

課題番号 67

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

(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)

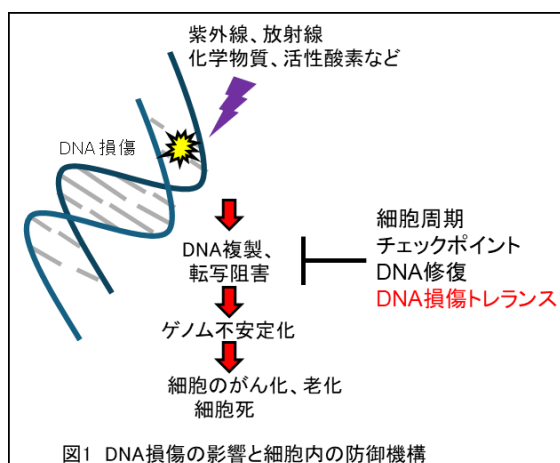
分担者：益谷 央豪 (名古屋大学環境医学研究所)

増田 雄司 (名古屋大学環境医学研究所)

研究費：物件費 10 万円

[2] 研究経過

DNA 損傷は複製や転写を阻害し、ゲノム不安定化から細胞のがん化や老化、さらには細胞死を引き起こす。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や DNA 修復機構、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 (図 1)。



本研究では DNA 損傷応答機構のうち、DNA 損傷による複製阻害を解消し、複製の破綻を防ぐことでゲノム安定性を維持する、DNA 損傷トレランス機構に着目している。DNA 損傷トレランスには複数の経路がある。その一つが損傷乗り越え DNA 合成 (translesion synthesis; TLS) で、損傷のある DNA を鋳型に DNA 合成する特殊な DNA ポリメラーゼ (TLS ポリメラーゼ) が損傷部分を複製することで複製阻害を解消している。DNA 損傷トレランスにはその他に、姉妹染色分体を利用する経路などが提唱されているが、ヒト細胞では TLS 以外の経

路の分子メカニズムは不明な点が多い。我々はヒト細胞において、TLS とは別の経路に関わる新たな DNA 損傷トレランス因子として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 は一本鎖 DNA 結合タンパク質である RPA をユビキチン化し、相同組換えに関与することが報告されている。我々は DNA 損傷トレランスにおいて、RFWD3 のユビキチンリガーゼ活性は重要であるが、RPA 以外の基質タンパク質が存在することを示唆している。

本研究は、ゲノム安定性に関わる DNA 損傷トレランスのメカニズムを明らかにし、細胞のがん化のメカニズム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。特に、未だ同定できていない DNA 損傷トレランスにおける RFWD3 の基質タンパク質を明らかにし、RFWD3 の関わる DNA 損傷トレランス経路のメカニズムの解明を目指し、解析を行った。

以下、研究活動状況の概要を記す。RFWD3 の基質タンパク質を明らかにするため、細胞内で RFWD3 と相互作用する因子、及び近接因子の探索に着手した。エピトープタグを付加した RFWD3 を恒常的に発現する細胞株を名古屋大学にて作出し、DNA 損傷存在下、非存在下において RFWD3 と共沈するタンパク質を検出するための条件検討を行った。実験方法などについて宇井准教授とオンライン、及び両名参加の学会会場にて対面で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。

①RFWD3 は自己ユビキチン化する可能性が示唆されており、野生型よりもユビキチンリガーゼ活性を欠失した変異体が細胞内で安定であることが知られている。そのため、野生型に加えて変異体 RFWD3 の N 末端側に 3xFLAG タグを付加し、安定発現する HEK293 細胞を樹立した。この細胞株を用いて抗 FLAG 抗体を用いて DNA 損傷の存在下、非存在下で免疫沈降を行い、沈降タンパク質を検出した (図 2)。既知の RFWD3 相互作用因子である RPA のサブユニット RPA2 が 3xFLAG-RFWD3 と共沈降さ

れた。変異体 RFWD3 は野生型 RFWD3 より発現量が多く、変異体 RFWD3 と共沈する RPA2 は野生型 RFWD3 を用いた場合よりも多いことが分かった。しかし、銀染色で沈降画分を検出した結果、ネガティブコントロールである空ベクター導入細胞と 3xFLAG-RFWD3 共沈降画分に顕著な差が見られず、さらに沈降した RFWD3 のバンドが銀染色で明確に判定できなかった。このことから、RFWD3 の細胞内発現量が不足しており、この方法で RFWD3 相互作用因子を検出するのが困難であるとの認識を宇井准教授と共有した。発現量を増加させるため、宇井准教授のグループで用いている発現誘導系を使用することとし、発現コンストラクトを作成し、細胞の樹立に着手した。

