

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 152,200 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。非相同末端結合 (Non-homologous end-joining; NHEJ) は、DSB の主な修復経路であり、鋳型 DNA を必要とせず細胞周期非依存的に働く。また、リンパ球では抗原に対する多様性獲得機構 V(D)J 組換えにおいても NHEJ が機能する。

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)。HDAC1 及び HDAC2 は、DNA 損傷に応答し、ヒストン H3 Lys56 のアセチル化 (H3K56Ac) を低下させることによって NHEJ を促進する (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の機能解明を目的とし

ている。本共同研究では、DSB 依存的に形成される TdIF1 を含む HDAC1/HDAC2 複合体の構成因子の同定を目指した。

以下、研究活動状況の概要を記す。TdIF1 に相互作用するタンパク質複合体を精製するために、Flag タグを融合した TdIF1 を発現するベクターを構築した。東北大学加齢医学研究所にて、作製したベクターをヒト胎児腎臓細胞株 HEK293 細胞へトランスフェクションし、Flag-TdIF1 を安定的に発現する細胞を樹立した。樹立した細胞に DNA 鎖を切断する抗生物質ブレオマイシンを作用させて DSB を導入し、抗 Flag 抗体を用いた免疫沈降法により TdIF1 複合体を精製した。精製した複合体構成因子を質量分析法によって同定した。研究計画の遂行にあたり、電子メールによる情報交換や、TdIF1 cDNA や抗 TdIF1 抗体などの研究材料の授受を行った。

[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。

第1に、精製した TdIF1 複合体の構成因子を質量分析法で同定した結果、ELMSAN1、HDAC1、及び HDAC2 が同定された (図)。本研究では DSB 依存的に形成される TdIF1 複合体構成因子は同定されなかった。ELMSAN1、HDAC1、及び HDAC2 は、いずれも有糸分裂期 HDAC 複合体構成因子として、TdIF1 と共に同定されている (Bantscheff *et al.* 2011)。本研究においても同様に同定されたことから、TdIF1 とこれらの因子との結合が普遍的なものであることが示唆された。今後、本複合体の活性制御機構に焦点を当て、個々の構成因子の役割を明らかにし、NHEJ における機能解明を目指す。

第2に、TdIF1 と HDAC1 間の相互作用について機能解析を行った。我々は、すでに TdIF1 欠損 MEF 細胞で DSB 導入後の H3K56Ac レベルが亢進することを明らかにしていた。そこで、TdIF1 は HDAC 活性を正に制御すると推測した。まず、TdIF1 と HDAC1 が直接結合することを、

それぞれの精製タンパク質を用いたプルダウンアッセイにより明らかにした。次に、H3K56Acを基質とした *in vitro* HDAC アッセイ系を構築した。現在、構築したアッセイ系を用いて TdIF1 の HDAC1 の活性への影響を解析している。一方、HDAC1 は、DSB 領域へ迅速に集積することが生細胞イメージングにより示されている (Miller *et al.* 2010)。我々は、TdIF1 も同様に DSB 領域へ集積することを明らかにしていたため、TdIF1 が HDAC1 の集積の足場として機能するのではないかと考えた。そこで TdIF1 欠損 MEF を用いて、レーザーで導入した DSB 領域への HDAC1 の集積を解析した。しかし、WT の MEF を用いた場合の集積と比べ、有意な違いは観察されなかった。以上の結果から、TdIF1 は、DSB 領域へ集積した HDAC1 の活性を制御すると示唆された。

(3-2) 波及効果と発展性など

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おり、遺伝子の転写制御など重要な役割を果たしている。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。本研究では、TdIF1 複合体の構成因子が同定されたが、本複合体の形成は DSB 依存的ではなく、普遍的であることが示唆された。近年 TdIF1 が転写因子として機能することが報告されたことから (Kubota *et al.* 2013)、本複合体は、NHEJ のみならず転写制御にも機能していると考えられる。しかし未だ本複合体の機能は不明であるため、本研究の継続により、新規 HDAC 複合体の機能解明が期待される。

[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。

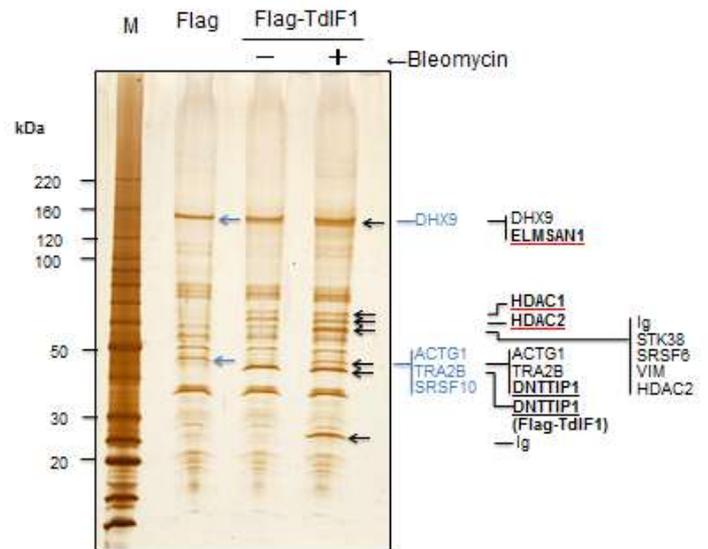


図 質量分析法による TdIF1 複合体構成因子の同定。