

課題番号 28

ゲノム安定性に関わる DNA 損傷応答のメカニズムの解析

[1] 組織

代表者：金尾 梨絵

(東海国立大学機構名古屋大学
環境医学研究所)

対応者：宇井 彩子

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

益谷 央豪 (東海国立大学機構名古屋大学
環境医学研究所)

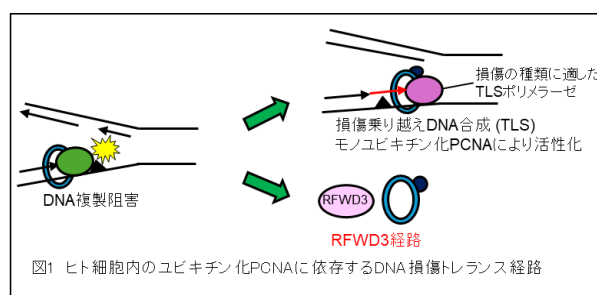
増田 雄司 (東海国立大学機構名古屋大学
環境医学研究所)

研究費：物件費 13 万円

[2] 研究経過

DNA 損傷は DNA 複製を阻害し、ゲノム不安定化から細胞のがん化や細胞死につながる。細胞はゲノム安定性を保つため、細胞周期チェックポイント機構、DNA 修復機構、DNA 複製阻害を解消する DNA 損傷トレランス機構などの DNA 損傷応答機構を備えている。DNA 損傷トレランス機構は複数の経路があり、分子メカニズムの解明が最も進んでいるのが損傷乗り越え DNA 合成 (Translesion synthesis; TLS) である。TLS では損傷のある DNA を鋳型として DNA 合成できる特殊な DNA ポリメラーゼ (TLS ポリメラーゼ) が損傷部分の DNA 複製を担うことで DNA 複製阻害を解消している。TLS 以外には、姉妹染色分体を利用する経路や、損傷部分の DNA 合成をスキップして複製を再開する経路などがあると考えられているが、ヒト細胞では詳細な分子メカニズムはまだ不明である。DNA 損傷トレランスには複製因子である PCNA のモノ、ポリユビキチン化が重要であり、モノユビキチン化 PCNA は TLS を促進する。我々は、PCNA のユビキチン化に依存した DNA 損傷トレランス経路で働く因子を探索し、ユビキチンリガーゼである RFWD3 を同定した (Kanao et al., Life Sci Alliance, 2022)。RFWD3 は TLS とは別の経路の DNA 損傷トレランスで重要な役割を果たすことを報告している。(図1) RFWD3 は DNA 修復機構の1つである鎖間架橋修復 (ICL 修復) に関与することが報告され

ていたが、我々は RFWD3 が DNA 損傷トレランスでは他の ICL 修復タンパク質とは独立して働いていることを明らかにしており、これは ICL 修復における機能とは別の機能があることを示唆している。また、RFWD3 のユビキチンリガーゼ活性は ICL 修復、DNA 損傷トレランスどちらにも重要であるが、ICL 修復で RFWD3 がユビキチン化する RPA のユビキチン化は DNA 損傷トレランスでは重要ではないことも報告している。



本研究は RFWD3 の DNA 損傷トレランスにおける機能を解析し、ヒト細胞の未解明の DNA 損傷トレランス経路のメカニズムを明らかにし、細胞のがん化やがん細胞の増殖機構について新たな知見を得ることを目的として研究を行った。

RFWD3 が関与する DNA 損傷トレランスのメカニズムを明らかにするために、RFWD3 の細胞内相互作用因子の解析に着手した。RFWD3 相互作用因子を解析するためにエピトープタグを付加した RFWD3 を発現する細胞株を作出した。エピトープタグの種類や免疫沈降の実験方法について宇井准教授とメールにて一度、両名参加の学会会場にて対面で一度打ち合わせを行った。

[3] 成果

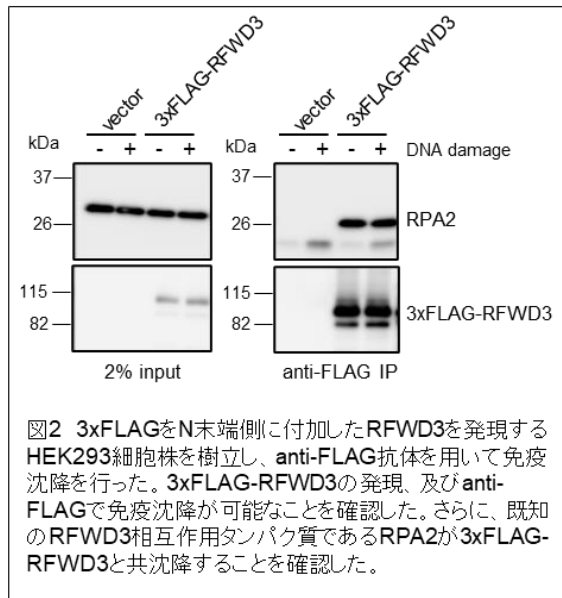
(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第1にエピトープタグを付加した RFWD3 を発現するヒト細胞株を樹立した。当初、RFWD3 の N 末端側に FLAG タグを付加し、細胞に導入後、免疫沈降実験を行ったところ、汎用されている抗 FLAG 抗体では認識できないことが分かった。そのため、免疫沈降産物を質量分析で解析する実験には不適と判断し、新たに 3xFLAG タグを付加した RFWD3 を発現する細胞株を樹立した。免疫沈降を行ったところ、汎用されている抗 FLAG 抗体で 3x

FLAG-RFWD3 が認識できることが分かった。

第2に樹立した細胞株を用いて、免疫沈降実験を行ったところ、既知の RFWD3 相互作用因子である RPA 2 (replication protein A 2) との相互作用が検出できた。(図 2) このことから、樹立した細胞株を用いることで、RFWD3 が細胞内で機能する際に相互作用する因子の解析を行うことが可能であると考えられた。



(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究により、RFWD3 の DNA 損傷トレランスにおける機能を解析するための研究試料を得ることができた。本共同研究をさらに進めることにより、未解明の DNA 損傷トレランス経路の分子メカニズムを明らかにし、細胞のがん化やがん細胞の増殖メカニズムに関する新たな知見に発展することが期待される。

[4] 成果資料

当初予定していたよりも実験系の立ち上げに時間を要したため、本年度成果発表は行っていない。今後、成果を発表していく。