

## 論 文 要 旨

区 分	甲・乙	氏名	上地 有香	印
-----	-----	----	-------	---

## Bloom syndrome DNA helicase mitigates mismatch repair-dependent apoptosis

## BLM ヘリカーゼはミスマッチ修復依存のアポトーシスを軽減する

## 研究目的

Bloom syndrome protein (BLM) はDNAヘリカーゼであり、DNA損傷時の相同組換え修復や、損傷により停止したDNA複製フォークの解消、姉妹染色分体間組換えの抑制などにかかわる。また、BLMはミスマッチ修復 (MMR) タンパク質や組換え修復タンパク質との相互作用が知られており、巨大なタンパク質複合体の一部を構成してDNA修復に関わると考えられるが、MMRとの相互作用の意義については明らかではない。そこで、本研究では、アルキル化剤N-メチル-N-ニトロソウレア (MNU) で引き起こされるMMR依存のアポトーシス誘導におけるMMR-BLM複合体の機能の解析を行った。

## 材料および方法

材料として、MGMT欠損のヒト子宮頸がん細胞株HeLa MRを使用し、CRISPR/Cas9法を用いてBLMノックアウト (KO) 細胞を作製した。MMRタンパク質とBLMのアルキル化損傷時の相互作用を解析するため、免疫沈降 (IP)、免疫染色、および近接ライゲーションアッセイ (PLA) を行った。HeLa MR細胞とBLM-KO細胞のMNU処理後の生存率をコロニー形成アッセイにて解析した。また、BLM-MMR複合体の詳細な機能を調べるため、ダブルチミジンプロック法にて細胞をS期に同調し、MNU処理後のBLMノックアウトのチェックポイント誘導およびアポトーシスにおける経時的な影響をフローサイトメトリー、ウェスタンブロットおよび免疫染色にて調べた。

## 結 果

本研究では、MNU処理によってBLMとMMRの相互作用が強まり、両タンパク質が核内で共局在することを観察した。BLM-KO細胞では正常細胞と比較して、アルキル化剤に対して高感受性を示した。BLM-KO細胞はMNU処理後、アポトーシス誘導を示すcaspase-9とPARP1の切断が亢進し、これはフローサイトメトリー解析によりsub-G1期の細胞が蓄積したと一致した。また、MNUで処理したBLM-KO細胞では、ATR/CHK1キナーゼとATM/CHK2キナーゼが関与するDNA損傷応答において、それぞれのタンパク質のリン酸化による活性化がみられた。さらに、53BP1 fociの増加、H2AXのS139およびRPA32のS8におけるリン酸化が観察され、DNA二本鎖切断の蓄積を示した。

## 考 察

BLMはMMR複合体と相互作用を介して損傷クロマチン上に結合し、MMR依存のDNA損傷応答の過程で二本鎖切断の蓄積を防ぐ役割を果たし、O<sup>6</sup>-メチルグアニンによって引き起こされるアポトーシス誘導を軽減することを示唆している。この結果は、BLMの機能がアルキル化剤によって損傷した細胞のアポトーシス誘導に影響を及ぼす可能性があることから、BLMが抗がん剤を用いたがん治療の標的として有用である可能性を示唆している。

## 結 論

BLMがMMRの相互作用を強め、MMR依存のDNA損傷応答の過程で二本鎖切断の蓄積を防ぐ役割を果たし、それによるアポトーシス誘導を軽減することが示唆された。