

課題番号 61

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)

研究費：物件費 15 万円

[2] 研究経過

細胞内ゲノム 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。中心体は細胞分裂の際に正確にゲノム染色体を分配するために必須の細胞内小器官である。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)実績を背景に本研究では 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を目的とする。

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)。本課題は昨年度からの継続研究であり、昨年度に引き続き 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、上述した FLAG-HA-NBS1-293E 細胞から超

遠心分離機を用いたシヨ糖濃度勾配分離法により中心体画分を分離した(図1)。

シヨ糖濃度勾配法による中心体画分の単離 WB: γ -tubulin 抗体



図1 FLAG-HA-NBS1 を導入した 293E 細胞から抽出したタンパク質を用いた中心体画分の単離

次に全細胞抽出液、中心体画分およびネガティブコントロールとして非中心体画分を集めて FLAG M2 抗体(FLAG-NBS1 を標的とする)を用いて免疫沈降を実施し、得られたサンプルを電気泳動後、銀染色法により染色した。図2の①に示すように中心体画分特異的なバンドが確認されたので Mass 解析により目的のタンパク質の同定を試みた。

中心体において NBS1 と結合する新規タンパク質の同定

HA-FLAG-NBS1 integrated 293E cells 4mg protein were used for IP

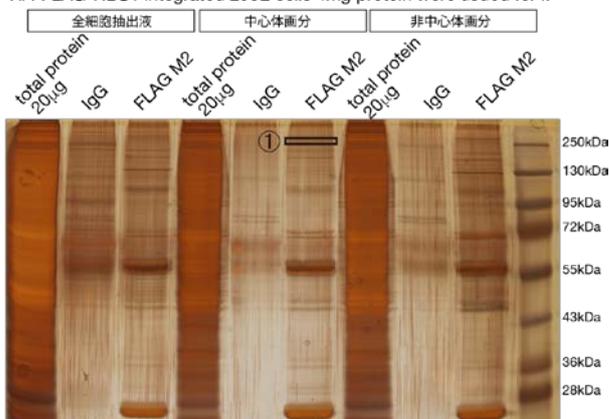


図2 全細胞抽出液、中心体画分、非中心体画分に対して FLAG-M2 抗体を用いた免疫沈降を実施し、電気

泳動後、銀染色を行った。①で示している部分を切り出してMass解析に使用した。

Mass解析の結果 Eg5 タンパク質が中心体において NBS1 と結合するタンパク質として新たに同定された。これらの結果を確認するために FLAG-HA-NBS1-293E 細胞の細胞抽出液に対して FLAG-M2 抗体(FLAG-NBS1 が標的)で免疫沈降後、Eg5 抗体を用いたウエスタンブロッティング法により NBS1 と Eg5 が結合していることを確認した(図 3)。また、U2OS 細胞を用いた免疫染色法によっても細胞分裂期に NBS1 と Eg5 が共局在していることを確認した(図 4)。

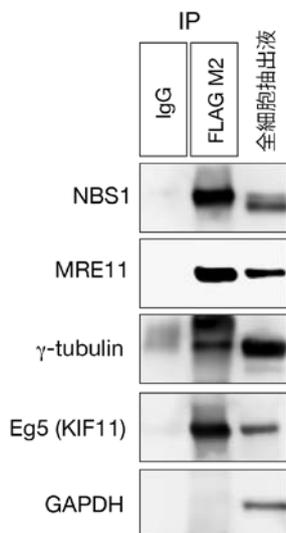


図 3 FLAG-HA-NBS1-293E 細胞抽出液に対して FLAG-M2 抗体を用いて免疫沈降を行い、各種タンパク質抗体を用いてウエスタンブロッティングを実施した。

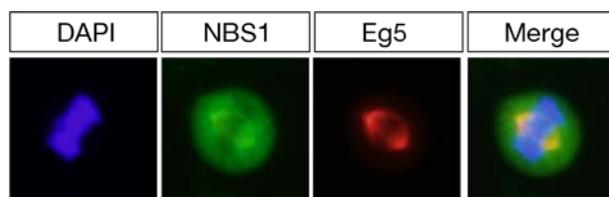


図 4 U2OS 細胞における細胞分裂期の NBS1 と Eg5 の共局在の免疫染色像。青:DAPI 細胞核、緑:NBS1、赤 : Eg5 および共染色像。

(3-2) 波及効果と発展性など

本年度の研究において NBS1 と結合する中心体タンパク質として Eg5 を同定することができた。今後は NBS1 と Eg5 の機能的な相互作用を解析することにより、細胞内における DNA 損傷応答や細胞分裂の新規機能の解明を目指す。また、今後の展望として本共

同研究により明らかになった NBS1 と Eg5 の相互作用を新たな予算申請のテーマとして応募し、研究の活性化を図りたい。

[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。