

氏名	島田 幹男
----	-------

(論文内容の要旨)

本論文は、DNA 修復タンパク質である NBS1 の新規機能として中心体複製制御への関与を、分子生物学的手法を用いて検証したものである。

ナイミーヘン染色体不安定性症候群 (Nijmegen breakage syndrome; NBS) は高発癌性、小頭症、発育遅滞といった重篤な症状を示す遺伝病である。また、NBS の細胞学的特徴として放射線高感受性及び染色体不安定性を示す。原因遺伝子産物である NBS1 は DNA 修復活性や細胞周期チェックポイント制御に関与しており、細胞内染色体の安定性に深く関わっていることが明らかになってきている。染色体不安定性は細胞の癌化の要因の一つと考えられており、NBS 患者が高発癌性である原因が NBS1 の機能不全によると考えられている。

一方、中心体は染色体安定性に関わる細胞内小器官である。中心体は一組の中心小体と、それを取り巻く中心体周辺物質からなる構造体で、細胞分裂において極を形成する中心器官となる。細胞の分裂期においてそれぞれの娘細胞が一つの中心体を受け取る。そして、その中心体は DNA のように次の分裂までに一回複製される。この複製機構に異常が生じると中心体は過剰に複製され、正常に細胞分裂が進まなくなり、染色体分配が均等に行われなくなる。すなわち、中心体の正確な複製は染色体の安定性維持に必須であり、その破綻は細胞に染色体不安定性を招き、発癌の要因になると考えられる。近年、DNA 損傷応答に関わるタンパク質が中心体に局在していることから、中心体の複製制御に関与しているという可能性が指摘されている。

本論文においては、初めに NBS1 が中心体に局在するかどうかを、免疫染色法及び中心体の分離法といった分子生物学的手法及び生化学的手法を用いて検証した。NBS1 抗体及び中心体のマーカータンパク質である γ -tubulin 抗体を用いた免疫染色法により、ヒト培養細胞の HeLaS3、MCF7、BJ、マウス培養細胞の NIH3T3 といった各種培養細胞において NBS1 と中心体の共局在を検出した。その際、G1 期及び M 期と細胞周期を通して NBS1 が中心体に局在している事も確認した。これらの事実は、NBS1 が複製期のみならず細胞分裂期においても中心体を制御している可能性を示唆している。また、この NBS1 と中心体の共局在を中心体の分離法で確認している。この手法では、細胞懸濁液を蔗糖濃度勾配遠心法で分離する事により中心体が依存する画分を分離する。得られた中心体画分をウエスタンブロッティング法で検証した結果、中心体と NBS1 が同じ画分に存在していた。

次に NBS1 の中心体における機能を検討するために、siRNA 法を用いて NBS1 タンパク質の発現量を低下させる実験を行った。ヒト及びマウスの培養細胞で NBS1 の発現量を低下させると中心体の過剰複製が上昇する結果が得られた。また、NBS1-ノックアウトマウス細胞及びその cDNA を用いた相補細胞においても相補細胞と比較して NBS1-ノックアウトマウス細胞が有意に高い中心体の過剰複製がみられた。次に NBS1 タンパク質の部位特異的な機能を特定する為に、種々の突然変異を挿入した NBS1cDNA を NBS1-ノックアウトマウス細胞に導入した。その結果、タンパク質—タンパク質間の相互作用に重要な FHA ドメインに変異がある NBS1 を発現した細胞では、NBS1-ノックアウトマウス細胞と同様の高い中心体過剰複製がみられた。この結果から、NBS1 が FHA ドメインを介して、他のタンパク質と相互作用する事が中心体の複製制御に必要であることが示唆された。

氏名	島田 幹男
----	-------

次に NBS1 と相互作用するタンパク質の同定を行った。候補としたのは DNA 損傷応答において NBS1 と相互作用する事が知られている BRCA1 タンパク質及び ATR タンパク質である。BRCA1 は家族性乳癌の原因遺伝子であり、タンパク機能としては E3 ユビキチンリガーゼ活性が知られている。BRCA1 のユビキチン活性の抑制は中心体の過剰複製を誘導することが報告されている。また、ATR は劣性遺伝病のセッケル症候群の原因遺伝子であり、タンパク質の機能としてはリン酸化キナーゼ活性が知られている。ATR は中心体へ局在しておりその機能の抑制が中心体の過剰複製を誘導することが報告されている。

