

課題番号 2

## DNA 損傷応答機構に関与する新規中心体タンパク質の同定

### [1] 組織

代表者：島田 幹男  
(東京工業大学科学技術創成研究院)

対応者：安井 明  
(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

松本 義久 (東京工業大学科学技術創成研究院)  
土屋 尚代 (東京工業大学科学技術創成研究院)  
加瀬 直也 (東京工業大学科学技術創成研究院)  
山崎 あかね (東京工業大学科学技術創成研究院)  
塚田 海馬 (東京工業大学科学技術創成研究院)

研究費：物件費 5 万円

### [2] 研究経過

ゲノム DNA の安定性は細胞の恒常性維持にとって不可欠であり、その破綻は老化や発がんなど様々な疾患や発生異常につながる。ゲノム損傷が生じた際には DNA 損傷応答機構が活性化し、即座に損傷は修復される。最近の知見によりこれら損傷応答に関与するタンパク質群が細胞内小器官である中心体に局在することが明らかになってきた。申請者はこれまで DNA 損傷応答タンパク質である NBS1 が中心体に局在し、BRCA1 や ATR を介して中心体複製を制御していることを報告してきた(Shimada et al, *Cancer Research*, 2009)。しかしまだその分子機構は不明な点が多く NBS1 を中心とする分子群の挙動はさらなる研究を要する。

本研究の目的は上記の背景を踏まえ、NBS1 が中心体でどのような挙動をしているかを探索するべく NBS1 と相互作用する新規タンパク質の同定をすることである。

使用した細胞は FLAG-tag 配列と HA-tag 配列を NBS1 の N 末端に持つ融合遺伝子をあらかじめ導入した 293E 細胞を使用した (共同研究者である東北医科薬科大学 柳原晃弘博士作製)。FLAG-HA-NBS1-293E 細胞の細胞抽出液から超遠心分離機を用いてシヨ糖濃度勾配分離法により中心体画分を単離し、FLAG 抗体を用いた免疫沈降法により NBS1 に結合するタンパク質を同定する計画で研究を実施した。

以下、研究活動状況の概要を記す。

所内対応者の安井明加齢研フェローと電子メールにて 3 回ほど研究打ち合わせを実施した。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

まずは予備実験として細胞全抽出液に対して FLAG 抗体を用いて免疫沈降を実施した。当初の予定通り、全抽出液では NBS1 と結合している中心体タンパク質の絶対量が少なく Centrin-2 や gamma-tubulin などの中心体タンパク質との結合は見られなかった(図 1)。

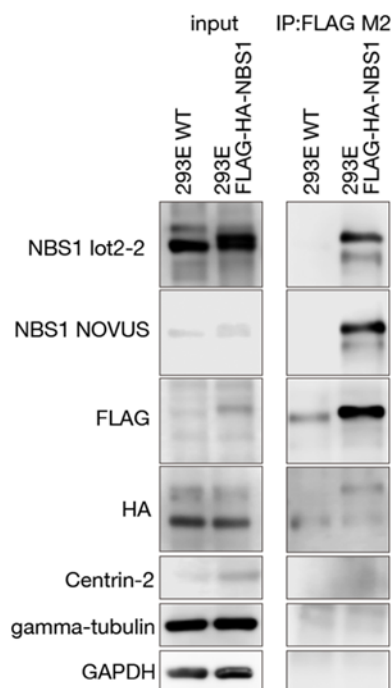


図 1 FLAG-HA-NBS1 を導入した 293E 細胞から抽出したタンパク質中の NBS1 と中心体との相互作用

そこで予定通りシヨ糖濃度勾配分離法による中心体画分の単離を実施した(図 2)。その結果、中心体画分に NBS1 や BRCA1 が局在することが確認できた。今後はこの画分に対して FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行い、NBS1 と結合するタンパク質を同定する予定である。

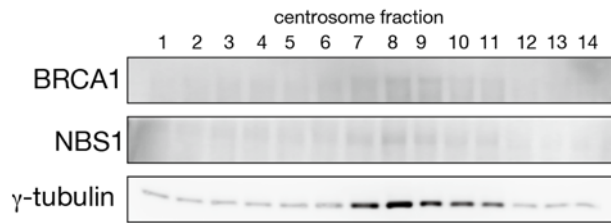


図2 FLAG-HA-NBS1を導入した293E細胞から抽出したタンパク質中の中心体画分の単離。中心体タンパク質である gamma-tubulin をマーカーとして使用。NBS1 や BRCA1 のバンドが確認出来る。

### (3-2) 波及効果と発展性など

本年度の研究において NBS1 と中心体結合タンパク質解析のための準備を整えることができた。今後は免疫沈降したサンプルを電気泳動で展開し、候補となるバンドを質量解析法で解析していきたい。

### [4] 成果資料

本共同研究成果が掲載された論文および学会発表はまだありません。具体的な研究発表のために引き続き、共同研究を推進する予定である。