

課題番号 4

細胞老化を抑制する ATR-NBS1 経路の プロテオーム解析

[1] 組織

代表者：柳原 晃弘
(東北医科薬科大学医学部)
対応者：安井 明
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 10 万円

[2] 研究経過

DNA 損傷はゲノム変異やエピゲノム変化を誘発し、その積み重ねは老化や加齢疾患を引き起こすと考えられている。研究代表者らはこれまで DNA 損傷修復研究を行ってきた。特に、DNA 二重鎖切断(DSB)応答タンパク質 NBS1 の研究では、NBS1 が DSB だけでなく紫外線 DNA 損傷にも応答することを明らかにしてきた(Yanagihara et al. 2011, Mol Cell)。最近の研究で、分子的にもこの応答経路が DSB 応答経路とは異なることが明らかとなっていった。その一つが ATR との密接な機能関連である。タンパク質キナーゼ ATR は一本鎖 DNA によって活性化され、特に DNA 複製期での DNA 損傷チェックポイントで中心的な役割を担っている。ATR ノックアウトマウスは胎性致死であるが、大人のマウスでノックアウトすると加齢症状が加速されるため、ATR 経路と老化との関連が示唆されている(Ruzankina et al.,2007, Cell Stem Cell)。NBS1 ノックアウトマウスも胎性致死であるため個体での加齢現象解析は困難であり、そのためこれまで老化との関連は不明であったが、ATR と NBS1 との機能関連および ATR の老化への関与を考えると、NBS1 の老化への関与が疑われる (図 1)。



図 1. NBS1、ATR、加齢症状との関係 (モデル)

本共同研究では、NBS1 の ATR 経路における分子機能解明に向け、タンパク質複合体プロテオミクス技術を活用して、ATR 経路特異的な NBS1 複合体の構成因子を同定することを目的とした。また、リアルタイムタンパク質局在解析技術を活用し、紫外線損傷時の NBS1 の細胞内挙動解析も行った。

所内対応者の安井明加齢研フェローとは、メールで、あるいは直接研究室を訪問して、実験データや実験方針等に関するディスカッションを行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

NBS1 タンパク質複合体単離を以下の二つの方法で行った。

1. FLAG-NBS1 発現細胞抽出液をもちいた FLAG 抗体による免疫沈降法

ATR 経路特異的な複合体単離のため、細胞に紫外線を照射して実験を行なったが、紫外線照射の有無で明瞭に変化の見られるタンパク質は見つけられなかった (図 2)。

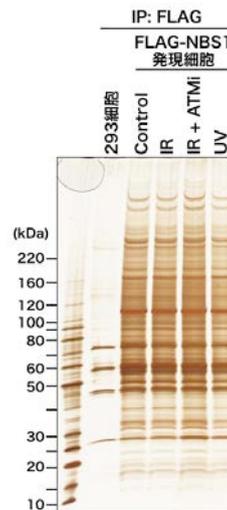


図 2. FLAG-NBS1 での免疫沈降実験の結果

2. 精製 GST-NBS1 タンパク質によるヒト細胞抽出液でのプルダウン実験

NBS1 の部分断片を昆虫細胞で発現させ、精製タンパク質を得た。この精製 GST-NBS1 断片を用

いたプルダウン実験でも、FLAG-NBS1 の方法と同様、ATR 経路特異的と思われるタンパク質は見つけられなかった。

沈降物の電気泳動パターンの比較では、FLAG-NBS1 の実験と GST-NBS1 の実験とで異なるバンドパターンが認められ、それぞれの方法で異なるタンパク質が単離されていることが推測された。この結果はそれぞれの実験方法の特徴を反映したものだと思われる。

NBS1 複合体の構成因子と思われるいくつかのタンパク質のバンドをゲルから切り出し、質量分析により同定した。これらのタンパク質が ATR 経路で機能しているのかどうかについては現在検討中である。

NBS1 は紫外線損傷に集積する性質を持つ。そこで、GFP-NBS1 でもそれが観察されるか検討を行った。GFP-NBS1 発現細胞に紫外線を照射すると、紫外線照射部位に GFP-NBS1 が集積するのが観察された。コントロール実験として放射線を照射すると、よく知られた核内フォーカスを形成したため、本研究で使用した GFP-NBS1 は DNA 損傷に応答した局在変化能を有していると考えられる。

GFP-NBS1 発現細胞では、紫外線照射後に「局在変化」として観察される明らかな変化が認められるため、タンパク質間結合の変化も見られるのではないかと考え、GFP-NBS1 発現細胞抽出液を用いて GFP 抗体による免疫沈降実験を計画した。実験系の構築のため、紫外線を照射していない条件での沈降実験の検討を重ね、GFP 抗体で GFP-NBS1 複合体を綺麗に単離することに成功した。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究では二つの異なる方法により NBS1 タンパク質複合体の単離を行った。これら二つの方法はそれぞれに短所と長所をもった特徴のある方法であり、両者からの情報を考え合わせることで、今後 NBS1 複合体の理解が進むものと期待される。

本研究では発展的な実験として、これら二つの方法に加えてさらに GFP 抗体による免疫沈降実験系の確立を行なった。これは紫外線 DNA 損傷応答として顕微鏡下で観察される応答反応とプロテオミクス解析とを橋渡しする重要な実験であり、特に局在変化に関わるタンパク質間結合の解明に大きく役立つものと思われる。今後、紫外線照射の有無でのタンパク質間相互作用変化の調査を行なっていきたい。

[4] 成果資料
現時点では無し。