

京都大学	博士 ( 理学 )	氏名	船越昌史
論文題目	DNA 修復酵素 AP エンドヌクレアーゼの新規ホモログ遺伝子の同定とその機能解析		
<b>【論文内容の要旨】</b>			
<p>細胞内においてDNA は絶えず損傷を受けており、その蓄積は老化やがんの原因となる。本研究で着目した脱塩基エンドヌクレアーゼ (AP エンドヌクレアーゼ) は、AP エンドヌクレアーゼ活性に加えて、3'-ホスホジエステラーゼ活性や3'-5'エキソヌクレアーゼ活性も示す。この酵素が、塩基除去修復酵素として機能する場合、AP エンドヌクレアーゼ活性と、3'-ホスホジエステラーゼ活性が必要とされる。一方、AP エンドヌクレアーゼの示す3'-5'エキソヌクレアーゼ活性の細胞内での機能は不明である。また、この酵素には、サブタイプが存在する。サブタイプの一つであるAPEX1型は哺乳類では強いAP エンドヌクレアーゼ活性を示し、塩基除去修復において主要なAP エンドヌクレアーゼとして働く。一方で、その他のサブタイプの細胞内での機能は明らかではない。そこで本研究では、APEX2型と、リボソームタンパク質としての機能も持つP0型AP エンドヌクレアーゼに着目し、細胞内での機能を調べた。まず、カタユレイボヤのAP エンドヌクレアーゼの同定と作用の解析を行った。カタユレイボヤではこれまでにAPEX1型AP エンドヌクレアーゼが同定されているので、本研究では新たにAPEX2型とP0型のAP エンドヌクレアーゼを同定し、酵素活性の検出を行った。その結果、両タンパク質は、期待される3つの酵素活性のうち3'-5'エキソヌクレアーゼ活性のみを示した。基質特異性を調べたところ、両酵素ともにDNA 損傷応答の誘導に必要な基質DNAを分解した。大腸菌を用いた相補性実験では、両酵素ともにAP エンドヌクレアーゼ欠損大腸菌の酸化ストレス感受性を相補した。以上の事実より、APEX2型とP0型AP エンドヌクレアーゼは、APEX1型とは異なり、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性により酸化ストレス抵抗性に寄与する可能性が示された。次に、出芽酵母 APEX2 型AP エンドヌクレアーゼであるApn2が欠損した場合のミトコンドリアと細胞の生存への影響を調べた。実験条件として使用した窒素源飢餓は、細胞内高分子の分解を促進することが知られている。窒素源飢餓条件で培養した場合、野生株のミトコンドリアは徐々に減少した。一方で、APN2欠損株では、ミトコンドリアを多く保持し好気呼吸能を消失した細胞が増加した。この結果は、Apn2は窒素源飢餓条件で有害な影響を及ぼすミトコンドリアを減少させることで、ミトコンドリアの機能維持に貢献することを示唆している。また、APN2欠損株では、窒素源飢餓条件での長期培養により誘導される細胞死が、野生株と比べて減少した。この細胞死の減少は、同じ出芽酵母のAP エンドヌクレアーゼのApn1の欠損株では生じなかった。この結果は、窒素源飢餓条件での細胞の生存において、Apn2は、Apn1とは異なる機能を持つことを示している。そして、APN2欠損株は、ミトコンドリアを不活性化した状態でも長期培養時に誘導される細胞死が減少するため、Apn2は細胞の生存において、ミトコンドリアでの機能とは独立した機能を持つことが分かった。さらに窒素源飢餓条件での薬剤感受性試験から、APN2欠損株では、長期培養だけでなくAP サイト修復阻害により誘導される細胞死も減少した。この結果は、APN2欠損株で細胞死が減少する原因に、</p>			

APサイトが関係することを示している。本研究により、APEX2型やP0型APエンドヌクレアーゼは、APEX1型とは異なる作用機序により、ミトコンドリアの品質管理や、ストレス条件下での細胞の増殖や生存に寄与することが示された。

(続紙 2 )

(論文審査の結果の要旨)

細胞内に含まれるDNAは紫外線や放射線、好気呼吸時の副産物である活性酸素種などにより損傷を受ける。DNA損傷の蓄積はがんや老化の原因となるため、修復する必要がある。申請論文で着目したAPエンドヌクレアーゼ(APEX)は、塩基除去修復で必要なAPエンドヌクレアーゼ活性と3'-ホスホジエステラーゼ活性、さらに細胞内における機能が不明な3'-5'エキソヌクレアーゼ活性を示す。また、APエンドヌクレアーゼにはサブタイプが存在するが、塩基除去修復で主要な役割を担うAPEX1型以外のサブタイプの機能は明らかではない。そこで申請者は、このような機能不明なAPエンドヌクレアーゼの解析を行った。

申請者はカタユレイボヤのAPEX2型及びP0型APエンドヌクレアーゼを新たに同定し、主に精製酵素を用いた生化学的な手法で機能解析を行った。その結果、両タンパク質ともに3'-5'エキソヌクレアーゼ活性のみを示すが、APエンドヌクレアーゼ欠損大腸菌に導入すると、酸化ストレスへの抵抗性を示すことを明らかにした。これまで細胞内での機能が不明だった3'-5'エキソヌクレアーゼ活性が、酸化ストレス抵抗性に寄与し得ることを示した。

窒素源飢餓条件では、ミトコンドリア由来の活性酸素種が、ミトコンドリアの機能低下や細胞死を引き起こすため、余剰なミトコンドリアは分解する必要があることが知られている。一方で、このように酸化ストレスが生じる窒素源飢餓条件においてAPエンドヌクレアーゼがどのような役割を持つかは不明であった。申請者は出芽酵母Apn2欠損株を使用し、ミトコンドリアと細胞の生存におけるAPEX2型APエンドヌクレアーゼの新たな機能を明らかにした。顕微鏡観察の結果、Apn2の欠損株は窒素源飢餓条件でもミトコンドリアが減少しにくいことが分かった。そして、窒素源飢餓条件で培養を続けるとApn2欠損株ではミトコンドリア異常が生じることが分かった。以上の事実より、窒素源飢餓条件では、Apn2はミトコンドリアを減少させることで、ミトコンドリアの機能維持に貢献する可能性が示された。ミトコンドリアではDNA修復機構が貧弱であり、ゲノム情報の維持機構はあまり分かっていない。本研究で明らかになったApn2のミトコンドリア品質管理機能は、ミトコンドリアゲノムの維持機構を解明する上で大きな手掛かりになり得る。

窒素源飢餓条件での細胞の生存に着目した実験から、Apn2はミトコンドリアの機能とは別に、細胞死を促進する機能があることも分かった。この現象は細胞内で強いAPエンドヌクレアーゼ活性と3'-ホスホジエステラーゼ活性を示すApn1の欠損株では見られなかった。そして、APサイト修復阻害剤を使用した薬剤感受性試験から、Apn2が細胞死を促進するメカニズムにはAPサイトが関係していることが分かった。APエンドヌクレアーゼは、がん治療の化学療法と併用する目的で阻害剤の開発が進んでいる。しかし、本研究で見出した結果は、APエンドヌクレアーゼ阻害時の細胞への影響は、APエンドヌクレアーゼのサブタイプにより異なるため、阻害剤開発には、サブタイプ別の作用機序の解明と細胞の生存への影響の評価が必要であることを示している。

以上のように、申請者の研究はAPエンドヌクレアーゼに新規の作用機序が存在することを細胞レベルで示した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のあるものと認める。また、令和2年9月28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。

要旨公表可能日： \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日以降