初めに、蔗糖濃度勾配遠心法で分離した中心体画分において NBS1 抗体を用いた免疫沈降を行ったところ、BRCA1 との結合が検出された。一方、BRCA1-ノマウス細胞と野生型細胞の比較では BRCA1-ノマウス細胞が高頻度に中心体の過剰複製が起こった。この BRCA1-ノマウス細胞にさらに siRNA を用いて NBS1 タンパク発現を低下させたところ、BRCA1-ノマウス細胞でみられた以上の中心体の過剰複製は検出できなかった。この結果は、NBS1 が中心体の複製制御において BRCA1 と同じ経路で機能している為に、両タンパク質が機能低下した場合でも一方のタンパク質の機能低下以上の効果が得られないことを示している。続いて、ユビキチン化特異認識抗体 FK2 を用いて、BRCA1 のユビキチン化活性を測定した。FK2 抗体を用いた免疫染色法は、BRCA1-ノマウス細胞の中心体が BRCA1 cDNA で相補した細胞と比較してユビキチン化の極度の低下を示した。また、BRCA1-ノマウス細胞及び相補細胞から分離した中心体画分に対して、 γ -tubulin 抗体を用いた免疫沈降を行い、さらに γ -tubulin 及び FK2 抗体を用いたウェスタンブロットティングを行った。その結果、BRCA1-ノマウス細胞では相補細胞と比較してユビキチン化されている γ -tubulin の割合が有意に減少した。一方、NBS1-ノマウス細胞及び相補細胞でも同様の実験を行った結果、NBS1-ノマウス細胞でも相補細胞と比較してユビキチン化が有意に減少した。これらの結果から、中心体の複製制御には NBS1 を介した BRCA1 による γ -tubulin のユビキチン化が重要である事が示唆された。

一方、ATR は NBS1 の FHA ドメインを介して DNA 損傷応答に関与する事が知られているので、ATR が BRCA1 による γ -tubulin のユビキチン化に関わっているか検証した。siRNA による ATR をノックダウンした培養細胞の免疫染色を行った結果、ATR ノックダウン細胞はコントロール細胞と比較して中心体のユビキチン化が有意に減少していた。また中心体単離画分に対する γ -tubulin 抗体を用いた免疫沈降法による実験結果でも同様にコントロール細胞と比較して ATR ノックダウン細胞で γ -tubulin のユビキチン化が有意に減少した。

以上の結果より、NBS1 や BRCA1、ATR といった DNA 損傷応答タンパク質が中心体複製制御にも関わっている事が明らかにできた。本研究は NBS1 及び BRCA1 欠損細胞の癌化の原因として中心体制御の破綻という新たな経路を示し、さらに ATR が NBS1 と相互作用する事により γ -tubulin のユビキチン化を介して中心体の複製制御に関わっていることを示した。

氏名	島田 幹男
----	-------

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、分子生物学的手法及び生化学的手法を用いた実験系により DNA 損傷応答タンパク質 NBS1 の中心体複製機構への関与及びその制御メカニズムを論述したものである。本論文では、発癌メカニズムの一つである染色体の不安定性の要因として中心体の複製制御に着目している。NBS1 による中心体複製制御の破綻が染色体の不安定性、ひいては細胞の癌化に結びつくと考え、NBS1 の中心体維持機構を考察している。

本研究は初めに、ヒト劣勢遺伝病のナイミーヘン染色体不安定性症候群 (NBS) の臨床学的特徴としての小頭症に着目し、既に小頭症の原因として報告されている中心体の維持に異常があるのではないかと推測した。これは、中心体の維持機能の異常が染色体不安定性を誘導するので、NBS 患者の細胞学的特徴として知られる染色体不安定性とも一致している。

ヒト細胞及びマウス細胞で NBS1 が中心体に局在していることを、NBS1 抗体および中心体のマーカータンパク質の γ -tubulin に対する抗体を用いて免疫染色法で確認した。さらに、ヒト細胞を用いた蔗糖密度勾配遠心法により中心体の分離を行い、NBS1 が中心体と共局在していることを確認している。以上のように、2 種類の実験手法を用いて NBS1 と中心体の共局在を確認した慎重さは科学的検証として極めて重要である。

次に、申請者は siRNA 法を用いたタンパクの発現低下により、NBS1 の中心体に及ぼす効果を実証している。免疫染色した中心体数の定量により NBS1 のノックダウンを行ったヒト細胞及びマウス細胞において中心体過剰複製が顕著に増加する結果を得た。この中心体過剰複製は NBS1 の欠損した NBS1-/-マウス細胞においても有意に中心体数が増加していることから、妥当な結論である。

中心体数の増加には中心体が断片化した場合と、中心体の過剰複製が起こる場合の 2 経路が考えられる。そのため中心体周辺物質の構成タンパク質である γ -tubulin の抗体と中心体の構成タンパク質である centrin-2 の抗体で二重染色を行った。その結果、いずれの中心体でも γ -tubulin と centrin-2 の両方の抗体で染色されることから、NBS1 の機能異常による中心体数の増加は過剰複製が原因とする結果は合理的である。

