved in DNA single-strand break repair and DNA double-strand break repair in cell and the recruitment of APTX to DNA damage sites is not in a XRCC4-dependent manner but XRCC1. In addition, epistatic relationship with APTX and XRCC4 showed APTX and XRCC4 work in parallel in DSBR rather than the alternative possibility that they work in the same pathway.

Chapter 4 clarified *APTX*-deficient cells and *XRCC1*-deficient cells had the sensitivity to PARP1/2 inhibitor (PARPi) and *XRCC1*-deficient cells accumulated endogenous DNA single-strand breaks in DNA replication, suggesting that replication-associated DNA single-strand breaks is a source to PARPi sensitivity in *APTX*-deficient cells and *XRCC1*-deficient cells.

Chapter 5 presents conclusion and discussion of this dissertation, including the summary, prospective and spreading effects of this study.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、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。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).