

課題番号 60

ゲノム安定性に関わる新規損傷応答タンパク質の機能の解明

[1] 組織

代表者：中嶋 敏

(Department of Microbiology and Molecular Genetics, University of Pittsburgh School of Medicine)

対応者：安井 明

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

研究費：物件費 30 万円

[2] 研究経過

本研究の目的・概要

DNA 二本鎖切断修復に関わる二つの新規損傷応答タンパク質の機能を明らかにすることを研究目的とし、そのためにそれぞれの結合タンパク質を同定する。DNA 二本鎖切断は細胞において最も重篤な損傷の一つで、その修復には様々なタンパク質の機能を必要とすることがわかっている。しかしながら、今までに知られている修復タンパク質だけではその複雑な修復メカニズムを解明することができないと考え、レーザー照射と X 線照射を組み合わせた損傷応答スクリーニングを行い、二つの新規損傷応答タンパク質を単離した(図1)。一つは L3MBTL4 で、ショウジョウバエの L3MBTL4 のオーソログである L3MBT 遺伝子は、癌抑制遺伝子であることが知られている。ヒトでもいくつかの乳がん細胞で L3MBTL4 の変異が見られることが報告されている。我々は L3MBTL4 タンパク質が X 線またはレーザー照射によって誘発された損傷に集積することを発見した。また、L3MBTL4 の発現を抑えると、二本鎖切断修復の一つの経路である相同組換え修復の経路が阻害されることを明らかにした。もう一つは ZNF517F3 で、ZNF517 は一つの遺伝子で二つの異なるタンパク質をコードしており、そのうちのひとつ、ZNF517F3 がレーザー照射によって誘発された損傷に、PARP 活性依存的に集積することを発見した。また、ZNF517 の発現を抑えると、相同組換え修復の経路が著しく阻害され、細胞は二本鎖切断誘発剤に感受性になることがわかった。この二つ

のタンパク質の結合タンパク質を明らかにすることにより、二本鎖切断修復の機能の解明を目指す。結合タンパク質を同定するために *in vivo*、*in vitro* の方法を用いる。*in vivo* のアプローチでは、タグ付

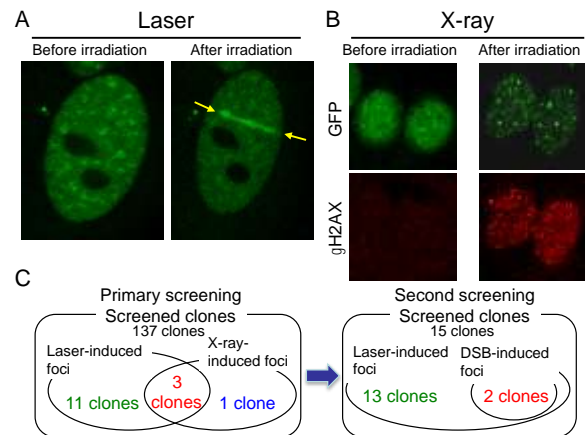


図1. 損傷応答スクリーニングとスクリーニングの結果。

きのタンパク質を細胞内で発現させ、そのタンパク質に結合するタンパク質を免疫沈降法により精製する。*in vitro* のアプローチでは、目的タンパク質を精製し、そのタンパク質でカラムを作り、細胞抽出物から結合タンパク質を精製する。精製した結合タンパク質は質量分析により同定する。同定したタンパク質とそれぞれのタンパク質との細胞内での結合を免疫沈降法によって確認する。同定したタンパク質が目的タンパク質と同経路で働くかどうかは、CRISPR-Cas9 システムを用いた体細胞遺伝子破壊による遺伝的解析により明らかにする。またそれぞれの欠損細胞で目的タンパク質、同定したタンパク質の損傷応答がどうなるかを解析する。これらの方法を通して、L3MBTL4 および ZNF517F3 の機能を明らかにし、二本鎖切断修復のメカニズムの解明を目指す。

研究打ち合わせ等の開催状況

加齢研担当教員の安井明教授とは e-mail によって連絡を取り合い、プロジェクトを推進させた。今後申請者が日本に一時帰国した際には、加齢研を訪れ議論する予定である。また、同じ国際学会に参加する機会があった場合には、直接会って議論する。これらにより密接な情報の共有をはかり、プロジェクトの円滑な推進を目指す。

[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。

1、*in vitro* のアプローチによる結合タンパク質の同定。バキュロウイルスで GST タグ付き目的タンパク質を精製し、タンパク質カラムを作り、細胞抽出物から結合タンパク質を精製した。精製された結合タンパク質を質量分析により同定した (図2)。現在、それらの結合を確かめるとともに、その結合の意義を解析中である。結合蛋白候補の具体的な名前は論文発表の時に公開する予定である。

