

課題番号 12

ゲノム安定性における RNF8 ユビキチン経路を制御する 新規因子の同定

[1] 組織

代表者：中田 慎一郎
(京都府立医科大学)
対応者：宇井 彩子
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 13 万円

[2] 研究経過

DNA 二本鎖損傷 (DNA double strand break : DSB) は致命的な 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、分子機構の一部はいまだ「予想」や「論議中」の段階にとどまっている。

この RNF8-RNF168 依存的な DDR のメカニズムを解明するために、加齢医学研究所の宇井准教授と共に、RNA8 経路の新規因子 A を同定した。その機能を解析したところ、家族性乳がん原因遺伝子の BRCA1 の機能を制御し、HR 活性を促進していることが明らかになった。さらに遺伝子 A の過剰発現により、DNA 修復に必要な因子の発現が低下し、DNA 損傷を誘導すること、既承認の PARP 阻害剤に感受

性になることが明らかになった。この遺伝子 A は乳がん細胞でも高発現していることが多数報告されているものの、上記の我々が見つけた機能はまだ報告されていない。そこで、宇井准教授に HR・DSB repair 因子の DSB への集積評価と、HR・DSB 修復活性の測定実験をご担当頂くことにより、この遺伝子 A の機能を解明すると共に、新たながん治療のターゲットの開発につなげたい。宇井准教授とはオンラインにより半年に1度ほど、打ち合わせを行った。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

今までの研究から、RNF8 経路にかかわる遺伝子のスクリーニングを行ったところ、この遺伝子 A が RNF8 経路にかかわる可能性が示された。そこでこの遺伝子を siRNA によりノックダウンすると、相同組み換え (HR) に関わる BRCA1 の DSB における結合が減少し、さらに非相同末端結合 (NHEJ) に関わる 53BP1 の DSB への結合が増加することが明らかになった。このことからこの遺伝子 A は HR を促進して、NHEJ を抑制することが明らかになった。

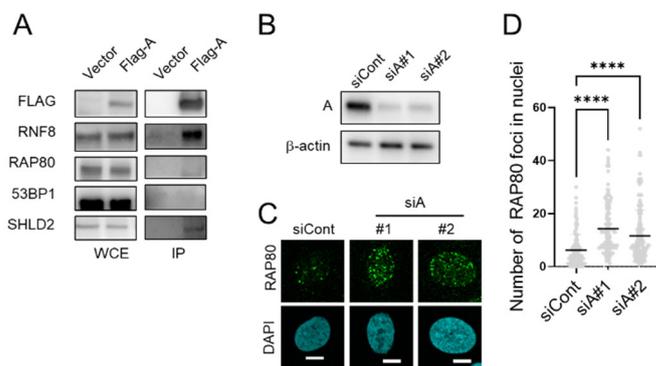


図1. 遺伝子 A の RNF8 経路における機能解析

そこで今回は、さらに遺伝子 A の RNF8 経路における機能の詳細について解析を進めた。この遺伝子 A と RNF8 経路の因子との相互作用を確認したところ、遺伝子 A は RNF8 と結合することが明らかになった (図 1A)。この遺伝子を siRNA でノックダウンした

状態で、その集積が RNF8 の下流の遺伝子である RAP80 の DSB への結合に影響するかを調べた (図 1 B~2D)。実際には siRNA をトランスフェクション試薬で細胞内に導入した細胞に、放射線を処理し、RAP80 の DSB 部位への RAP80 の結合を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、A をロックダウンすると、過剰に RAP80 が DSB 部位に過剰に結合することが明らかになった (図 1 C)。上記の図 1B を imageJ のソフトウェアを用いて数値化したものが、(図 1 D) である。

これらの結果から、遺伝子 A は RNF8 経路の因子である RAP80 の DSB への結合に関与することが明らかになった。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究から RNF8 のユビキチン経路の制御に関わる新規因子が見出された。遺伝子 A はがん細胞で過剰発現していることが報告されている。このため、本研究は RNF8 のユビキチンシグナル経路と細胞がん化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

今後は、さらに RNA8 における機能の評価を行う。この因子 A はがんでは加増発現しているため、さらに治療のターゲットとして機能解析を進め、この A の機能の意義が明らかになれば、より適した治療選択の基盤的研究になる可能性が見込まれる。

こちらは現在解析や実験が進行中の研究であり、未だ学会や論文で発表を行っていないが、今後は成果がまとまり次第、発表を行っていききたい。