

(続紙 1)

京都大学	博士 (理学)	氏名	森脇 隆仁
論文題目	線虫 <i>Caenorhabditis elegans</i> を用いたストレス応答機構に関する研究		
(論文内容の要旨)			
<p>生物は太陽光に含まれる紫外線や、好気呼吸の副産物として生じる活性酸素種(ROS)などの様々なストレスに曝されている。紫外線や活性酸素種などのストレスはDNAやタンパク質、脂質などの細胞の構成成分を破壊し、細胞の機能を低下させ、個体レベルではがん化や老化を引き起こす。こうしたストレスから細胞を守るため、生物はストレス応答・防御機構を進化させてきた。生物におけるストレス応答・防御機構の例として、活性酸素を直接消去するストレス消去、損傷した細胞の構成成分を再合成する修復、修復しきれなかった細胞ががん化などの異常を引き起こす前に排除する細胞死の誘導などが挙げられる。こうしたストレス応答・防御機構の破綻は個体において疾病などの原因となることが知られており、個体レベルにおけるさらなる研究が望まれている。本研究では線虫 <i>Caenorhabditis elegans</i> を用いてストレス防御・応答の重要性を個体レベルで解析を行った。線虫 <i>C. elegans</i> は線形動物門に属し、体長約1 mmの小さな体の中に腸・筋肉・脳・生殖腺などの動物としての基本的な体構造を備えている。本研究ではこの線虫を材料に生物が備えているストレス応答機構の解析と、生薬を用いた外部からのストレス防御の促進の解析を行った。</p> <p>まず、精製タンパク質を用いた生化学的解析と線虫 <i>C. elegans</i> を用いた表現型の解析を行った。精製タンパク質は昆虫細胞Sf9中でバキュロウィルスに感染させ、Hisタグ融合タンパク質として発現させ、精製した。実験に用いた線虫はストレス防御遺伝子の欠損によってバックグラウンドの突然変異が蓄積しないよう、複数回バッククロスを掛け、バックグラウンドの突然変異を回復させた。その後バランス染色体を導入し使用直前までヘテロの状態を維持した。線虫を用いた <i>in vivo</i> における実験では線虫を分裂期におけるL1幼虫期と体細胞の分裂が終了した成虫期のどちらかに同調し、各ステージにおける薬剤感受性を測定した。</p> <p>DNAミスマッチ修復(MMR)の欠損は細胞レベルにおいて、アルキル化剤に対する抵抗性をもたらすことが知られていたが個体レベルにおいてはどのような影響をもたらすかは明らかにされていなかった。そこでMMRタンパク質を精製しその基質特異性の確認を行った。その結果、線虫のMutS\cdotが新口動物のMutS\cdotと異なり、1ヌクレオチドのIn/Delを認識できない代わりに3ヌクレオチド以上のIn/Delを認識できることを見出した。またアライメント解析からこの基質特異性の差が数個のアミノ酸置換によってもたらされると考えられたので、1ヌクレオチドのIn/Delの認識に関わるアミノ酸を同定した。そして、<i>in vivo</i> 解析からミスマッチ修復欠損時の影響を個体レベルで解析することに成功した。その結果、培養細胞と同じように、線虫個体でもアルキル化剤に対する抵抗性が見られることが分かった。これはMMRがゲノム中のアルキル化損傷に応答して、apoptotic autophagyを引き起こす機能があるからだと考えられた。これまで、こうした薬剤抵抗性にはDNA複製が重要な役割を果たしていると考えられてきたが、成虫を用いた薬剤処理実験の結果、DNA複製が起こらない状態でもこうした薬剤抵抗性が見られることが分かった。さらに、放射線防御遺伝子ATMの機能解析によりこれまで不明であった、「G0期におけるATMの働き」を明らかにした結果、ATMが過酸化水素に対しチェックポイントを介さずに細胞死を引き起こすことが分かった。それに加えてROSに対する防御法として、これまで科学的評価がほとんどなされて来なかった天然複合生薬の有効性を、科学的に証明することに成功した。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文では線虫*Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*)を用いて生物の備えているストレス応答機構の解析と抗酸化物質による外部からのストレス防御の促進機構について研究を行った。このストレス応答機構について国内外を問わず盛んに研究が行われており、ストレス応答機構の破綻は様々な疾病と関連があるとされている。ストレス応答機構について細胞レベルの解析例は多くあるが、個体レベルにおける解析は十分でない。そこで申請者は線虫*C.elegans*を材料に個体レベルにおけるストレス応答機構の解明を目指し、研究を行った。

DNAミスマッチ修復は、DNA複製時のポリメラーゼのミスを検正する機構として同定された。近年ではポリメラーゼのミスの校正以外にもDNA損傷応答(DDR)の場面でも働くことが報告されているが、個体レベルにおけるその生物学的意義はよくわかっていない。そこで本研究では、線虫*C.elegans*の1世代あたりの体細胞分裂回数少なさに着目し、ミスマッチ修復によるDNA損傷応答の個体レベルにおける生物学的意義の解明を目指した。線虫においてはミスマッチ修復因子の欠損が突然変異頻度の上昇をもたらすことが報告されているが、実際にミスマッチ修復タンパク質の基質は同定されていなかった。申請者は昆虫細胞Sf9とバキュロウィルスの系を用いてCeMutSαを精製し、まずその基質の同定を行った。その結果、線虫*C.elegans*のMutSαが新口動物のMutSαと異なり、1ヌクレオチドのIn/Del(挿入/欠失)を認識できない代わりに3ヌクレオチド以上のIn/Delを認識できることを見出した。また、アライメント解析からこの基質特異性の差が数個のアミノ酸置換によってもたらされると考え、1ヌクレオチドのIn/Delの認識に関わるアミノ酸を同定した。この成果はDNA修復に関する遺伝子の進化を考察するうえで非常に価値のある知見である。またin vivoで*C.elegans*を用いた実験ではミスマッチ修復欠損線虫がアルキル化剤に対し抵抗性になることを見出した。これはミスマッチ修復におけるDNA損傷応答が個体の生死に影響を与えることを示す重要な結果であり、関連研究に大きく貢献をするものである。

Ataxia Telangiectasia syndrome(AT)の原因遺伝子であるAT-mutated(ATM)は活性酸素やDNA二本鎖切断(DSB)に応答して、チェックポイントの制御やDNA修復の促進を行う。これまでATMとチェックポイントの制御との関連については多くの研究がなされていたが、チェックポイントの制御が必要でないG0期における役割についてはほとんど研究がなされていなかった。申請者は線虫を用いてG0期特異的なATMの機能解析を行い、その結果チェックポイントを介さずに過酸化水素に応答して細胞死を引き起こす経路があることを示した。また過酸化水素などの活性酸素種は老化との関連が報告されているが、本論文ではこうしたストレスに対する防御の応用例として天然複合生薬の投与が活性酸素種に対する防御の促進に有効であることを示した。以上の結果は独創的な研究で、学術的に非常に価値のあるものである。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値あるものと認める。また、平成26年1月22日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。

なお、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

要旨公表可能日：2015年4月1日以降