さらに、蔗糖密度勾配遠心法により分離した中心体画分を用いて、NBS1 抗体による免疫沈降を行った結果、NBS1 と BRCA1 が物理的に結合している結果を得た。BRCA1 は中心体への局在と複製への関与が既に報告されているタンパク質である。以上の事から、NBS1 の中心体維持機能に BRCA1 が関連しているとする仮説の下に以下の実験を行った。BRCA1-/-マウス細胞では中心体の過剰複製が起こるが、その BRCA1-/-マウス細胞にさらに siRNA を用いて NBS1 のノックダウンを行っても中心体の過剰複製の増加は見られなかった。同様に、U2OS 細胞を用いて siRNA による BRCA1 と NBS1 のダブルノックダウンを行ったが、それぞれ単独のノックダウン時の中心体の過剰複製頻度以上では起こらなかった。これらの結果から中心体の複製維持機構において NBS1 は BRCA1 と同じ経路に属しているために、BRCA1 と NBS1 の機能を同時に阻害してもそれ以上の中心体の過剰複製が加算的に起こらなかったと推測したのは合理的であり、極めて興味深い発見である。

これまでの報告から BRCA1 は E3 ユビキチンリガーゼとして中心体の構成物質である γ -tubulin をユビキチン化する事が in vitro の実験から知られている。しかし、実際に細胞でユビキチン化されることを

氏名	島田 幹男
----	-------

確認した報告が無いので、申請者はユビキチン化を特異的に認識する FK2 抗体を用いて BRCA1 による γ -tubulin のユビキチン化の検出を試みた。免疫染色法を用いた結果、BRCA1-/-細胞では野生型細胞と比較して中心体付近での FK2 抗体による染色が顕著に減少している事が判明した。続いて、BRCA1-/-マウス細胞から蔗糖密度勾配遠心法により分離した中心体画分を用いて、 γ -tubulin 抗体による免疫沈降で得られたサンプルを、FK2 抗体によるウエスタンブロッティングを行った。その結果、BRCA1-/-マウス細胞では野生型細胞よりも顕著にユビキチン化のレベルが減少していた。このように細胞レベルでも γ -tubulin が BRCA1 によりユビキチン化を受ける事を確認した成果とともに、申請者により開発された新規の実験手法は今後の研究発展に大きく貢献するものと期待される。

続いて申請者は、この γ -tubulin のユビキチン化の検出法を NBS1-/-マウス細胞に応用して、NBS1-/-マウス細胞でも γ -tubulin のユビキチン化レベルが顕著に減少している事を発見した。また、siRNA による BRCA1 と NBS1 のノックダウン U2OS 細胞においてもそれぞれ γ -tubulin のユビキチン化が減少している事を確認した。興味深い事に、BRCA1 と NBS1 のダブルノックダウン細胞ではそれぞれ単独でのノックダウン時よりも低いユビキチン化が検出されなかった。この事は上述の両タンパクの同時ノックダウンでも加算的な過剰複製が観察されなかった事実と合致している。これらより、NBS1 は BRCA1 による γ -tubulin のユビキチン化の制御に関わっていると結論づけているのは妥当であるといえる。

申請者はさらに NBS1 の部位特異的な役割を決定する為に、NBS1 に特異的変異を導入した細胞を用いて、NBS1 の中心体過剰複製機構を検討している。その結果、FHA ドメインと呼ばれるタンパク質間の相互作用に関与する NBS1 ドメインに変異を挿入した細胞で中心体の過剰複製が有意に高いことを確認した。以上の結果から、NBS1 が FHA ドメインを介して他のタンパク質と相互作用する事により中心体の複製制御を行っていることが示唆された。この為、NBS1 と FHA ドメインを介して結合するとされる ATR タンパクの解析を行ったのは極めて合理的な判断である。実際、ATR が中心体に局在していることが示された。また、siRNA により ATR をノックダウンした結果、 γ -tubulin のユビキチン化が顕著に減少していることが明らかとなった。これと一致して、NBS1-/-細胞に変異 FHA ドメインを発現した細胞においても γ -tubulin のユビキチン化が減少した。以上の実験結果より NBS1 と ATR の相互作用が BRCA1 による γ -tubulin のユビキチン化に重要であり、その破綻が中心体の維持に異常をもたらすと結論づけたことは論理的であり、また複数の実験により実証された。

最後に、NBS1 が ATR、BRCA1 を介して中心体の複製制御を行っていることを示した実験結果から、中心体複製制御の破綻が染色体不安定性につながり発癌にいたる経路が、NBS 患者の高発癌性を示す原因の一つになっている可能性を考察している。本論文は国際学会誌である米癌学会学会誌に掲載予定である。

よって、本論文は人間・環境学博士の論文として価値あるものと認める。また、平成 21 年 2 月 5 日の公聴会において、論文内容とそれに関する事項について諮問を行った結果、合格と認めた。