

京都大学	博士（医学）	氏名	吉清和則
論文題目	KIAA1018/FAN1 nuclease protects cells against genomic instability induced by interstrand cross-linking agents (KIAA1018/FAN1 ヌクレアーゼはDNA鎖間架橋剤により誘導されるゲノム不安定性に対して細胞を保護する)		
(論文内容の要旨)			
<p>KIAA1018は、DNA修復経路の一つであるミスマッチ修復に関連する蛋白質として報告され、ヌクレアーゼドメインを持つことから、DNA修復のプロセッシングに関わると予想された。DNA修復機構の解明は、がんやDNA損傷を原因とする疾病の解明・治療につながる。そこで本研究は、標的遺伝子破壊効率が高いニワトリDT40 Bリンパ細胞株からKIAA1018遺伝子破壊細胞を樹立することで、KIAA1018の機能解析を行うことを目的として開始した。最近になって、KIAA1018は、抗がん剤として使用されているシスプラチンやマイトマイシンC(MMC)といったDNA架橋剤によるDNA鎖間架橋(ICL)の修復に重要なファンコニ貧血(FA)経路に関連することが報告され、FAN1と名付けられた。しかしながら、既報論文はsiRNAを用いたヒト細胞における遺伝子発現抑制実験であり、KIAA1018が真にFA経路の因子としてICL修復に重要であるかは不明であった。そこで、KIAA1018およびFA因子の二重破壊細胞の表現型解析により、KIAA1018のDNA修復経路における遺伝学的相互作用を詳細に解析した。</p> <p>最初に、ニワトリKIAA1018がヌクレアーゼとして機能しているかを調べた。SF9細胞を用いて調製したKIAA1018は、5'-flap構造を特異的に認識して切断し、5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を有していた。ゆえに、KIAA1018はDNA修復に関わるヌクレアーゼであることが示唆された。</p> <p>次に、KIAA1018遺伝子破壊がDNA修復に与える影響を調べた。樹立した<i>kiaa1018</i>細胞の増殖能や、自然発生的な姉妹染色分体交換頻度は正常であり、内因性のICL修復に対する寄与は小さいと考えられた。しかし、様々な外的DNA損傷原存在下での増殖と生存率を調べたところ、<i>kiaa1018</i>細胞はシスプラチンおよびMMCに対してのみ高感受性を示した。さらに、MMC処理した<i>kiaa1018</i>細胞では、染色体異常が増加していた。したがって、KIAA1018は外因性のICL修復に重要であると結論した。</p> <p>次に、KIAA1018とFA経路との関係を調べた。FA経路にはFANCC、FANCD2、FANCIなどといった複数の因子が関与しており、ICL修復は、FANCCなどを含む複合体によってユビキチン化されたFANCD2が、ICL部位においてフォーカスを形成することで誘導されると考えられている。<i>kiaa1018</i>細胞において、FANCD2は正常にユビキチン化され、フォーカスを形成していた。しかし、<i>fancc</i>細胞では、KIAA1018のフォーカス形成が低下していた。よって、KIAA1018は、少なくともICL部位における局在に関してFA因子と協同していると考えられた。そこで次に、KIAA1018のICL修復におけるFA因子との相互作用を遺伝学的に解析するため、KIAA1018とFANCCの二重破壊細胞を樹立した。<i>kiaa1018/fancc</i>細胞のシスプラチンに対する感受性は、各遺伝子単独破壊細胞より高く、またMMC処理における染色体異常も相加的であった。さらに、KIAA1018とFANCIの二重破壊細胞を樹立し、同様の解析を行ったところ、各遺伝子単独破壊細胞と比較して相加的な表現型であった。以上の結果より、KIAA1018は、ICL修復に関してFA経路とは独立して機能することが明ら</p>			

かとなった。

本研究により、KIAA1018は、少なくともDT40細胞において、FA因子と協同してDNA架橋剤により誘導されるICL部位に集積するものの、修復に関してはFA経路とは異なるはたらきによってゲノム安定性に寄与することを明らかにした。このことは、広く抗がん剤として用いられているDNA架橋剤の作用機序を理解する上で重要であり、将来的には治療効果の事前予測に有用であると期待される。

(論文審査の結果の要旨)

シスプラチンなどの抗がん剤は、DNA鎖間架橋(ICL)によってDNAに損傷を与え、がん細胞といった特に分裂能の高い細胞を死滅させる。近年になって、新たにKIAA1018というヌクレアーゼがICL修復にはたらくことが報告された。しかしながら、ゲノム安定性への寄与や、ICL修復に重要なファンコニ貧血(FA)因子との遺伝学的相互作用は明らかにされていなかった。

今回、申請者らは、ニワトリDT40 Bリンパ細胞株を用いて複数の遺伝子破壊細胞を樹立し、表現系を解析した。*kiaa1018*細胞は、正常に増殖するものの、DNA架橋剤に対して高い感受性と染色体異常を示し、KIAA1018は外因性のICL修復に重要であることを明らかにした。さらに、*kiaa1018/fancc*細胞および*kiaa1018/fanij*細胞を樹立し、少なくともDT40細胞において、遺伝学的にKIAA1018とFA因子がICL修復において独立してはたらくことで抗がん剤の効果を低下させていることを発見した。後にKIAA1018欠失患者においても、本発見を支持する報告がなされている。これらの結果から、KIAA1018の酵素活性を阻害する薬品と抗がん剤の併用は、治療効果を改善することが期待できる。

以上の研究は抗がん化学療法的作用機序解明に貢献し、ファンコニ貧血などの遺伝性疾患の病態の理解に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成25年7月1日実施の論文内容とそれに関連した研究分野並びに学識確認のための試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降