

課題番号 72

ゲノム恒常性維持機構における RNF8 のシグナル経路の解明

[1] 組織

代表者：中田 慎一郎
(大阪大学高等共創研究院)
対応者：宇井 彩子
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 20 万円

[2] 研究経過

【背景】

DNA2 本鎖損傷 (DNA double strand break : DSB) は致死的な DNA 損傷であり、またその異常修復は細胞がん化につながる。核内に発生した DSB は速やかに検出され、その情報がシグナルとして伝達・修復されるが、この一連のシグナリングは DNA 損傷応答 (DNA damage response: DDR) と呼ばれる。

この DDR において、ユビキチン化はリン酸化と並び中心的な翻訳後修飾であるが、その中核を担うのが E3 ユビキチンリガーゼ RNF8 および RNF168 である。この DDR におけるユビキチンシグナルの発見 (申請者: Science 2007, Cell 2009) 以降、ユビキチン依存的 DDR の役割や分子機構が世界中で精力的に研究されてきた。ここ約 10 年間に様々な研究成果が発表されてきたにもかかわらず、RNF8-RNF168 依存的な DDR には、いくつかの根本的な謎が未解明のまま残されており、分子機構の一部は「予想」や「論議中」の段階にとどまっている。

【目的】

本研究では RNF8 のターゲットのうち未だ議論が絶えない 2 つの分子である、①RNF168 が結合するターゲット分子 A、②RAP80 が結合するターゲット分子 B、を明らかにするのが目的である。この目的を達成するために、加齢医学研究所の宇井准教授が開発した、クロマチンテザリングの実験系を用いる。この実験系を用いて、以下の二点を解析し、RNF8 の真のターゲットを同定することを目的とする。

【実験計画】

- 1) 特定のクロマチンに RNF8 をテザリングさせ、RNF8 の下流のシグナルを検出する。
 - 2) RNF8 のユビキチン化のターゲット因子を免疫沈降により同定する。
- なお、社会情勢として研究室への訪問が難しかったため、WebEx による Web 会議を年度内に 2 回開催した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

- 1) 特定のクロマチンに RNF8 をテザリングさせ、RNF8 の下流のシグナルを検出する。
特定のクロマチンに RNF8 をテザリングさせるために、TetR と蛍光物質 Cherry のついたプラスミドを作成した。このようなプラスミドを、TRE サイトを約 200 コピーほどゲノムに持つ細胞にトランスフェクションした。約半日～1 日後、プラスミドの遺伝子が発現を確認した後に、固定を行い、そのクロマチン部位に結合するタンパク質、あるいはヒストン修飾因子などを免疫染色で検出した。その結果、下記の図 1 のように RNF8 経路のシグナルに関わる因子がクロマチンに結合することが観察できた。さらに細胞周期などを同調させ、RNF8 の下流のシグナルがどのように進むのかを観察した。

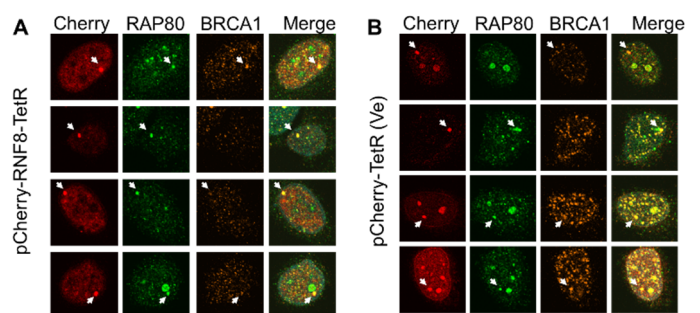


図 1. RNF8 のテザリング実験の結果。

- 2) RNF8 のユビキチン化のターゲット因子を免疫沈降により同定する。
上記の実験系が確立できたため、次に Cherry の後に RNF8 を融合させたプラスミドを細胞にトランスフェクションし、安定発現細胞の作成を試みた。3 度

トランスフェクションとセレクションを行ったものの、安定発現細胞は得られなかった。RNF8 の過剰発現はクロマチン上に過剰にユビキチン修飾を行い、それが細胞毒性を示したと考えられた。このため2)の方法は断念し、現在他の方法を模索中である。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究は RNF8 のユビキチンシグナル経路の未解明な領域を解き明かす新たな実験系の構築につながると考えられる。今後は更に実験系を発展させて、新たなメカニズムの解明につなげたい。

[4] 成果資料

発表成果なし