

## ヒト OXR1 タンパク質のゲノム情報安定化における 生理学的機能の解明

### [1] 組織

代表者：橋口 一成  
(京都大学大学院理学研究科)

対応者：安井 明  
(東北大学加齢医学研究所)

分担者：  
菅野 新一郎 (東北大学加齢医学研究所)  
秋山 秋梅 (京都大学大学院理学研究科)

研究費：物件費18万7千円、旅費0円

### [2] 研究経過

OXR1 (*oxidation resistance-1*) は真核生物において高度に保存された遺伝子であり、2000年に Volkert らによりクローニングされた (Volkert *et al.*, *PNAS*, 2000)。その遺伝子産物については、生物種を超えて C 末端の TLD ドメインが高度に保存されている点が特徴的である。また酵母欠損株の表現型解析から酸化ストレスに対する防御機構に寄与すると推測されているが、生理機能は不明である。しかし最近、過酸化水素処理により、OXR1 タンパク質 TLD ドメイン断片内のシステイン残基が酸化されることが報告されており、OXR1 タンパク質の酸化ストレス防御における重要性が注目されている。

これまでに本研究代表者らは、OXR1 タンパク質が細胞質局在すること、多量体形成すること、遺伝子欠損がゲノム不安定性を引き起こすことを明らかにしてきた。平成23年度の本共同研究においても、引き続き、OXR1 遺伝子産物の生理機能解明を目指して研究を行った。

以下、研究活動状況の概要を記す。本研究目標達成のため、まず、OXR1 タンパク質の複合体を細胞抽出液から精製し、OXR1 結合タンパク質の同定を行った。京都大学において発現プラスミドの構築を行い、東北大学において安定発現ヒト培養細胞株の取得、細胞の大量培養、調製した細胞抽出液から OXR1 の複合体精製、その構成因子の質量分析を行った。また細胞内局在解析は、京都大学において、蛍光顕微鏡観察、ウェスタンブロット解析により行った。

研究打ち合わせは主として電子メールにより行った。

### [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。

まず第1に、OXR1 タンパク質複合体構成因子の同定を行った。昨年度は OXR1 タンパク質全長の複合体解析を行ったが、本年度は C 末端 TLD ドメインのみを発現させたタンパク質 (OXR1-C) の複合体解析も併せて行った。その結果、全長タンパク質、OXR1-C とも、セリンチロシンタンパク質リン酸化酵素 NDR1 及び熱ショックタンパク質 HSP70 が複合体に含まれる可能性が高いことがわかった。

第2に、内在性 OXR1 タンパク質の細胞内局在解析を行った。これまでに免疫染色法、及び細胞分画法により OXR1 タンパク質の細胞質局在を明らかにし、その局在が細胞質内に糸状構造を呈することがわかった。本年度は細胞周期と局在変化を解析したところ、間期で糸状構造である OXR1 タンパク質が、分裂期ではドット状構造を形成することがわか

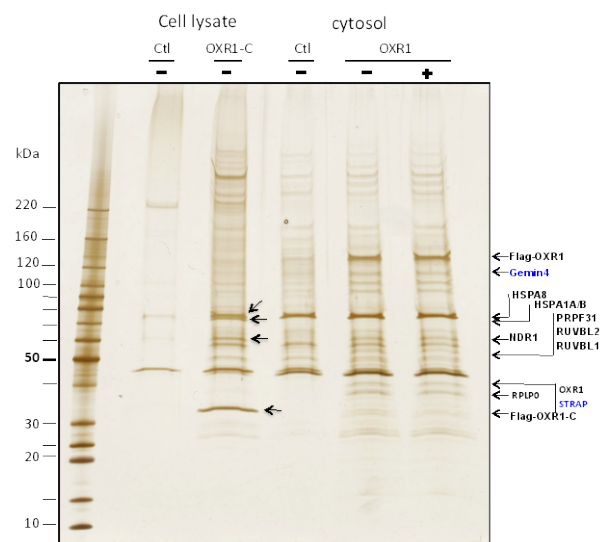


図 FLAG-OXR1 複合体精製

FLAGアフィニティー精製法により細胞抽出液中の OXR1-C 複合体、細胞質画分中の全長 OXR1 複合体を精製し、SDS-PAGEゲル上に展開した後、矢印で示すバンドを質量分析により同定した。Ctlはコントロール細胞を、“+”及び“-”は過酸化水素処理の有無を示す。

った。そこでミトコンドリア像 (MitoTrackerRed 染色) と比較したところ、OXR1 ドット状構造体はミトコンドリア局在と一致しないことがわかった。これらのことから、細胞周期全体を通して OXR1 タンパク質は細胞質に局在し、特徴的な構造体を形成していることがわかった。

### (3-2) 波及効果と発展性など

本年度の成果から、リン酸化酵素 NDR1 及び熱ショックタンパク質 HSP70 が OXR1 複合体に含まれることが示唆された。今後はこれらとの相互作用の検証実験が必要になるが、リン酸化タンパク質プロテオーム解析結果に OXR1 が含まれること、酸化ストレスにより OXR1 自身が酸化されることを踏まえると、これらタンパク質との相互作用の生理意義が伺える。

過酸化水素によって OXR1 自身が酸化されることから、OXR1 の機能の一つとして活性酸素除去が挙げられる。これまでに本研究代表者らによって、出芽酵母 *oxr1* 遺伝子欠損株は酸化ストレス感受性や、定常状態において突然変異性を示すことが明らかにされている。これらの結果を総合して、OXR1 タンパク質が細胞内で恒常的に発生する活性酸素に対しての直接的、もしくは間接的な防御機能を持つと考えられる。本研究で得られた成果は、自然発生的な酸化ストレスにも対抗するゲノム安定性維持機構の一端の解明に繋がると期待される。

### [4] 成果資料

本共同研究の研究成果が直接掲載された論文はまだないが、現在、投稿準備中である。