

論文審査の結果の要旨

氏名 朴 鍾圭

本論文は3部から構成されており、第1部はアセチル基転移酵素ARD1がDNA損傷により誘導されるNF- κ B活性化経路に特異的に関与すること、第2部ではARD1のN末端に存在する核内移行シグナルがNF- κ B活性化に必須であること、第3部ではARD1のアセチル基転移酵素活性が活性化に必要であることについて述べられている。

本論文第1部では、NF- κ Bのレポーターアッセイの系を用いて、アセチル基転移酵素ARD1のNF- κ Bに及ぼす影響を調べた。NF- κ B活性化経路には古典的経路とDNA損傷性経路の異なる経路が存在する。siRNAを用いて内在性のARD1の発現を抑制すると、古典的経路には影響を及ぼさなかったのに対して、DNA損傷性経路においてARD1の発現低下に比例してNF- κ B活性化が低下することを見出した。逆にARD1を過剰発現させた細胞では、古典的経路には影響を及ぼさないのに対して、DNA損傷性経路においてNF- κ Bの活性化を強く増強した。このことから、ARD1はDNA損傷性経路に特異的に関与する鍵分子である可能性が示唆された。NF- κ B古典的活性化経路ではTNF α などのサイトカインが細胞外から作用して最終的に転写因子NF- κ Bに支配される遺伝子領域の転写を促進するのに対して、DNA損傷性経路では紫外線、薬剤、酸化ストレスなどによるゲノムの二重鎖断裂が引き金になっている。そのため、核内で起こったDNA損傷というシグナルが細胞質に伝えられるメカニズムは古典的経路には存在せず、これに関する情報は皆無に等しかった。朴は免疫沈降法を用いて、ARD1と相互作用する分子として、RIP1という古典的経路に関与する分子を新たに同定した。この相互作用が古典的経路とDNA損傷性経路を最終的に1つのNF- κ B活性化という同一の反応に導くものと考え、ARD1とRIP1の相互作用をさらに詳細に解析を行った。ARD1の各ドメインを欠損させた変異体を細胞に発現させ、RIP1との相互作用を免疫沈降によって調べた結果、RIP1との相互作用にはARD1のアセチル基転移酵素ドメインを介していることが明らかになった。次に、この相互作用がDNA損傷性NF- κ B活性化

に必要な否かを検討したところ、ARD1のアセチル基転移酵素ドメインを欠損したARD1はNF- κ B活性化を増強することはできなかった。さらにARD1のN末端ドメインを欠損した変異体は、RIP1との結合能を保持しているにも拘わらず、DNA損傷性NF- κ B活性化を増強しなかった。

これらARD1の変異体の実験結果を受けて、第2部ではARD1のN末端ドメインのDNA損傷性NF- κ B活性化における役割について詳細な検討をした。上記のようにARD1のN末端ドメインを欠損した変異体は、NF- κ B活性化を増強することはできなかった。そこで、種々のARD1変異体の細胞内局在を調べたところ、ARD1は経時的に細胞質から核内への移行が観察されたが、N末端ドメインを欠損したARD1変異体は核への移行が認められず、細胞質に留まっていた。このARD1変異体はRIP1との結合能を保持していることを考え合わせて、ARD1のN末端領域に核内移行シグナル配列が存在すること、このシグナルが欠損することによりRIP1を核内に輸送できないこと、RIP1の核移行を阻害することによりDNA損傷性NF- κ B活性化の増強ができないことを明らかにした。

第3部では、ARD1のアセチル基転移酵素ドメインを欠損したARD1変異体が、DNA損傷性NF- κ B活性化の増強ができないことについて記述されている。ARD1のアセチル基転移酵素ドメインには、文字通りアセチル基転移酵素活性部位を含んでいるほかに、核内移行シグナル配列も含まれているのではないかという報告もある。そこで、この欠損変異体ではいずれの機能が活性化に寄与しているかを結論できないために、新たに酵素活性のみを欠損したARD1変異体R82A/G85Aを作成し、アセチル基転移酵素活性の寄与について調べた。この変異体は正常に核移行できることを確認した上で、DNA損傷性NF- κ B活性化に及ぼす影響を過剰発現によって調べたところ、野生型とは異なり、何ら影響を及ぼさなかった。この結果からARD1によるアセチル化がこの経路の活性化に必須であることが示された。

以上の一連の結果をまとめた本論文の内容は、金山敦宏、宮本有正、山本一夫の指導の下に研究を遂行したが、論文提出者が全面的に主体となって実験・解析および考察を行ったものであり、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（生命科学）の学位を授与できると認める。