

新規 HDAC 複合体構成因子 TdIF1 による DNA 二重鎖切断修復機構の解明

[1] 組織

代表者：前澤 創

(東京理科大学理工学部)

対応者：安井 明

(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 197,480円

[2] 研究経過

DNA 二重鎖切断(DSB)は、最も重篤な DNA 損傷であり、その速やかな認識と修復は遺伝的安定性の維持と細胞癌化の抑制に極めて重要である。真核細胞において、DSB は、主に非相同性末端結合(NHEJ)及び相同組換え(HR)の 2 つの機構によって修復される。HR では、姉妹染色体を必要とするため、S/G2 期に機能が限定される。一方、NHEJ は、細胞周期を通じて安定して機能する。さらに、NHEJ は DSB 修復のみならず、V(D)J 組換えの際に機能的な免疫グロブリン遺伝子及び T 細胞受容体遺伝子の形成にも必須である。

TdT Interacting Factor 1 (TdIF1)は、V(D)J 組換え時の N 領域合成を行う TdT と結合する活性制御因子である(Yamashita *et al.* 2001、Kubota *et al.* 2007)。一方で、ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)複合体構成因子の網羅的解析により、TdIF1 は、HDAC1 及び HDAC2 複合体の構成因子であることが示された(Bantscheff *et al.* 2011)。近年、HDAC1 及び HDAC2 は、DNA 損傷に応答し、ヒストン H3 Lys56 のアセチル化を低下させることによって NHEJ を促進することが報告された(Miller *et al.* 2010)。アセチル化を含む様々なヒストンの修飾機構は、転写や複製のみならず、DNA 修復反応の開始及び終結にも必須の反応であり、その制御機構の解明が期待されている。我々は、TdIF1 が HDAC1 及び HDAC2 複合体の構成因子として NHEJ に機能していると推測した。本研究は、TdIF1 の

NHEJ への機能を明らかにすること、特に HDAC1 及び HDAC2 複合体の構成因子としてそれらの活性への役割を明らかにすることを目的としている。

以下、研究活動状況の概要を記す。

本共同研究では、生細胞核局所照射技術、プロテオーム解析技術を用いて、TdIF1 の DSB 領域への集積機構、DSB に応答した複合体構成因子の同定を目指した。プロテオーム解析に必要な TdIF1 cDNA や抗 TdIF1 抗体などの研究材料の授受や(平成 24 年 4 月)、電子メールや分子生物学会(平成 24 年 12 月)の場での研究内容の情報交換を行った。

[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。

U2OS 細胞を用いて赤色蛍光タンパク質 DsRed 融合の TdIF1 がレーザーで導入した DSB 領域へ集積することを見出した(Fig. 1)。さらに、TdIF1 欠損 MEF 細胞を用いて DSB 導入後の γ H2AX 及びヒストン H3 Lys56 のアセチル化レベルを経時的に調べたところ、正常な TdIF1 を有する MEF に比べ、TdIF1 欠損 MEF では γ H2AX 及びヒストン H3 Lys56 のアセチル

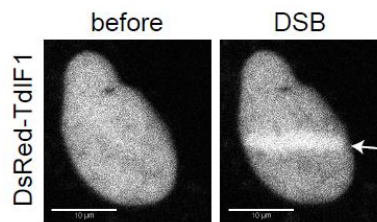


Fig. 1 TdIF1 の DSB 領域への集積。DsRed 融合の TdIF1 を発現させた U2OS 細胞に Hoechst33342 を取り込ませ、405-nm のレーザーを用いて DSB を導入した。1 分後 DSB を導入した領域(矢印で示した領域)への TdIF1 の集積が観察された。bar は 10 μ m。

化レベルの亢進が観察された (Fig. 2)。すなわち、Tdif1 欠損 MEF では、ヒストン H3 Lys56 の脱アセチル化反応の異常と、DSB の修復遅延が生じていることを示しており、Tdif1 が HDAC1 及び HDAC2 と共に NHEJ で機能することが示唆された。

一方、DSB に応答した Tdif1 複合体構成因子の同定に必要となる、Flag タグ融合 Tdif1 の安定発現株の樹立を試みたが、樹立に至らなかった。原因の一つに、形質導入後の Flag タグ融合 Tdif1 の発現が、安定発現株の樹立を阻害していると考えられた。そこで、形質導入後の Flag タグ融合 Tdif1 の発現を抑制するために tet-inducible の系を用いて Flag タグ融合 Tdif1 の安定発現株の樹立を目指した。安定発現株を樹立後、プロテオーム解析により Tdif1 複合体構成因子を同定する予定である。

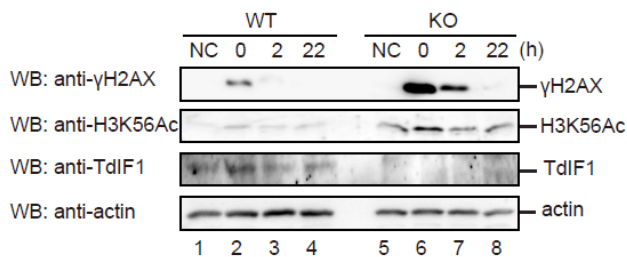


Fig. 2 DSB 後の Tdif1 欠損 MEF における γ H2AX 及びヒストン H3Lys56 のアセチル化レベル。プレオマイシンを用いて MEF に DSB を導入し、処理直後 (0 h) から 22 h 後までの γ H2AX 及びヒストン H3Lys56 のアセチル化レベルをウェスタンブロットにて解析した。Tdif1 を欠損した MEF (KO) では、欠損していない MEF (WT) に比べ、両者の発現レベルが亢進していた。NC は、プレオマイシン処理前の細胞。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究では、Tdif1 が NHEJ に機能する新規の DNA 修復因子であることが示唆された。HDAC1 及び HDAC2 のホモログは酵母にも存在し、進化的に高く保存されている。一方、Tdif1 のホモログは、脊椎動物の他に、線虫やショウジョウバエにも存在するが、酵母には存在しない。すなわち、Tdif1 を含む HDAC1 及び HDAC2 複合体は、進化の過程で多細胞生物に新たに備わったエピジェネティクス制御機構の一端を担っていると考えられる。今後、DSB 依存的な Tdif1 を含む HDAC1 及び HDAC2 複合体の構成因子を同定し、同定された因子について、HDAC 活性や DSB 領域への集積能の影響を解析することにより、ヒストン脱アセチル化の DNA 修復における新たな役割が明らかになると考えられる。また、Tdif1 の機能阻害を目指した抗癌剤や増感剤などの、新規の創薬ターゲットとしての利用も期待できる。

[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。