

論文内容の要旨

論文提出者	(氏名) 力武 美保子
論文題目	MLH1-mediated recruitment of FAN1 to chromatin for the induction of apoptosis triggered by O ⁶ -methylguanine
(論文内容の要旨)	
【研究目的】	
<p>ミスマッチ修復(MMR)複合体依存アポトーシスは、発がん抑制の過程で重要な機能をもつ細胞応答である。我々はDNA上の修飾塩基O⁶-methylguanine (O⁶-meG) が引き起こすMMR依存アポトーシスの分子メカニズムを明らかにすることを目的として、MLH1と相互作用する因子であるFANCD2 and FANCI-associated nuclease 1 (FAN1)に着目した。本研究では、FAN1のMMR依存アポトーシス誘導への関与とその機能を明らかにすることを目的とする。</p>	
【材料および方法】	
<p>ヒト子宮頸がん由来HeLa細胞・骨肉腫由来U2OS細胞を用いて、FAN1および関連遺伝子のsiRNAによるノックダウンを行い、アルキル化剤(MNU)やマイトマイシンC(MMC)処理し薬剤感受性試験、フローサイトメーターによるSub-G₁細胞の出現解析、免疫沈降法や免疫染色法による複合体形成の確認、ウェスタンブロット法によるアポトーシスマーカーやDNA損傷応答解析を行った。</p>	
【結果】	
<p>FAN1はMMRタンパク質の1つであるMLH1ならびにMSH2と相互作用して、MNU依存的にFAN1-MMR複合体を形成した。FAN1ノックダウン細胞はMNUに対して抵抗性を示し、Casapse-9の活性化とPARP1の切断が減少してアポトーシス誘導が抑制された。また、ATR/CHK1、ATM/CHK2のリン酸化が低下しDNA損傷応答が抑制された。そして、FAN1はMLH1依存的(FANCD2非依存的)に損傷クロマチンに結合し、核内でMLH1ならびに一本鎖DNA(ssDNA)の指標となるBrdUと共局在した。BrdUシグナルはFAN1ノックダウン細胞において顕著に減少した。</p>	
【考察】	
<p>FAN1はO⁶-meGに起因するアポトーシス誘導経路において、MLH1との相互作用を介してDNA損傷部位に誘導され、FAN1-MMR複合体を形成し機能していることが示唆された。FAN1はそのヌクレアーゼ活性によりDNA損傷部位でssDNAを形成し、DNA損傷応答(ATR/CHK1、ATM/CHK2のリン酸化)の活性化を経て、アポトーシス誘導に関与すると考えられる。いままで報告されていたFANCD2が関与するDNA複製ストレス応答とは異なる新しい分子メカニズムで損傷DNA上に複合体を形成し機能すると考えられる。</p>	
【結論】	
<p>我々は、MMR依存アポトーシスに関わる新規因子としてFAN1を同定した。FAN1はMMRタンパク質の1つであるMLH1と直接相互作用し損傷部位へ集積してFAN1-MMR複合体を形成し、そのヌクレアーゼ活性によりssDNA形成することにより、アポトーシス誘導をしていることが明らかとなった。</p>	