

氏名	金子 悠太		
学位の種類	博 士 (農学)		
学位記番号	博 甲 第 7768 号		
学位授与年月日	平成 28年 3月 25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Studies on Molecular Basis for FOXO1-DNA Damage Responses (FOXO1-DNA 損傷応答の分子機能に関する研究)		
主査	筑波大学教授	農学博士	深水 昭吉
副査	筑波大学教授	農学博士	馬場 忠
副査	筑波大学准教授	博士 (薬学)	木村 圭志
副査	筑波大学講師	博士 (農学)	大徳 浩照

論 文 の 要 旨

フォークヘッド型転写因子 FOXO は、糖代謝、酸化ストレス耐性などの生体反応において重要な役割を担っている。線虫やマウスなどのモデル生物において、DAF-16/FOXO は寿命制御、発生、がん抑制などに関与することが示されているが、それらの根底にある分子メカニズムは未解明である。

多くの細胞は、紫外線などの複製ストレスに対して、損傷乗り越え DNA 複製 (Translesion DNA synthesis: TLS) やチェックポイント応答機構により、ゲノムの安定性を保っており、これらは複製ストレス応答と総称される。複製因子クランプローダーの一つ CTF18 は、PCNA ローダーと姉妹染色体の接着因子としての機能に加え、酵母や *in vitro* の解析により、CTF18 が上述の複製ストレス応答を活性化することが報告されている。DNA 損傷応答の中でも高度に複雑化された複製ストレス応答は、ゲノム安定性の維持に必須であるとともに、その破綻は早期老化や発達異常、高発がん性に関連することが示唆されている。以前、著者の研究室は、FOXO1 をノックダウンした哺乳類培養細胞は特に DNA 合成期 (S 期) に顕著な紫外線感受性を示すことを見出した。そこで著者は、老化や発生などの生命現象における FOXO1 の分子メカニズムとして複製ストレス応答に着目し、DAF-16/FOXO と TLS の関連の検証および複製ストレス応答における CTF18 の制御機構の解析を行った。

S 期に紫外線を照射した Pol η と FOXO1 の両ノックダウン細胞において、複製ストレス応答の指標である CHK1 Ser345 のリン酸化レベルを検出した結果、リン酸化レベルの顕著な亢進が見られた。転写因子である FOXO1 は TLS 関連因子の転写を調節し、TLS に関与すると予想されたが、FOXO1

の発現抑制は関連因子の発現量に影響を与えず、一方で、FOXO1 は DNA 損傷応答因子の足場となる 1 本鎖 DNA 結合タンパク質の RPA と結合した。線虫を用いた *in vivo* の解析により、幼虫期の *daf-16* 変異体は *pol η* 変異体と同様に UV 照射後、成長遅延を呈することが明らかとなった。さらに、トランスジェニックレスキュー線虫の解析により、この幼虫期の UV 耐性における DAF-16 の機能は、転写活性化能非依存的である一方で、RPA との結合を必要とすることが示唆された。

CTF18 の制御機構解明のため、DNA 代謝のプラットフォームとして働く RPA 複合体との相互作用を検討した。その結果、CTF18 が RPA 複合体と物理的に相互作用することを見出した。さらに、近傍の二分子間相互作用を検出する *in situ* Proximity ligation assay (*in situ* PLA)により、複製ストレスによって RPA-CTF18 のクロマチンでの相互作用が誘導されることを明らかにした。

審 査 の 要 旨

FOXO/DAF-16 は種を越えて老化、発生、がん抑制などの生理的現象に関与することが示されているが、その分子メカニズムは未だ明らかとなっていない。早老症、発達異常、腫瘍形成などを特徴とするいくつかの遺伝病の原因遺伝子は、複製ストレス応答に関連する因子であることが報告されている。著者は、複製ストレス応答と FOXO の生理的機能の相関に着目し、両者の関連と複製ストレス応答因子 CTF18 の制御機構を解析した。

哺乳類培養細胞を用いた解析により、FOXO1 が複製ストレス応答のうち損傷乗り越え DNA 複製 (TLS) に関与することが示唆された。また線虫を用いた遺伝学的な解析により、DAF-16 は、TLS に関与することで紫外線照射後の幼虫期の発達に貢献していることが明らかとなった。これらの FOXO1/DAF-16 の機能には自身の転写活性化能を必要とせず、DNA 代謝の足場タンパク質である RPA との結合が必要と有り、FOXO の新たな機能を示した興味深い知見である。また、*in situ* PLA により、CTF18 と RPA の相互作用が複製ストレス後、クロマチンで誘導されることを見出した。この研究は、CTF18 の制御機構の糸口を提案するのみならず、複製ストレスに応答した RPA の機能の重要性に改めて焦点を当てている。

今日まで、FOXO の標的遺伝子の網羅的探索など転写に関する解析は数多くなされてきたが、それらの研究は FOXO の生理的機能の全貌を説明するまでに至っていない。FOXO-RPA 間相互作用の機能について更なる解析が必要とされるが、本研究は、複製ストレス応答における RPA と協調した FOXO の新機能を示唆しており、それが FOXO の多様な生理機能の一部を担っている可能性を期待させる。

平成 28 年 1 月 18 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員の出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有する者として認める。