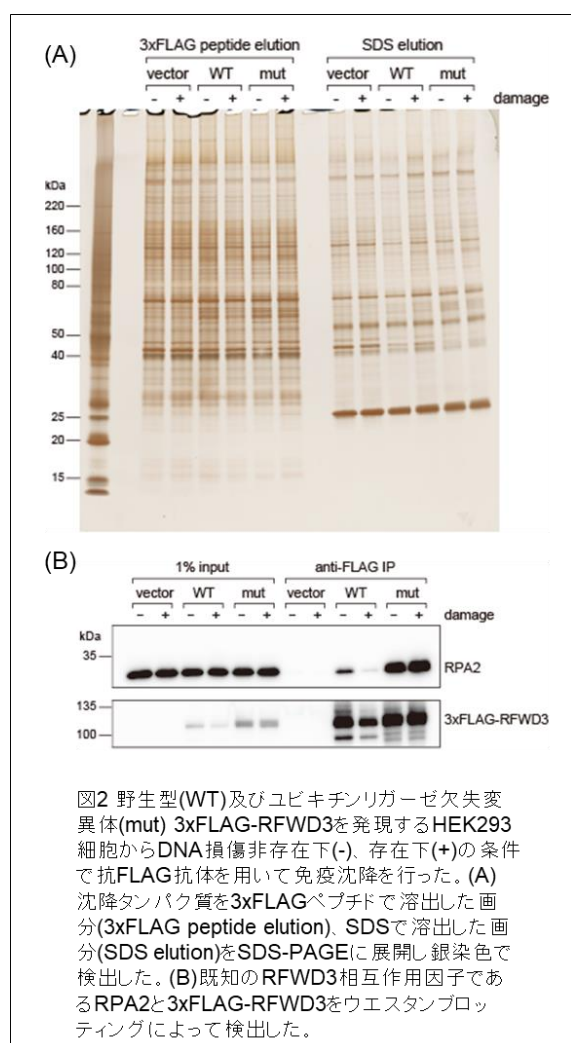


図2 野生型(WT)及びユビキチンリガーゼ欠失変異体(mut) 3xFLAG-RFWD3を発現するHEK293細胞からDNA損傷非存在下(-)、存在下(+)の条件で抗FLAG抗体を用いて免疫沈降を行った。(A)沈降タンパク質を3xFLAGペプチドで溶出した画分(3xFLAG peptide elution)、SDSで溶出した画分(SDS elution)をSDS-PAGEに展開し銀染色で検出した。(B)既知のRFWD3相互作用因子であるRPA2と3xFLAG-RFWD3をウエスタンブロットティングによって検出した。

いた。今後、ビオチンリガーゼ活性の確認と、ビオチン標識タンパク質の解析を行う予定である。

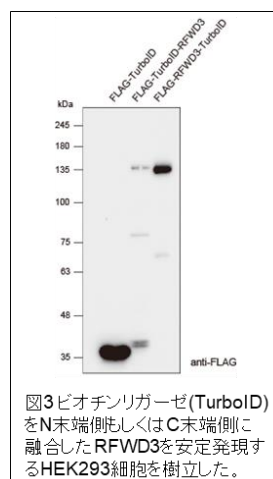


図3 ビオチンリガーゼ(TurboID)をN末端側もしくはC末端側に融合したRFWD3を安定発現するHEK293細胞を樹立した。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究で、得られた研究試料により DNA 損傷トレランスにおける RFWD3 の機能解析を進め、DNA 損傷トレランスの新たな分子機構を明らかにすることができる。本研究をさらに進めることにより、DNA 損傷応答機構の分子基盤の理解に貢献し、細胞のがん化メカニズムに関する新たな知見が得られると期待される。今後、新規抗がん剤の創薬への発展も期待される。

[4] 成果資料

当初の実験計画では解析が困難であり、実験系の変更があったため、本年度、成果発表は行わなかった。今後学会や論文で成果を発表していく。

②RFWD3の細胞内近接因子を近接依存性ビオチン標識法により探索するため、ビオチンリガーゼをN末端側、及びC末端側に融合したRFWD3を発現するコンストラクト及び安定発現細胞の樹立を行った(図3)。ビオチンリガーゼは標識時間の短い大腸菌由来のBirAタンパク質変異体(TurboID)を用