

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 損傷応答と老化・加齢疾患との関係は、様々な研究結果から指摘されている。紫外線応答タンパク質 ATR も老化との深いつながりが示唆されており、老化抑制の面から注目されている。ATR はタンパク質リン酸化酵素として、多くのタンパク質を制御しており、複雑な分子間ネットワークの中心タンパク質として機能している。染色体不安定性症候群の原因タンパク質 NBS1 も ATR の制御を受けていることが明らかとなり、NBS1 が老化に関与する可能性が浮上した。本共同研究では ATR-NBS1 経路の詳細を明らかにすることを目的として、プロテオーム解析による分子間相互作用の解明に取り組んだ。

前年度までの研究で、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 標識 NBS1 安定発現細胞株の樹立に成功していた。この細胞株 (GFP-NBS1 細胞) では、紫外線損傷に応答した GFP-NBS1 の局在変化が観察され、NBS1 の紫外線応答性が保持されていることが確認されていた。

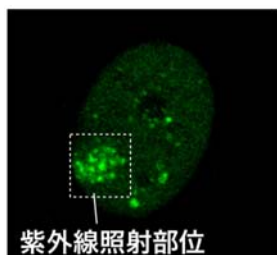


図 1. GFP-NBS1 の紫外線応答性

GFP-NBS1 細胞では、蛍光顕微鏡下で紫外線照射後の変化が明瞭に観察されるため、同様の変化がプロテオーム解析でも捉えられることを期待し、今年度の共同研究ではこの細胞株をプロテオーム解析に利用した。

細胞抽出液の抽出法や GFP 抗体による免疫沈降法の条件検討を行い、ウエスタンブロッティングによる実験条件の評価を行なった。NBS1 複合体の保存状態を確認するため、NBS1 結合タンパク質である RAD50 および MRE11 の沈降状況を、抗 RAD50 抗体、抗 MRE11 抗体によるウエスタンブロッティングで確認した。免疫沈降実験の最適条件を決めた後、銀染色によるバンド解析により、紫外線照射の有無で NBS1 結合タンパク質に違いがあるかどうか比較解析を行った。

実験の経過については適宜メールで連絡を取り、実験条件等の相談をしながら共同研究を進めた。また、まとまった実験結果については、加齢研の対応研究室を直接訪問し、データ分析や実験方針についてのディスカッションを行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

抗 GFP 抗体による免疫沈降の条件検討とウエスタンブロッティング実験により、GFP-NBS1 が効率よく抽出・沈降される条件を導き出した。この実験条件下では、GFP-NBS1 とともに RAD50 と MRE11 も効率よく沈降していることが確認され、分子間相互作用解明を目的としたプロテオーム解析実験に要求されるレベルのタンパク質状態が保持されていることが示された。これまでに、顕微鏡下で GFP-NBS1 が紫外線応答性を保持していることが確認されていたが、本研究の免疫沈降実験で確認された RAD50 および MRE11 との共沈降は、GFP-NBS1 が内在性 NBS1 と同様のタンパク質間相互作用能も保持していることを示す一例となった。

上記条件検討実験で得られた最適条件下で免疫沈降を行い、得られた GFP-NBS1 共沈物を SDS-PAGE で展開し、銀染色を行った結果、複数の結合タンパク質のクリアなバンドを得ることができた (図 2)。

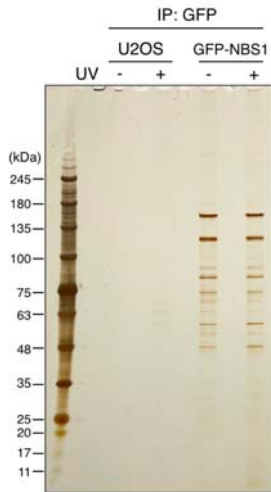


図 2. GFP-NBS1 での免疫沈降実験の結果

免疫沈降に用いる抗体としてアルパカ由来の抗体フラグメントを使用したことで、一般的に使用されるウサギやマウスの抗体で生じるバックグラウンドの問題を大きく改善することができた。紫外線照射の有無での違いについては、想定よりもわずかなものであったが、それぞれのタンパク質についての分析計画が進行中である。バックグラウンドレベルが極めて低く抑えられたクリアな結果であるため、得られるデータは特異性が高いものであると期待される。

(3-2) 波及効果と発展性など

GFP との融合は、細胞内蛍光観察を可能にするというメリットと同時に、標的タンパク質の機能を阻害するというリスクも持ち合わせている。GFP-NBS1 が紫外線応答性を保持しているというこれまでの観察結果に加え、本共同研究ではタンパク質間相互作用の保存性の一例も示され、GFP-NBS1 の有用性がより一層支持された。ATR-NBS1 経路解明のツールとして、今後も大いに貢献してくれると思われる。本研究の共沈降タンパク質の分析結果をもとに、さらに解析を進めていきたい。

プロテオーム解析の前にライブイメージングで標識タンパク質の機能保存性を確認できるという点は、GFP を利用する上での一番の大きな利点であり、また低バックグラウンドな免疫沈降を行うこともできるため、この方法の活用が他の多くのタンパク質の解析進展にも貢献すると考えられる。

[4] 成果資料

現時点では無し。