

【別紙 2】

## 審査の結果の要旨

氏名 堀江 弘二

固形癌に於いて臨床的有用性が認められる抗腫瘍剤 Camptothecin (CPT)の暴露に於いて、細胞内でその target である DNA topoisomerase1 (Topo1)と ubiquitin 様蛋白の一つである SUMO-1 との結合(sumoylation)という現象が認められているが、その生物学的意義については細胞の CPT 耐性に関与することが推定されているに過ぎず詳細は明らかでない。本研究では確立された固形癌細胞系に外因性に Topo1, SUMO-1 を発現させる実験系を作成、Topo1 に変異を導入することで Topo1-sumoylation の意義の解明を試み、下記の結果を得た。

1. Topo1 に於いて SUMO-1 蛋白結合部位となりうる複数のリジン残基に変異を導入、複数のヒト細胞株内での CPT 依存性 sumoylation を検討し、117 番目及び 153 番目のリジン変異 Topo1(Topo1 KR mutant)に於いて sumoylation が減弱していることを見出した。117 番目のリジン変異 Topo1(K117R Topo1)では単一の変異により複数の SUMO-1 蛋白結合が強く抑制された。これらのリジン変異 Topo1 では ubiquitin との結合には変化を認めなかった。これらの結果から 117 番目のリジンがヒト Topo1 における主要な SUMO-1 修飾部位であることが示された。
2. Wild-type Topo1 と K117R-Topo1 について、in-vitro の系に於いて Topo1 の酵素活性である DNA relaxation 活性、及び CPT による DNA relaxation 活性阻害を検討し両者に差を認めなかった。また K117R-Topo1 導入細胞の免疫染色に於ける検討では、K117R-Topo1 の細胞内局在（核移行）は Wild-type-Topo1 と明らかな差を認めなかった。これらの結果から Topo1 の SUMO-1 蛋白との結合は Topo1 の酵素活性自体や細胞内局在（核移行）ではない機能を担っていることが強く示唆された。
3. In-vivo Conjugation of Topoisomerase (ICT) bioassay に於いて、CPT 暴露に依存して DNA に結合・安定化する Topo1(cleavable complex)の量変化を Wild-type Topo1 と K117R-Topo1 について検討し、K117R mutant Topo1 では wild-type に比べ、CPT 処理後に形成される cleavable complex 量が少ない結果が得られた。また wild-type Topo1

の cleavable 形成量は、Topo1-sumoylation に同調して増減することが明らかとなった。

これらの結果から Topo1 の sumoylation は CPT により誘導される cleavable complex 形成に促進的に作用することが示された。

4. mutant Topo1 の sumoylation 実験に於いて、Topo1 の活性中心である 723 番目のチロシンに変異を導入すると CPT 非依存性に SUMO-1 修飾を強く受けることを見出した。活性中心の mutant は topoisomerase としての活性を失い cleavable complex を形成しないことから、topoisomerase 活性消失自体が Topo1-sumoylation の契機となっている可能性が示唆された。
5. Wild-type Topo1 と K117R-Topo1 導入細胞に於いて CPT による細胞死を検討したところ、SUMO-1 蛋白の結合が強く抑制された K117R-Topo1 導入細胞では CPT による細胞死 (apoptosis) が Wild-type Topo1 導入細胞より減少した。この結果から Topo1-sumoylation は cleavable complex 形成増加を通して、CPT による細胞死に促進的に作用することが強く示唆された。

以上、本論文は Topo1 に於ける主要な SUMO-1 蛋白修飾部位が K117 であり、K153 を含む複数箇所での sumoylation を制御していることを明らかにし、また Topo1-sumoylation が細胞内で Topo1 の DNA への recruitment を制御し、cleavable complex 形成に促進的に作用して CPT 感受性を増強する機構であることを示した。これによって今まで未知であった Topo1 の sumoylation の意義が Topoisomerase inhibitors による DNA damage を正に制御し得る機構にあることを示し、同種の薬剤の抗腫瘍活性を検討するにあたり重要な要因であることを示唆すると考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。