

(続紙 1)

京都大学	博士 (人間・環境学)	氏名	齊 菲
論文題目	Investigation of the role of FXR1 and SLFN11 in cellular response to genotoxic stress (遺伝毒性ストレスに対する細胞応答におけるFXR1、SLFN11の役割の解析)		
(論文内容の要旨)			
<p>哺乳類細胞において遺伝毒性ストレスにより様々な生物学的影響が引き起こされることが知られている。進化の過程で、ゲノム安定性を維持するために、哺乳類細胞はDNA損傷応答(DNA damage response, DDR)、複製ストレス応答、酸化ストレス応答などの各種細胞応答を発達させてきた。これらの細胞応答の欠損は、神経変性疾患やがんなどの様々なヒト疾患の基盤となる。DDRの中心因子ATM (AT mutated) キナーゼは、神経変性疾患や悪性疾患を発症するAtaxia Telangiectasia (A-T)症の原因遺伝子として発見された。また、がんの代表的治療法の一つである化学療法においては、一般にゲノムにDNA損傷をあたえDNA複製を停止させることが多い。その細胞応答においては、ATMに類似したATRキナーゼが介在する複製ストレス応答が臨床効果をもたらす。本研究では、ATMの活性化因子であるMRE11と、がん化学療法の有効性を促進する複製ストレス応答因子SLFN11に注目して解析した。</p> <p>第一章では、今回の研究の背景となる酸化ストレスその他によるDNA損傷、複製ストレスなどを説明し、DNA修復やチェックポイントなどのストレス応答について、分子機構を簡潔にまとめている。さらに応答を欠損したA-T症をはじめとした関連するヒト疾患について、解説を加えた。</p> <p>実際の研究内容としては、まず、酸化ストレスによるATM活性化におけるMRE11の役割について解析した(第二章)。ATM遺伝子を欠損するA-T患者は進行性の小脳性運動失調を示す。以前から、このような脳神経変性症状と、ATMキナーゼの酸化ストレスに対する機能との関連があることが示唆されている。MRE11遺伝子を欠損するATLD (AT-like disorder)患者はA-Tに類似した臨床症状を示すことから、MRE11の酸化ストレス応答への役割が想定された。そこで、MRE11が欠損したATLD患者細胞を調べたところ、酸化ストレスによるATMの活性化に異常を示した。また新規MRE11結合タンパク質であるFXR1を同定し、このFXR1は一部のMRE11とともに細胞質とミトコンドリアに局在することが示唆された。さらに、FXR1がMRE11とともに酸化ストレスに対する細胞応答に機能することを明らかにした。一方、FXR1のDNA二重鎖切断への役割は限定的で、相同組換えに限られることが示唆された。</p>			

次に、SLFN11のN末端に存在するRNaseドメインの役割を、その活性に必須な2つのアミノ酸残基を変異させて解析した(第三章)。以前の解析で、SLFN11のC末端に存在するHelicaseドメインが、MRE11などのヌクレアーゼによる停止複製フォーク分解を促進することがわかっている。研究室で作製されていた*SLFN11*ノックアウトHAP1細胞にRNase変異型SLFN11を外来性に発現させたところ、野生型と同様にヒドロキシウレアによる複製ストレス感受性を増加させ、MRE11による複製フォーク不安定化を促進することが判明した。酸化ストレス応答への役割とは異なり、複製フォークの分解におけるFXR1の役割は観察されなかった。以前に報告された研究で、SLFN11はRNase活性によって、複製ストレス応答に重要な制御因子であるATRキナーゼの発現に必要な特異的tRNAサブセットを分解してそのタンパク質レベルを低下させるとされている。そこで、SLFN11の野生型とRNase変異型を導入したHAP1細胞で、ATRキナーゼのタンパク質レベルを調べたところ、この報告と部分的に一致して、ATRキナーゼのタンパク質の量が抑制されていた。ATRレベルの低下が複製フォークに与える影響を調べるため、ATR阻害剤処理後の停止複製フォークの分解を観察したところ、分解が促進されていた。したがって、がんの化学療法におけるSLFN11の役割にATRタンパクレベルの制御が関与している可能性が示唆された。

第四章においては、第二章、第三章で解明した研究成果を、ゲノム安定性の維持という観点からとりまとめ、転写阻害において形成されるR-loopとの関係について言及し、ここでの成果の限界や、今後望まれる研究の方向性などについて議論を加えている。

本研究によるFXR1とSLFN11の機能の解析は、酸化ストレス、DNA損傷、複製ストレスに対する細胞応答に重要なATM/ATR両キナーゼの活性や発現の制御に関する新しい知見を提供し、がんや神経変性疾患などの疾患基盤となる遺伝毒性ストレスに対する応答のメカニズムの一端を明らかにした。

