

## 論 文 要 旨

|     |     |    |      |   |
|-----|-----|----|------|---|
| 区 分 | 甲・乙 | 氏名 | 森田 祥 | 印 |
|-----|-----|----|------|---|

FANCD2 counteracts  $O^6$ -methylguanine-induced mismatch repair-dependent apoptosis

FANCD2は $O^6$ メチルグアニンが引き起こすミスマッチ修復タンパクに依存するアポトーシスに対抗する  
研究目的

アルキル化剤はグアニン塩基上の酸素原子をメチル化し、 $O^6$ -メチルグアニンを形成する。これはシトシン以外にもチミンとも対合し、DNA修復の際に $O^6$ -メチルグアニン/チミンのミスマッチが形成される。ミスマッチ修復(MMR)複合体はこのミスマッチを認識し、アポトーシスを誘導する。このアルキル化剤(MNU)によるアポトーシスを研究する中で我々はFANCD2が反応し、修飾していることを確認したため、アポトーシス過程の中でFANCD2が重要な役割を担っているという仮説を立てた。

材料および方法

細胞はMGMT欠損ヒト子宮頸がん細胞株であるHeLa MRを使用し、CRISPR/Cas9を用いてFANCD2ノックアウト細胞(FANCD2-KO)を作製した。薬剤感受性試験は500個の細胞をMNUで処理した後、生存コロニーを数え、生存率を算出した。FANCD2のユビキチン化は免疫沈降法で確認を行なった。MNU処理後の各タンパク質の変化はウェスタンブロット法で確認を行った。タンパク質の局在は免疫蛍光法で確認を行い、S期で同調した細胞のリリース後の細胞周期進行はフローサイトメトリー分析で行なった。

結 果

FANCD2-KOはMNUに対して高い感受性を示し、この高感受性はMMRに依存するものだった。またFANCD2はアルキル化処理によってMMR複合体と共局在している事もわかった。MNUによるFANCD2-KOの細胞死の過程を調べるとsubG1の増加、Caspase9, PARP1の切断からアポトーシスによる細胞死である事がわかった。またウェスタンブロットの結果からチェックポイント応答に関わるATR/CHK1, ATM/CHK2の活性、FANCD2-KOでは相同組換え修復に関与するCtIPやRAD51が効率的にクロマチンにリクルートできなくなっていることがわかった。免疫蛍光法では53BP1の蓄積からDNA二本鎖切断が増加している事も確認できた。

考 察

FANCD2はMMRタンパクを介して傷ついたクロマチン上にCtIPとRAD51をリクルートすることにより、停止した複製フォークを保護するために必要であることを示唆している。MMRはDNA損傷した細胞をアポトーシスにより排除するのに対し、FANCD2は相同組換え修復に関わるタンパクをリクルートする事で細胞死を抑制していることが示唆された。この相反する対処の仕方を細胞がどのように行なっているかについてはさらに調べる必要がある。またテミゾロミドのようなアルキル化抗癌剤は神経鞘腫の治療に用いられるが、我々の結果はFANCD2を標的とする特異的阻害剤を用いることにより、薬剤の有効性を高められる可能性を示唆している。

結 論

FANCD2がMMRによる複製ストレス部位に相同組換え修復に関わるタンパクをリクルートすることで、 $O^6$ -メチルグアニンによって引き起こされるMMR依存性アポトーシスに対抗する重要な役割を果たしていることを示唆している。