

ゲノム安定性に関わる新規ヒト遺伝子の同定と機能解析

[1] 組織

代表者：長瀬 隆弘

(かずさ DNA 研究所)

対応者：安井 明

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

小澤 馨史 (かずさ DNA 研究所)

研究費：物件費 13 万 9 千円，旅費 5 万 1 千円

[2] 研究経過

本研究は過去 2 年間行ってきた共同研究の継続課題という位置づけである。特に DNA 修復に関わる蛋白質因子を同定するために、核内蛋白質やクロマチンリモデリング因子などのタグ付き蛋白質発現クローンを作製し培養細胞を用いた実験を行った。具体的には UVA レーザ照射により誘発した DNA 損傷部位へのタグ付き蛋白質の集積を指標として、DNA 修復に関連する候補蛋白質をスクリーニングしてきた。これまでに DNA 損傷部位に集積する 20 種類の候補遺伝子を同定した。今年度はその中で特に転写抑制因子と考えられている KRAB-ZNF ファミリーの ZNF500 について機能解析を進めた。

以下、研究活動状況の概要を記す。

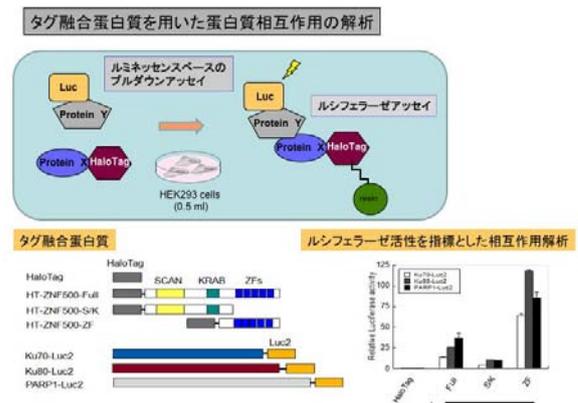
研究打ち合わせの開催状況

平成 22 年 9 月 3 日 14:00-17:00 (加齢研究所)

平成 23 年 2 月 24 日 14:00-17:00 (加齢研究所)

タグ付き蛋白質は、蛋白質の N 末端側に HaloTag と呼ばれる蛋白質タグを融合させたものであり、このタグはハロアルカンと速やかに共有結合する活性を有する。蛍光団やビーズなどの機能分子をハロアルカンと結合させた様々なリガンドを用いることにより、1 つのタグ融合蛋白質コンストラクトで細胞内イメージング、同定や精製などの蛋白質機能解析が簡便に行える。培養細胞内で発現させたタグ融合蛋白質の DNA 損傷部位への集積は、TMR で蛍光標識した蛋白質を用いて行った。さらにセファロースビーズの結合したリガンドを用いて培養細胞内で発現させた HaloTag 融合 ZNF500 を特異的にプル

ダウンして複合体形成している蛋白質群を回収した。回収した蛋白質を SDS-PAGE で分離したのちに LC-MS の質量分析により複合体形成蛋白質の同定を行った。ZNF500 との特異的複合体形成能を検証するために、同定された蛋白質を含むいくつかの候補遺伝子についてルシフェラーゼ融合蛋白質発現クローンを作製しルミネッセンススペースのプルダウンアッセイを行った。さらに加齢研では、ZNF500 を RNAi でノックダウンした細胞を用いた非相同末端結合実験を行い ZNF500 の DNA 損傷修復に関わる可能性を示した。



[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

DNA 損傷部位に集積する候補遺伝子の中で ZNF500 に注目した理由の 1 つは、転写抑制因子である KRAB-ZNF ファミリーの多くが KAP1 コリプレッサーを介して転写抑制機能を発揮するなかで、ZNF500 が KAP1 非依存的転写抑制をする異質な因子であること見だしていたことであった。この ZNF500 の機能推定に役立つ情報を得るために、ZNF500 と複合体を形成する蛋白質の同定を行った。具体的には、培養細胞内で発現させた HaloTag 融合 ZNF500 のプルダウン実験と質量分析による解析によって ZNF500 と複合体形成する Ku70、Ku80 や PARP1 などの DNA 修復に関わる候補遺伝子を同定した。さらにそれらのルシフェラーゼ融合蛋白質発現クローンを作製し、HaloTag 融合 ZNF500 と

培養細胞内で共発現させ、特異的にプルダウンしてきた ZNF500 に結合する蛋白質のルシフェラーゼ活性を測定することにより相互作用の確認実験を行った(ルミネッセンスベースのプルダウンアッセイ)。また、ZNF500 については、その全長、SCAN-KRAB ドメインおよび Zinc フィンガードメインについて解析を行い、相互作用がどの領域で行われているか特定した。ZNF500 は KAP1 以外のどのようなコリプレッサーと結合し、転写抑制活性を示すか不明であったが、Ku70 が SMRT コリプレッサーと結合するという報告から、SMRT と ZNF500 との相互作用を解析した結果、SMRT が ZNF500 の SCAN ドメインを介して結合していることが明らかとなった。さらに、ZNF500 が転写抑制に関与する SETDB1、HDAC1 や HP1 α と結合することも明らかにした。SMRT は核内受容体や他の多くの転写因子に関連するコリプレッサーであるが、二重鎖 DNA 切断の修復にも重要な役割を果たしているという報告もある。安井教授らによる ZNF500 のノックダウン実験では、二重鎖 DNA 切断の非同末端結合活性が低下する結果が得られた。このようなことから ZNF500 の転写抑制活性や DNA 修復活性に関わる SMRT の役割について今後のさらなる詳細な解析が期待される。

(3-2) 波及効果と発展性など

DNA 損傷部位に集積する新たな蛋白質をスクリーニングした中で、転写抑制機能をもつ ZNF500 が候補遺伝子として同定され、実際にいくつかの DNA 損傷修復に関連する因子と複合体を形成することを明らかにした。さらにこの ZNF500 は KAP1 依存の転写抑制ではなく、DNA 修復に関与するという報告がある SMRT コリプレッサーと協調して働くことを明らかにした。近年、ゲノムの複製、転写や修復などが共役して働き、さまざまな生命現象に関与していると考えられている。本研究は、当該分野に DNA 損傷修復と転写抑制に関して新たな関係を示すデータを提供できる可能性が高い。また、基礎研究にとどまらず、DNA 修復関連因子として同定されたこれら蛋白質の機構解明が、癌を含む様々な疾患に対する診断法の開発や創薬のための貴重な情報を提供することから、今後の研究の発展が期待される。

[4] 成果資料

本共同研究に関する研究成果について論文発表準備中であるが、現時点での発表論文はなし。