

細胞老化における DSB 損傷応答を介した タンパク分解制御機構の解析

[1] 組織

代表者：岡田 麻衣子
(聖マリアンナ医科大学)
対応者：安井 明
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：宇井 彩子
(東京工科大学)

研究費：物件費 30 万円

[2] 研究経過

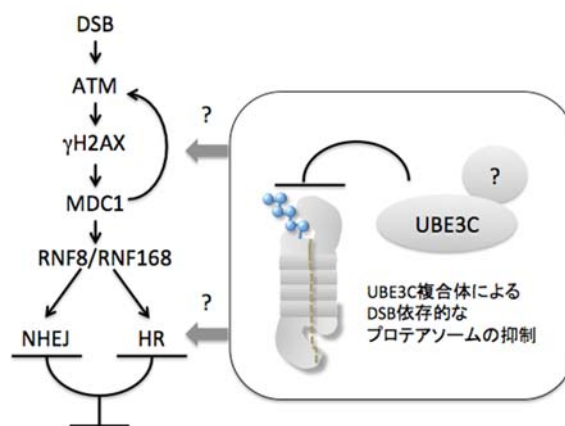
次世代へのゲノム情報の伝達には、生殖幹細胞の染色体安定性が不可欠である。女性においては加齢と共に卵子に DNA 損傷が蓄積することが報告されており、染色体不安定性による不妊や高齢出産のリスクへの関与が示唆されている。近年、自然閉経に関する遺伝子群が網羅的に同定され、その多くが DNA 修復因子群であることが報告されている。DNA 二本鎖切断 (Double strand break: DSB) 修復因子である BRCA1 もその一つである。実際に、BRCA1 の機能不全では、テロメア制御異常や原子卵胞・産仔数の低下が報告されている。このように卵子における DSB 修復、老化との関連が示唆されているもののその詳細は依然不明なままである。そこで本研究では細胞老化における DSB 修復機構の解明にあたり、プロテアソームによるタンパク質分解制御に着目した。

プロテアソームは 66 個の構成因子からなる約 2.5 MDa もの巨大なタンパク質分解装置である。細胞老化の過程でプロテアソーム機能が低下することが報告されているが、プロテアソーム構成因子群の発現制御や活性制御機構については不明な点が多い。近年、生化学的手法によりプロテアソーム結合因子群 (Proteasome interacting proteins: PIPs) が同定されており、プロテアソームの機能制御との関連が報告されている。また、その複合体の大きさから、プロテアソームは核膜孔を通過できずに細胞質で機能すると考えられていた経緯もあり、核内でのプロテアソ

ームの動態は未解明であった。DSB 修復においては、修復因子群が適切なタイミングでタンパク質分解制御を受けることが、一連の修復過程に重要であることが明らかになりつつある。このように個々の分解基質については解析が進んでいるものの、分解装置であるプロテアソームが DSB 修復過程においていかなる制御を受けるかは未知である。

我々はこれまでに、PIPs の一つである UBE3C が DSB 依存性のプロテアソーム制御因子である可能性を見出している。また、UBE3C の発現低下細胞では BRCA1 タンパク質の発現低下を伴う、DSB 修復異常を生じることを見出している。そこで本共同研究では UBE3C によるプロテアソーム制御機構を明らかにし、細胞老化における DSB 修復機構の役割を明らかにすることを目的とした。具体的には、加齢研フェローの安井明先生の研究室で開発されたプロテオーム技術やゲノム損傷応答可視化システムを用いて、DSB 損傷を活用することで、BRCA1 を制御する UBE3C 複合体構成因子群の詳細を明らかにすることを目的とした。

上記の研究についての対応者および分担者との三者間の打ち合わせについては、大学および研究会の参加を通じて行った。



[3] 成果

(3-1) 研究成果

本研究では UBE3C 複合体を解析するにあたり、Flag-tag 融合 UBE3C および UBE3C 酵素活性変異体の恒常発現細胞株を樹立した。さらに、アフィニティー精製の条件検討を行うことで、UBE3C が単体ではなく相互作用因子群と共に機能する可能性が示唆された。また、タンパク質分解の指標となる GFP 融合レポーターを挿入した細胞株を樹立した。このレポーターはプロテアソームによる分解を恒常的に受けており、プロテアソームの機能低下に伴い分解から免れて蓄積する。取得した細胞株にプロテアソーム阻害剤を添加することで、GFP の蓄積を確認し、プロテアソーム機能を可視化する細胞評価系を構築した。最後に、DSB 修復における UBE3C の役割を検討した。DSB 損傷の可視化システムを用いて DSB 修復過程について時系列を追って検討したところ、UBE3C の発現低下では NHEJ 因子 53BP1 の DSB 部位への停滞が生じることが示唆された。それに伴い、後続の HR 因子群の集積の遅延および集積量の低下が生じることが示され、UBE3C 発現低下細胞は BRCA1 不全様の表現型を呈することが示唆された。一方で、UBE3C の発現低下は NHEJ および HR の上流に位置する MDC1 の発現量を低下させることも明らかとなり、MDC1 で増幅される γ H2AX のシグナルも減弱する可能性が示唆された。以上より、UBE3C は DSB 修復過程において多段階で機能する可能性が示唆された。今後、UBE3C の発現低下は DSB 損傷が蓄積することが予測され、細胞老化に伴う DSB 損傷の蓄積とプロテアソーム機能不全の関連を明らかにする予定である。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究で明らかになった成果の一部は、「染色体ワークショップ」などの研究会にて成果発表を行い、当該分野の研究者との活発な議論をかわしており、今後の研究への発展が期待される。また、本共同研究では、UBE3C の発現低下細胞では BRCA1 不全様の表現型を呈することを見いだしている。BRCA1 の機能不全は卵子の老化や難治性乳がん・卵巣癌との関連が深く、特に卵子の老化の機構の一端を明らかにすることは、高齢出産が増加している現代社会において重要な基盤研究となることが期待される。今後、細胞老化過程における UBE3C の発現量および酵素活性の変動、それに伴う DSB の蓄積とプロテアソーム機能との連動性を明らかにすることが重要な課題である。本研究で確立したアフィニティー精製系やレポーター細胞を用いることで、

今後、上記の一端が明らかになることが期待される。

[4] 成果資料

特になし