

ヒトのガン化に関わる Chk2 キナーゼの相互作用蛋白質の検索と機能解析

[1] 組織

代表者：臼井 雄彦
(大阪大学蛋白質研究所)
対応者：安井 明
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：蛋白質解析費 15万7千5百円
消耗品費 4千5百円

[2] 研究経過

酵母から高等動物まで高度に保存された細胞情報伝達機構である DNA 損傷チェックポイントは DNA 二重鎖切断 (DSB) などの DNA 損傷によって誘導され、DNA 修復、細胞周期や細胞死を制御し、ガン細胞特有に観察されるゲノム不安定性の誘発を抑える。一方、放射線治療や多くの抗ガン剤は作用機序として DSB を形成する。従って DNA 損傷チェックポイントの研究は、ガン化分子機構の理解のみならずガン治療の改良につながる。

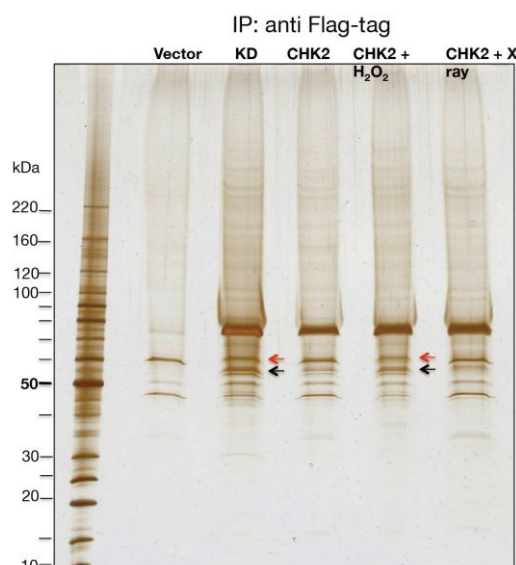
本研究はヒト癌化に関与する Chk2 の結合蛋白質の検索、解析を通して、Chk2 の分子機能を知ることがを目的とする。蛋白質リン酸化酵素 Chk2 は、その変異が発ガン性遺伝病や散発性ガン細胞で見いだされることからガン抑制機能が示唆される。Chk2 は DSB によって活性化される DNA 損傷チェックポイントの情報伝達に関与し、ガン抑制に重要な細胞死の誘導に必要である。申請者は Chk2 の酵母ホモログである Rad53 に関する自身の研究 (Usui and Petrini 2007) と他のグループの研究 (Matsuoka et al. 1998) から Chk2 機能解析に有用な情報を得た。それを生かして本研究では出芽酵母の遺伝学的アプローチを用いて独自の機能的スクリーニングの系を構築する。それと相補的に、ヒト培養細胞でアフィニティー精製の可能な Chk2 発現細胞を作製し、Chk2 に結合する蛋白質を同定する。酵母ホモログの Rad53 のキナーゼ活性を失った rad53-KD 変異蛋白質では相互作用蛋白質と結合が安定化されることを利用して、Chk2-KD 発現細胞も作製し、スクリーニングを行った。

本研究を進めるにあたり、平成24年1月と9月に加齢研において、また12月の分子生物学会にお

いて研究打ち合わせを行った。その間、研究協力者の菅野新一郎博士とのメールで研究の進捗状況について情報を交換した。

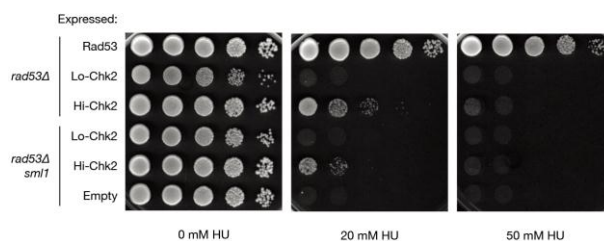
[3] 成果

1. Flag/HA のダブルタグされた Chk2 と Chk2-KD の安定発現細胞株を樹立し、Flag 抗体による免疫沈降を行った。



期待通り、Chk2-WT と KD 蛋白質で共沈産物に違いが見られたが、質量分析の結果は、specific なものは同定されなかった。過酸化水素や X 線処理後の細胞からの同定も試みたが、結合蛋白質の同定にはいたらなかった。

2. 酵母 rad53 欠失変異は致死となるが、ヒト Chk2 を発現すると致死性が抑制される。しかし、DNA 損傷処理に対して Chk2 高発現株では若干の抵抗性



の増加が見られたが、基本的に DNA 損傷感受性に対して抑制は不完全なことがわかった。このことは

DNA 損傷に対する Chk2 の活性化は酵母内では起こっていないことを示唆した。従って、この条件でさらにヒト cDNA ライブラリを導入し、*rad53* 欠失-Chk2 発現酵母株の DNA 損傷感受性を抑制するクローンを単離すれば、Chk2 の活性化に関わる蛋白質の同定につながる事が期待できた。しかし、*rad53* 欠失-Chk2 発現酵母株では、ライブラリによる形質転換効率が悪いことがわかり、現在、効率の改善とともにスクリーニングを進めている。

波及効果と発展性など

これまで酵母のみを使って研究を行って来た研究代表者にとって、本共同研究によってヒト培養細胞を用いた研究者との交流が持てたことで、今後の研究発展が期待できる。具体的には本研究をもとに構築しつつある酵母のスクリーニング系によって同定するヒト蛋白質の機能解析が、本共同研究によってできたネットワークによって、より円滑に進めることができると考えられる。

[4] 成果資料
なし。