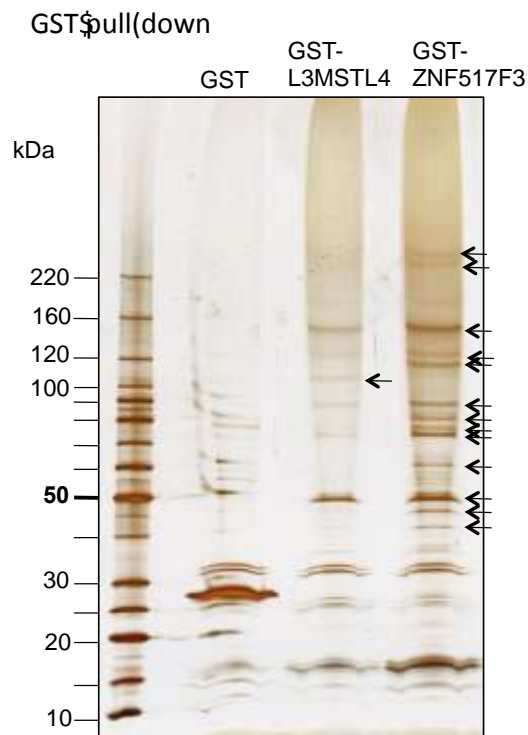


Fig. 2 Affinity screening による

2、*in vivo* のアプローチによる結合タンパク質の同定。タグ付きの目的タンパク質を発現する細胞の樹立を様々な方法で試みたが、いずれの方法でも樹立することができなかつた。制御されない目的タンパク質の発現は細胞にとって致死的であることが示唆された。この問題を解決するために、CRISPR-Cas9 システムを用いて、内在性のタンパク質に直接タグをつけることを計画し、候補の細胞を単離した (図3)。今後ウェスタンブロッティングや免疫染色により、タグ付きタンパク質が細胞内で発現しているかを確かめる予定である。樹立した細胞を用いて、免疫沈降により結合タンパク質を精製し、質量分析によりそのタンパク質を同定する。また、*in vitro* のアプローチにより同定したタンパク質と内在性の目

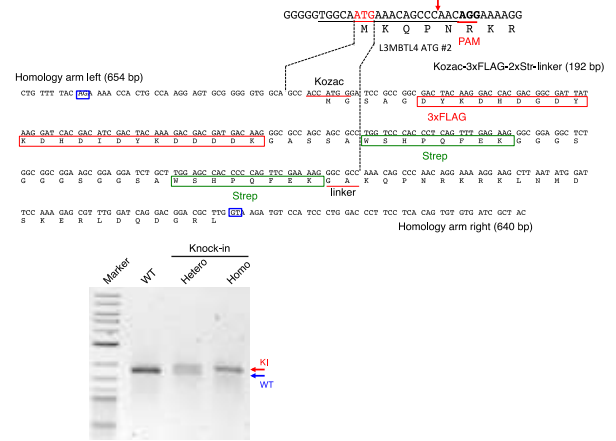


図3. ノックイン細胞の樹立の一例。ノックインのデザインとスクリーニングの結果。

的タンパク質との結合を、この細胞を用いた免疫沈降により確かめる。

(3-2) 波及効果と発展性など

X 線や多くの抗がん剤は二本鎖切断を誘発し、二本鎖切断修復の阻害はがんの治療の効果を上げることが期待されている。実際に、相同組換えが欠損している BRCA1、2 の欠損細胞では、低濃度の PARP 阻害剤 (DNA 単鎖切断修復の阻害剤) に高感受性になることが知られている。L3MBTL4 に関しては、今まで得られた結果やそのドメイン構造等から二本鎖切断修復の経路をコントロールする 53BP1 と競合して、二本鎖切断の修復経路を相同組換え修復に導いているのではないかと考えている。L3MBTL4 の機能を明らかにし、その役割を阻害することで、相同組換えだけではなく、もう一つの修復経路である非同源末端結合の経路まで阻害できるのではと期待している。またいくつかの乳がん細胞で L3MBTL4 の変異が報告されており、同じ相同組換え修復に関わる BRCA1、2 が乳がんの原因遺伝子であることから、L3MBTL4 の機能の解明は治療のみならず、診断にも有用であることが期待される。

ZNF517F3 に関しては、その発現を抑えると相同組換えの頻度が約 20% にまで減少した。このことから ZNF517F3 は相同組換えの中で重要な役割を果たしていることが予測される。実際に、ZNF517F3 の発現を抑えた細胞は二本鎖切断誘発剤に感受性になる。ZNF517F3 の機能を明らかにし、その機能を阻害することで抗がん剤治療の効果をあげることが期待される。

[4] 成果資料

本共同研究による論文はまだない。