

課題番号52

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35万円

[2] 研究経過

本研究の目的・概要

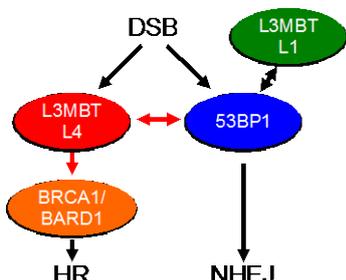


Fig. 1. 二本鎖切断修復経路におけるL3MBTL4の機能のモデル図。両端矢印は競合的關係を示す。赤矢印は、本研究で明らかにすることを示す。

DNA二本鎖切断修復(DSB repair)は二つの異なる経路、相同組換え修復(HR)と非同末端結合(NHEJ)より修復されるが、この二つの経路がどのように制御されているか

はわかっていない。本研究はこの二つの経路がどのように制御されているかを明らかにすることを研究目的とする(Fig. 1)。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、新規損傷応答タンパク質L3MBTL4を単離した(Fig. 2)。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、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。さらにL3MBTL4欠損細胞を樹立し、種々の修復タンパク質

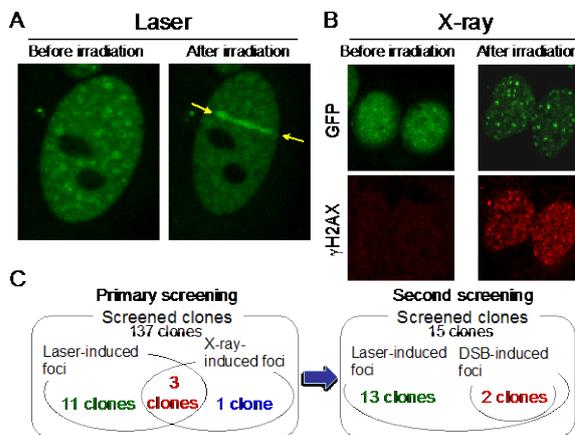


Fig. 2. 損傷応答スクリーニングとスクリーニングの結果。

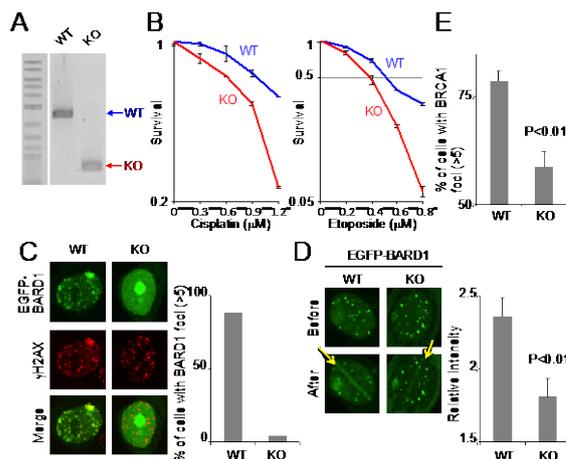


Fig. 3. L3MBTL4欠損細胞の樹立とその解析。A. PCRによるゲノム解析。B. 欠損細胞の感受性解析。C. & D. 欠損細胞におけるBARD1のフォーサイ形成(X線照射またはレーザー照射)。E. 欠損細胞におけるBRCA1のフォーサイ形成(X線照射)。

の損傷応答を調べたところ、乳がんの原因遺伝子であるBARD1とBRCA1の損傷応答が影響されているのを発見した(Fig. 3)。L3MBTL4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、二本鎖切断修復機構の解明を目指す。

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 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。

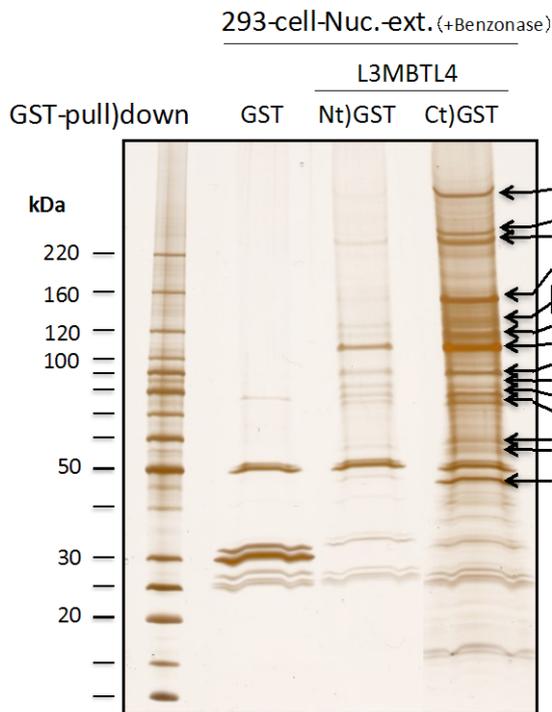


Fig. 4. L3MBTL4 の結合タンパク質の精製とその同定。

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 (Fig. 4)。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。

(3-2) 波及効果と発展性など

健康寿命の延伸を目指すためには、さらなるがんの早期診断法と有効な治療法の確立が必要である。今まで得られた結果から、L3MBTL4 は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、相同組換えだけでなく、もう一つの修復経路である非相同末端結合の経路まで阻害できるのではと期待している。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 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。また最近アルツハイマーの患者の脳で BRCA1 の発現レベルが低下している事、BRCA1 の減少がマウスでベータアミロイドの蓄積を引き起こす事が報告された (Suberbielle E et al. 2015 nature comm.)。BRCA1 を制御する事が予想される L3MBTL4 の機能を解明する事は、加齢疾患であるがん研究のみならず、老化研究に関しても有意義であると考えられる。

[4] 成果資料

本共同研究による論文はまだない。