

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	原 智彦
論文題目	過酸化水素処理後のゲノム安定性維持に関わるCST複合体の機能解析		
(論文内容の要旨)			
<p>染色体テロメアDNA最末端に存在する一本鎖テロメアDNAと結合するCST複合体 (Ctc1-Stn1-Ten1) は、酵母から植物、哺乳類にいたるまで広く保存されたテロメア保護因子である。一方、これらの因子はDNA合成酵素<math>\alpha</math>の補助因子として独立して同定されていたことから、CSTはテロメアだけではなくゲノム全体にわたって重要な機能を有することが長らく推測されていた。実際、CSTはDNA複製が停止した後の複製再開に必要であることが報告されている。DNA複製停止は鋳型DNAの損傷によって引き起こされることが多いことから、申請者はCSTがDNA損傷修復に関与している可能性を考え、特に、生理的なDNA損傷の原因の一つである酸化損傷について注目して本研究を実施した。</p> <p>申請者はまず、CST複合体構成因子をコードする<i>STN1</i>遺伝子のノックダウンHeLa細胞 (以下、KD細胞) を作成し、種々のDNA損傷試薬によって細胞生存率が低下することを見出し、CSTがDNA損傷修復に必要である可能性を示した。そこで、過酸化水素 (以下、<math>H_2O_2</math>) 添加によるDNA酸化損傷について注目して研究を行った。断片化したDNAを定量するコメットアッセイおよび二本鎖DNA切断マーカである<math>\gamma H2AX</math>の蛍光抗体染色により、<math>H_2O_2</math>処理KD細胞は対照細胞に比べて顕著な二本鎖および一本鎖DNA損傷を来すことを示した。次に申請者は、細胞を<math>H_2O_2</math>処理後、<math>\gamma H2AX</math>抗体染色とpropidium iodide染色によるDNA定量を同時に行ない、KD細胞・対照細胞共にDNA量に関係なく<math>\gamma H2AX</math>陽性を示したことから、<math>H_2O_2</math>処理は細胞周期と無関係にDNA損傷を与えることを明らかにした。さらに、細胞周期をS期直前で停止させる薬剤ミモシンを添加することでG1期に同調させた細胞、および、薬剤添加後これを除去してS期に同調して進入させた細胞を用意し、<math>H_2O_2</math>処理後5時間の時点で細胞生存率を測定した。その結果、G1期にある対照およびKD細胞は僅かな生存率低下を示した一方、S期にある対照およびKD細胞は有意な低下を示し、特にKD細胞において強い細胞死が認められたことから、CSTはDNA酸化損傷に対する特にS期における生存率維持に必要であると結論づけた。</p> <p>DNA複製におけるCSTの役割を明らかにするために、申請者は、細胞を<math>H_2O_2</math>処理前にBrdUにて、処理後にEdUにて連続標識し、<math>H_2O_2</math>処理時にS期にあった細胞 (BrdU陽性) が処理後にDNA合成を行うことができるか (BrdUとEdUの二重陽性) を検討した。その結果、申請者は、KD細胞は対照細胞に比べて有意に二重標識される細胞の割合が少ないことを見出し、CSTはDNA酸化損傷後に複製を再開するために必要であると結論した。<math>H_2O_2</math>処理はゲノムDNAに主として一本鎖DNA切断を誘導し、それはDNA複製反応によって二本鎖切断となってDNA相同組換え修復 (HR) を誘導する。そこで申請者は、HRに重要な役割を果たすRad51の集積を<math>H_2O_2</math>処理後の細胞の蛍光免疫染色によって観察し、KD細胞では対照に比べてRad51フォーカスの出現頻度が低下することを見出し、CSTは二本鎖切断末端がヌクレアーゼによって一本鎖DNAにされた後、損傷部位に結合してRad51を呼び込むことでHRを誘導するというモデルを提唱している。本研究は、テロメア結合因子として広く認識されていたCSTが、生理的に最も高頻度で出現する酸化DNA損傷の修復に必要であることを示したもので、CSTがテロメア保護、DNA複製促進に加えてDNA修復に関与することをはじめて示したものであると考察している。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

哺乳類CSTは申請者が所属する研究室においてテロメア結合因子として発見された。その報告の中で、細胞染色によりテロメア局在と一致しない局在を示すCSTが有意な頻度で見られたことから、CSTがテロメアに限らない未知の機能を持つであろうことが予想されていたが、その正体は長い間不明であった。申請者は、その疑問に挑むにあたり、CSTがDNA損傷修復に関わっている可能性を着想し、本研究においてそれを数多くの実験的証拠にもとづき実証している。

歴史的にDNA損傷修復に関わる因子は、その欠損株がさまざまなDNA損傷薬剤に感受性をもつことによって同定されてきた。その前例にならって、申請者はまずCST三量体の一因子Stn1をコードするSTN1遺伝子のノックダウンHeLa細胞(KD細胞)を樹立し、さまざまなDNA損傷試薬にKD細胞が感受性を示すことを示した。その後、申請者はこれらの試薬によってもたらされる様々なDNA損傷を網羅的に解析するのではなく、生体内で生じる活性酸素種によって生理的に生じるDNA酸化損傷に注目して研究を進めた。いたずらに広範な対象を解析するのではなく、特定の種類の損傷に絞って研究を進めたことが本研究の成功の鍵と思われ、このことは申請者が研究者としての才能をもつことを示している。

おそらくKD細胞の発現抑制効率が著しいものではなかったために、KD細胞に見出された表現型は対照細胞と比較して必ずしも著しいものではなかった。しかし、申請者は数多くの独立した実験手法を駆使し、多数の生物学的再現実験を行うことで統計学的に有意な結果を取得し、一つ一つの実験結果を慎重に判断してついには最終的な結論を得ることに成功している。このことは、申請者が指導者や研究室同僚のコメントを素直に受け止め改めるべき点は改めた上で、ひるむことなく実験と思考を繰り返したことによると判断される。

本研究で得られた成果は、単にCST複合体の新たな機能を発見したことに留まらない。テロメアは正常ゲノムが持つ唯一の生理的なDNA末端であることから、いくつかのDNA損傷修復因子が同所で機能することが知られていた。その中でも、本研究の成果は、テロメアDNA末端保護が実はDNA二重鎖切断末端保護と共通の分子機構を使って行われている可能性を示唆しており、新たなDNA 3R (replication, recombination, repair) 反応の相互作用の重要性を例示した生物学的に価値あるものであると言える。

以上のように、本論文は生命科学に関する高度で幅広い学識、細胞生物学やがん生物学の研究分野における優れた研究能力、そして生命科学の理解・発展に寄与する新しい発見や概念が示されており、論理的かつ一貫性を持って記述されている。よって博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。さらに、令和5年9月6日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。(ただし、学位規則第8条の規定により、猶予期間は学位授与日から3ヶ月以内を記入すること。)

要旨公開可能日： 年 月 日