(論文審査の結果の要旨)

Qi Fei氏によって提出された論文は、(1)小脳変性症をもたらすAtaxia Telangiectasia (A-T)症の原因遺伝子でDNA損傷応答の重要なリン酸化酵素であるATMキナーゼの活性化因子であるMRE11とその会合因子として新規に同定されたFXR1、(2)複製ストレス応答を増大させる興味深い因子としてがん化学療法分野において注目されているSLFN11とATM関連因子であるATRキナーゼの関わり、の二つの部分に大別される。ATMとATRという細胞周期チェックポイントにおいて相互に関連した重要なキナーゼと、その調節因子との関係を解析することにより、MRE11のATM活性化機能と、それとは独立したMRE11のDNA複製分解活性による停止複製フォークの不安定化という両側面に着目したものとなっている。

第二章において、Qi氏は、A-Tの小脳変性症が酸化ストレス応答の欠損によるものであるという仮説と、A-T類似疾患であるMRE11欠損症ATLD症の共通性に鑑み、MRE11がATMの酸化ストレスによる活性化因子である可能性に着目して解析した。MRE11はNBS1やRAD50と会合して複合体として存在することが知られているが、興味深いことに、酸化ストレス応答へのATM活性化に必要なのはMRE11のみであることが明らかとなった。ATMは以前からミトコンドリアに局在していることが知られており、ミトコンドリアが酸化ストレスをもたらす重要なオルガネラであることに一致して、MRE11が部分的にはミトコンドリアに存在することも観察された。これらの結果から、Qi氏はミトコンドリアにおいてMRE11が新たな複合体を形成すると想定し、マスペクトロメトリによって新規のMRE11会合分子FXR1の同定にも成功した。FXR1が主にミトコンドリアに、そして僅かに細胞質に局在するという実験結果から予想される通り、FXR1のDNA損傷応答における機能は限定的であり、FXR1は主に酸化ストレス応答に機能すると結論された。これらの成果は、小脳変性における重要性が認識されているATMの酸化ストレスによる活性化に重要なメカニズムの解明に貢献するものとして高い価値を有している。

さらに、Qi氏は、第三章においてがん化学療法の臨床効果に重要な複製ストレス応答と、その増強因子と目されているSLFN11分子に着目し、そのN末端側のRibonuclease (RNase)ドメインの機能が複製ストレス応答にどのような役割を持っているかについて検討を行った。Qi氏所属の研究室からの先行研究によって、C末端側に存在するHelicaseドメインが複製ストレス応答に必須であることはすでに確認されている。RNA分解活性に必要な2つのアミノ酸残基をアラニンに変更した変異体を、作成済みであったSLFN11欠損細胞に導入し発現させたところ、野生型よりも低いレベ

ルでの発現であったにも関わらず、野生型と同等に細胞の複製ストレス感受性を増大させ、DNAファイバーアッセイによる停止複製フォークの分解も同等であることが示された。他のグループからの先行研究において、RNaseドメインによるtRNA分解がATRキナーゼの翻訳を低下させ、複製ストレス応答を増大させると報告されているため、Qi氏はSLFN11の導入のATRキナーゼタンパク質に与える影響を調べた。興味深いことに、RNaseドメインの変異体においても、ATRキナーゼは明瞭に発現低下していた。この結果は、先に述べた先行研究において示されたSLFN11によるATRキナーゼタンパク質レベル低下を再現しているが、RNaseドメインの役割については一致していない。今後この低下がどのようなメカニズムで起こるのか、SLFN11のHelicaseドメインに依存した低下なのか、等について検討することが要請される。また、ATR阻害剤の効果をDNAファイバーによって調べることにより、複製フォーク分解が亢進することを明らかにしている。これら一連の解析結果は、SLFN11の複製ストレス応答にATRキナーゼ量の低下が寄与する可能性を支持し、SLFN11発現による化学療法の臨床効果促進メカニズムの理解をすすめるものと認められる。

以上、これらの研究成果は、細胞のストレス応答と疾患の発症メカニズム、さらには化学療法における臨床効果促進メカニズムの解明に十分に貢献するものと判断された。したがって、本論文は、生物と環境の相関に着目し、生命が種々の環境のもたらすストレスに適応するメカニズムの探求をめざす相関環境学専攻、分子・生命環境論講座、生命環境相関論分野にふさわしい内容をそなえたものである。よって、本論文は博士（人間・環境学）の学位論文として価値あるものと認める。また、令和4年12月20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： 令和 年 月 日以降