

別記様式第 6 号（第 16 条第 3 項，第 25 条第 3 項関係）

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	福戸 敦彦
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目			
<p style="text-align: center;">SUMO modification system facilitates the exchange of histone variant H2A.Z-2 at DNA damage sites (SUMO 化修飾システムは DNA 損傷部位における ヒストンバリエント H2A.Z-2 の交換反応を促進する)</p>			
論文審査担当者			
主 査	教 授	松 浦 伸 也	印
審査委員	教 授	稲 葉 俊 哉	
審査委員	講 師	越 智 秀 典	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>DNA 二本鎖切断は最も重篤な DNA 損傷である。DNA 損傷修復のエラーは遺伝情報の変異をもたらす腫瘍化の原因となる。DNA 損傷の修復は、ヒストンの翻訳後修飾や交換反応によるクロマチン構造の再構成により促進される。哺乳類では、DNA 二本鎖切断部位において NuA4 複合体が H2A とそのバリエントである H2A.Z の交換を促進することが知られている。H2A.Z は酵母からヒトまで進化的に高度に保存されているヒストンバリエントであり、脊椎動物では H2A.Z-1 と H2A.Z-2 という二つのアイソフォームが同定されている。また DNA 二本鎖切断を誘導直後に、H2A.Z-2 が DNA 二本鎖切断部位で交換されることが知られているが、その制御の分子機構については未だ不明である。ヒストンの翻訳後修飾の一つである SUMO 化は細胞周期、転写および DNA 修復に関与している。哺乳類では SUMO タンパク質が DNA 二本鎖切断部位に集積することが知られており、また酵母では、修復されずに残存した DNA 二本鎖切断を核周縁部へ移動するのに H2A.Z の SUMO 化が必要であることが示されている。しかし SUMO 化システムと DNA 損傷部位における H2A.Z-2 の交換反応の関係は不明であった。</p> <p>本研究では、ヒト H2A.Z-2 が DNA 損傷によって SUMO 化修飾を受けるかどうか調べるため、まず FLAG-HA タグで標識された H2A.Z-2 を安定発現するヒト HeLa 細胞株を樹立した。この細胞に放射線を照射し、その核抽出物から H2A.Z-2 タンパク質複合体を精製した。抗 H2A.Z 抗体と抗 SUMO1 抗体を用いてウェスタンブロット法で解析したところ、H2A.Z-2 は DNA 損傷依存的に SUMO1 によるモノ SUMO 化修飾を受けることが判明した。SUMO1 の DNA 損傷部位への集積には SUMO E3 リガーゼである PIAS4 が必要であることが報告されている。PIAS4 の H2A.Z-2 の SUMO 化への関与を検討するため、まず H2A.Z-2 タンパク質複合体について抗 PIAS4 抗体を用いたウェスタンブロット法で解析したところ、H2A.Z-2 が PIAS4 と相互作用し、その相互作用は放射線照射により増強することが明らかとなった。ついで、PIAS4 が H2A.Z-2 を DNA 損傷依存的に SUMO 化するか確認するため、shRNA 法により PIAS4 の発現を抑制した HeLa 細胞株を樹立した。この細胞についてウェスタンブロット法を用いたところ、PIAS4 の発現抑制により放射線照射後の H2A.Z-2 の SUMO 化が著明に抑制されることが示された。この結果から DNA 損傷による H2A.Z-2 の SUMO 化は主に PIAS4 によることが示された。次に、H2A.Z-2 の DNA 二本鎖切断部位における交換反応に H2A.Z-2 の SUMO 化がこの関わっているかを検討するため、GFP で標識した H2A.Z-2 を発現し、かつ同時に SUMO E3 リガーゼである PIAS1 もしくは PIAS4 を shRNA 法により発現抑制した細胞を樹立した。これらの細胞を用いて、光褪色後蛍光回復(FRAP)法と紫外線局所照射を組み合わせた実験系により DNA 損傷部位への H2A.Z-2 の取り込みを解析した。コントロール shRNA を導入した細胞や PIAS1 の発現抑制細胞では紫外線照射した部位で退色した</p>			

GFP の蛍光のすばやい回復がみられたが、PIAS4 の発現抑制細胞では蛍光の回復が有意に抑制された。これらの結果から PIAS1 ではなく PIAS4 が DNA 損傷部位への H2A.Z-2 の取り込みを促進することが示された。次にこれらの細胞に対して inverse FRAP 法と紫外線局所照射を組み合わせた実験を行った。コントロール shRNA を導入した細胞では紫外線照射した部位で退色させなかった部位における GFP の蛍光強度の減弱が認められたが、PIAS4 の発現抑制細胞では蛍光強度の減弱はほとんどみられなかった。これらの結果から、PIAS4 が損傷クロマチンからの H2A.Z-2 の放出を促進していることが示された。これら FRAP 法と inverse FRAP 法を用いた実験結果から、DNA 損傷部位での H2A.Z-2 の交換反応は PIAS4 による H2A.Z-2 の SUMO 化が制御していることが強く示唆された。

本研究により、ヒト細胞において H2A.Z-2 が DNA 損傷依存的に SUMO 化されること、またその反応は PIAS4 が促進すること、さらに PIAS4 は、DNA 損傷部位での H2A.Z-2 の交換反応の制御に関わっていることが示された。これらの知見により、ゲノム損傷部位における高次クロマチン構造再構築の分子機構の一端が明らかになった。よって、審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。

別記様式第7号（第16条第3項関係）

最終試験の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（ 医学 ）	氏名	福戸 敦彦
学位授与の条件	学位規則第4条第①・2項該当		
論文題目			
<p style="text-align: center;">SUMO modification system facilitates the exchange of histone variant H2A.Z-2 at DNA damage sites (SUMO 化修飾システムは DNA 損傷部位における ヒストンバリエント H2A.Z-2 の交換反応を促進する)</p>			
最終試験担当者			
主 査	教 授	松 浦 伸 也	印
審査委員	教 授	稲 葉 俊 哉	
審査委員	講 師	越 智 秀 典	
〔最終試験の結果の要旨〕			
判 定 合 格			
<p>上記3名の審査委員会委員全員が出席のうえ、平成30年1月4日の第72回広島大学研究科発表会（医学）及び平成30年1月9日の本委員会において最終試験を行い、主として次の試問を行った。</p>			
<ol style="list-style-type: none"> 1 SUMO 化修飾による損傷依存的 H2A.Z-2 交換反応のメカニズムについて 2 PIAS4 による H2A.Z-2 の SUMO 化修飾の生物学的意義について 3 H2A.Z-2 の SUMO 化修飾機構について 4 SUMO 化修飾機構の損傷部位への集積のメカニズムについて 5 H2A.Z-2 が関連する疾患について 			
<p>これらに対して極めて適切な回答をなし、本委員会が本人の学位申請論文の内容及び関係事項に関する本人の学識について試験した結果、全員一致していずれも学位を授与するに必要な学識を有するものと認めた。</p>			