

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)	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	今村 力也	
論文審査 審査員		氏名		職名	氏名	職名
	主査	松本 義久		教授	木村 宏	教授
	審査員	塚原 剛彦		教授		
		片渕 竜也		准教授		
	鷹尾 康一郎		准教授			

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は、「APTX 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「序論」では、まず、DNA 損傷およびそれに対する応答や修復機構の重要性、これらの分子機構に関するこれまでの知見についてまとめている。その中で、Aprataxin (APTX) に注目している。APTX は DNA 末端に結合したアデニル基を除去する酵素活性を持ち、塩基除去修復、DNA 一本鎖切断修復、DNA 二本鎖切断修復に関わると考えられている酵素である。また、ヒトにおける APTX の変異が、神経変性およびアルブミン血症を呈する遺伝性疾患を引き起こすことが報告されており、神経をはじめとする生体機能における重要性が示唆されている。しかしながら、生体内での DNA 修復において、APTX、そして APTX と XRCC1 および XRCC4 との複合体がいかなる役割を担うかについては不明の部分が多く残されていることを指摘している。そこで、APTX と XRCC1 および XRCC4 との複合体に着目し、DNA 損傷修復における役割を明らかにすることを本研究の目的とすると述べている。

第 2 章「原理・実験材料・実験方法」では、本研究における実験材料や方法、すなわち CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集による遺伝子欠損細胞の作製、 γ -H2AX、53BP1 の蛍光免疫染色による DNA 損傷応答や修復の解析、レーザー局所照射と生細胞イメージングを組み合わせた DNA 修復タンパク質の損傷部位への動員の解析などについて述べている。

第 3 章「DNA 二本鎖切断修復における APTX 複合体の役割」では、まず、CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集により、ヒト骨肉腫細胞 U2OS から APTX 遺伝子欠損 (*APTX*^{-/-}) 細胞を樹立している。この細胞に放射線照射、あるいは I 型トポイソメラーゼ阻害剤 Camptothecin (CPT) 処理を行った後、細胞生存率や DNA 二本鎖切断の指標である γ -H2AX、53BP1 の挙動を解析している。また、RNA 干渉法により XRCC4 の発現を抑制した細胞でも同様の実験を行い、比較を行っている。まず、*APTX*^{-/-} 細胞は対照細胞に比べて DNA 二本鎖切断修復能が低下していること、すなわち APTX が DNA 二本鎖切断修復に関わることを示している。また、*APTX*^{-/-} 細胞と XRCC4 の発現を抑制した細胞とでは 53BP1 の挙動が明確に異なることを見出している。次に、免疫沈降法により、APTX が XRCC4 および XRCC1 と結合することを示している。続いて、共焦点顕微鏡を用いたレーザー局所照射と生細胞イメージングにより、APTX の損傷部位への集積は XRCC1 の発現を抑制することにより顕著に低下するが、XRCC4 の発現を抑制しても影響されないことを示している。そこで、DNA 二本鎖切断修復における APTX と XRCC4 の関係性を明らかにするために、*APTX*^{-/-} 細胞において XRCC4 の発現を抑制し、 γ -H2AX、53BP1 の挙動および末端結合 (End joining) 能を調べ、APTX 遺伝子欠損と XRCC4 発現抑制の効果が相加的であることを示している。以上の結果から、APTX は XRCC4 と結合するものの、XRCC4 とは異なる機構により DNA 二本鎖切断修復に関与することを明らかにしている。

第 4 章「PARP1/2 阻害剤による DNA 損傷修復における APTX 複合体の役割」では、まず、CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集により、U2OS から XRCC1 遺伝子欠損 (*XRCC1*^{-/-}) 細胞を樹立し、第 3 章で樹立した *APTX*^{-/-} 細胞と *XRCC1*^{-/-} 細胞がともにがん治療に用いられるポリ ADP リボシル化酵素 (PARP) 阻害剤 (PARPi) に感受性であることを示している。次に、PARPi が *APTX*^{-/-} 細胞と *XRCC1*^{-/-} 細胞に一本鎖 DNA (ssDNA) ギャップを生じさせること、この ssDNA ギャップが S 期において DNA 複製に伴って生じていることを示している。さらに、APTX との結合能を失った XRCC1 変異体を作製し、これを *XRCC1*^{-/-} 細胞に導入した細胞の解析を行うことにより、APTX と XRCC1 の結合が重要であることを示している。以上の結果から、APTX と XRCC1 の複合体が DNA 複製に起因する DNA 一本鎖切断の修復を介して、PARPi の感受性に関与することを明らかにしている。

第 5 章「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ている。

これを要するに、本論文は、APTX について、放射線などによって生じる DNA 二本鎖切断の修復における役割、および放射線とともにがん治療に用いられる PARP 阻害剤によって生じる損傷の修復における役割、さらにはこれらの修復における XRCC1、XRCC4 との関係性を明らかにしており、理学的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。