

京都大学	博士（医 学 ）	氏 名	江 良 沙 穂
論文題目	The SUMO protease SENP1 is required for cohesion maintenance and mitotic arrest following spindle poison treatment (脱スモ化酵素 SENP1 は、紡錘体阻害剤処理時に、姉妹染色体結合の維持と分裂停止に必要である)		
(論文内容の要旨)			
タンパク質の翻訳後修飾の一つであるスモ化は、DNA修復や細胞分裂をはじめとする様々な生物学機能を制御することが知られている。このスモ化は可逆的な反応で、<u>Sen</u>trin-specific <u>Pro</u>tease (SENP)と呼ばれる脱スモ化酵素によってタンパク質から取り除かれる。セキツイ動物には、SEN1,2,3,5,6,7 の6つが存在する。中でも、SEN1は、前立腺がん、膀胱がん等で、高発現が報告されており、また腫瘍形成への関与が示唆されている。そこで、本研究では、SEN1 のゲノム安定性への関与を調べるため、遺伝子破壊が容易なニワトリリンパ球細胞DT40 を用い、<i>SEN1</i>^{-/-}株を作製し、表現型解析を行った。 <i>SEN1</i>^{-/-}株は、通常の培養条件下では、野生型と同様の増殖曲線を示したが、紡錘体阻害剤(spindle poison; SP)に、高感受性を示した。SPは、 姉妹染色体が均等に娘細胞に分配されるのに重要な紡錘体微小管の動原体への結合を阻害し、分裂停止を誘起する。また、ビノレスピン、タキソールなどのSPは、臨床で最もよく使われている抗がん剤の一つである。 SPを長時間処理した際の細胞周期をFACSにより調べたところ、<i>SEN1</i>^{-/-}株は、分裂停止を維持することができず、DNAの再複製等を経て、細胞死に至ることがわかった。 次に、SP処理時の姉妹染色体間の結合/距離を調べると、染色体腕部がX状に開いている割合が<i>SEN1</i>^{-/-}株において野生型に比べ有意に増加した。 <i>SEN1</i>^{-/-}株の姉妹染色体間の結合の異常とSPへ高感受性とに因果関係を調べるため、姉妹染色体間の距離を人工的な2つの方法で改善を試み、SPへの感受性が抑制されるか調べた。 1、トポイソメラーゼ2 α (Top2)の量が半分になった場合の影響 Top2 は、 DNA二重鎖切断を誘導・再結合を行うことで、DNA複製により生じる姉妹染色体間の“もつれ“を解くのに必須の酵素である。Top2 が半分になった場合、もつれを解く能力は低下するが、それにより姉妹染色体間の距離は縮まり、 <i>SEN1</i>^{-/-}株のSPへの感受性は抑制される可能性が考えられた。 TOP2^{+/-}株とTOP2^{+/-}SEN1^{-/-}株を作製し、感受性を調べたが、抑制は認められなかった。2、Plk1 やAuroraB阻害剤の影響 セキツイ動物において、SPを長時間処理した場合、Plk1 やAuroraBが姉妹染色体同士をつなぎ止めるタンパク質複合体であるコヒーシンを染色体腕部から剥がすことが知られている。そこで、その働きをそれぞれの阻害剤を同時に処理した場合のSPへの感受性を調べた。すると両者において感受性の抑制が認められた。 以上より、脱スモ化酵素 SENP1 が、SP 処理時に、姉妹染色体結合の維持と分裂停止に関与し、ゲノム安定性に寄与することが明らかとなった。SP は、有用な抗がん剤として使用されている一方、副作用や耐性出現などの多くの課題がある。本研究で、SEN1 が SP 感受性を決める新			

規因子であることを同定したことは、将来の新規抗がん剤開発に有用な情報を与えると期待できる。 (論文審査の結果の要旨) タンパク質 の 翻 訳 後 修 飾 の 1 つ で あ る SUMO (<u>S</u> mall <u>U</u> biq <u>u</u> itin- <u>l</u> ike <u>M</u> o <u>d</u> ifier) 化 は、細胞内の様々なプロセスの制御に関与する。SUMO化は可逆的な反応で、脱 SUMO 化 酵 素 (<u>sen</u> trin/SUMO-specific <u>p</u> rotease; SENP)により基質から取り除かれる。 近年、有糸分裂期(M期)に働く多くのタンパク質がSUMO化されることが報告されているが、SUMO化に加えSUMOを基質から剥がすことも機能的に重要であり、SENPの酵母ホモログUlp1 は、細胞周期 G2/M移行に必須で、Ulp2 は、微小管重合阻害剤に感受性を示す。ヒトで 6 つの遺伝子が存在するSENPファミリーの中で、特にSENP1 はβ-カテニン経路や低酸素誘導因子の制御を通じて腫瘍の悪性化に関与することから、我々はSENP1 がSUMO化レベルを制御することで、ゲノム安定性に重要な役割を果たすのではないかと考えた。しかし高等生物においてSENP1 遺伝子の役割(特に細胞周期)は殆ど不明であった。そこでSENP1 の機能解析のためにニワトリリンパ球細胞 DT40 においてSENP1 の遺伝子破壊株 (<i>SENP1</i> ^{-/-} 細胞)を樹立した。 <i>SENP1</i> ^{-/-} 細胞は野生型と同程度の増殖速度であったものの、微小管重合阻害剤に高感受性を示した。またその時の細胞周期を調べると、一旦のM期停止を経て <i>SENP1</i> ^{-/-} 細胞は野生型と比べ早期にM期を脱出した。それを引き起こす要因として、スピンドルチェックポイント維持の異常、または、それとは非依存的なM期の進行の亢進(例、APC/C複合体活性の亢進等)が考えられた。以上の研究によりSENP1 の発現が低下した癌細胞に対して微小管重合阻害剤が有効となり得る可能性が示唆された。 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 24 年 10 月 18 日 実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、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