

審査の結果の要旨

氏名 北川 大 樹

遺伝情報の維持・伝播において重要な役割を担う DNA は、様々な内的、外的要因によって常に損傷を受けている。DNA の損傷部位は通常、DNA 修復因子群により修復され細胞の恒常性は維持される。しかし、過度の DNA 損傷を受けた細胞はアポトーシス誘導される。これは、DNA 損傷を修復しきれずに過った遺伝情報を持つ危険性のある細胞を除去するシステムと考えられ、細胞の癌化を防ぐという意味でも非常に合理的である。MAP キナーゼファミリーに属する SAPK/ JNK は物理化学的ストレスや炎症性サイトカインなどにより活性化され、アポトーシス誘導に深く関与することが示唆されている。DNA 損傷時にも細胞質中の JNK は活性化されるが、核からどのような分子機構を介して JNK が活性化されるのかは不明であった。「DNA 損傷により誘導される SAPK/JNK 活性化の分子機構の解析」と題する本論文においては、DNA 損傷により誘導される持続的な JNK 活性化が、核内に局在する DAXX 及び癌抑制遺伝子である Rassf1C により制御されていることを示し、DNA 損傷時におけるアポトーシス誘導の分子基盤に関して考察を加えている。

1. DNA 損傷による DAXX の分解は JNK の持続的な活性化を制御する

紫外線 (UV) や DNA のアルキル化試薬である methyl methane sulfonate (MMS) などによる DNA 損傷は、JNK を持続的に活性化してアポトーシスを誘導することが示唆されている。DNA 損傷時のアポトーシス誘導において核内サブドメインである PML body が重要な役割を果たすことから、PML body に局在する分子の JNK 活性化に与える影響を検討した。その結果、PML 結合因子である DAXX を過剰発現させた場合に、UV、MMS による JNK 活性化が顕著に抑制されることを見出した。さらに、DNA 損傷時には DAXX がユビキチン化を受けてプロテアソームにより分解されることを明らかにし、DAXX の量的変化が JNK の持続的な活性化に関与することを示した。

2. Rassf1C は DAXX と結合して核内 PML body に局在する

DAXX に結合し、JNK の活性化に影響を及ぼす因子のスクリーニングを行い、癌抑制遺伝子である Ras association domain family 1 C (Rassf1C) を同定した。哺乳類動物細胞内での結合を検討し、Rassf1C が DAXX の N 末端領域で結合することを明らかにした。次に、DAXX と Rassf1C の細胞内局在を観察したところ、核内の PML body で共局在することが観察された。UV、MMS 刺激時には DAXX がユビキチン化され分解されることを示したが、Rassf1C に結合している DAXX の量も減少していた。さらに、核画分中に

存在する Rassf1C 量は UV、MMS 刺激によって減少し、この減少は DAXX を過剰発現させることによって抑制された。共焦点顕微鏡による観察でも、PML body に局在していた Rassf1C が核内から消失していく様子が観察された。以上の結果は、定常状態においては DAXX が Rassf1C と結合して PML body に共局在し、UV、MMS 刺激により DAXX が分解されることで Rassf1C が核内から核外に移行していく可能性を示唆している。

3. Rassf1 は H-Ras と結合して DNA 損傷による JNK 活性化を制御する

Rassf1 を RNAi により発現抑制した際の DNA 損傷による JNK の活性化状態を観察した。その結果、Rassf1 を発現抑制することで UV、MMS により誘導される JNK の活性化が顕著に抑制され、DNA 損傷による JNK 活性化の上流には Rassf1 が介在することが示された。Rassf1 は Ras 様蛋白質と結合し得る domain 構造を有している。そこで、JNK の上流因子として知られる各種 Ras family 分子との結合を検討した。その結果、Rassf1 が H-Ras、K-Ras に結合すること、また GDP 型と比較して GTP 型の H-Ras、K-Ras により強く結合することを見出した。さらに、GDP 型 H-Ras の過剰発現によって UV、MMS 刺激による JNK 活性化は抑制された。この結果は H-Ras が DNA 損傷による JNK 活性化の上流に介在していることを示しており、Rassf1/H-Ras 複合体が JNK 活性化を制御していることを示唆している。

4. DAXX 及び Rassf1 の DNA 損傷によるアポトーシス誘導における役割

これまでに示してきた DNA 損傷による JNK 活性化の上流に介在する DAXX 及び Rassf1 がアポトーシス誘導にどのように関与するかを検討した。その結果、Rassf1 RNAi により発現抑制すると、UV、MMS 刺激による caspase の活性化が抑制された。さらに、DAXX の過剰発現でも、caspase の活性化が抑制された。以上の結果は DNA 損傷によるアポトーシス誘導に対して Rassf1 は正に、DAXX は負に制御していることを示唆している。

以上の結果から、DNA 損傷により誘導される JNK の持続的な活性化を促す分子機構として、以下に示すモデルが提示できた。1) DNA 損傷が誘発されると核内 PML body に存在する DAXX がユビキチン化を受けて分解される。2) 結合していた Rassf1 が核内から核外へ移行する。3) 細胞質で Rassf1 は活性化された H-Ras と複合体を形成する。4) Rassf1-H-Ras 複合体からのシグナルを受けて、JNK は持続的に活性化し、アポトーシスが誘導される。本モデルは、今まで不明であった DNA 損傷による JNK 活性化に介在する核内から細胞質へのシグナル伝達経路を初めて明らかにするものである。以上の研究成果は、DNA 損傷によるアポトーシス誘導の分子基盤の理解に有用な知見を提供しており、博士（薬学）の学位として十分な価値があるものと認められる。