

様式3

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

平成 29 年 4 月 26 日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所属機関・部局名 国立研究開発法人量子化科学技術研究開発機構  
放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部  
職 名 主任研究員  
研究代表者名 安田 武嗣

下記のとおり平成28年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号:281004)

1. 共同利用研究 課題名	非ヒストンタンパク質のアセチル化修飾を介した DNA 損傷応答制御機構の解明		
2. 共同利用研究 目的	非ヒストンタンパク質のアセチル化修飾による、DNA 修復やアポトーシス、細胞の未分化維持・分化誘導などの生命現象を制御する機構を解明することを本共同利用研究の目的とする。		
3. 共同利用研究 期間	平成 28 年 7 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日		
4. 共同利用研究組織			
氏 名	所属部局等	職名等	役割分担
(研究代表者) 安田 武嗣	放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部 組織再生治療研究チーム	主任研究員	生化学および細胞生物学的実験
(分担研究者)			
5. センター内受入研究者	研究部門・ 分野名	シグナル統合経路研究部 門・ゲノム機能制御研究分野	氏 名 菅澤 薫

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

#### 6. 共同利用研究計画

我々は、これまでに、DNA 損傷応答に関連したヒトのタンパク質について、精製した p300 および CBP ヒストンアセチル化酵素を用いた試験管内のアセチル化修飾反応実験によって、アセチル化修飾を受ける新規タンパク質を7つ同定した。この中で、まだアセチル化部位を同定できていない 2 つのタンパク質について、質量分析によりアセチル化部位を同定し、アセチル化部位変異体を作製する。次に、培養細胞に野生型あるいはアセチル化部位変異型を発現させ、アセチル化部位がそのタンパク質の機能に与える影響を調べる。また、精製タンパク質を用いた試験管内の実験によって、アセチル化修飾やアセチル化部位変異がタンパク質の生化学的活性に影響を与えるのかどうかを調べる。特に、紫外線損傷修復に関わるタンパク質については、アセチル化部位変異体を発現させることによる細胞の紫外線損傷修復に与える影響を損傷塩基に対する抗体を用いた ELISA 法によって調べる。また、同定したタンパク質の中には、修飾部位がユビキチン化や SUMO 化修飾を受けるものも含まれており、アセチル化とこれらの修飾との関連についても調べる。

#### 7. 共同利用研究の成果

アポトーシス誘導を制御する3つのタンパク質が、p300/CBP ヒストンアセチル化酵素によってアセチル化修飾を受けることを明らかにしていた。この中で、アセチル化部位を同定できていなかった2つのタンパク質を大腸菌で発現させて精製し、*in vitro* でアセチル化させた精製タンパク質のアセチル化部位を、理化学研究所の堂前博士らとの共同研究により質量分析によって解析中である。一方、すでに7カ所のアセチル化部位を同定していたアポトーシス制御タンパク質について、7カ所のアセチル化部位をアルギニンに置換した 7xR 変異体を用いた *in vitro* のアセチル化反応の実験の結果、7xR 変異によりアセチル化修飾が減少するが、それでもまだアセチル化が起きていることが判明した。そこで、このタンパク質の残りのアセチル化部位を同定するために、7xR 変異体を *in vitro* でアセチル化させたものなどを用いて、質量分析を行っている。

DNA 複製や DNA 修復に関わる別のアセチル化されるタンパク質については、8カ所のアセチル化部位を同定していた。この部位をアセチル化されないアルギニンやアセチル化類似変異として用いられているグルタミンに置換した変異遺伝子の発現ベクターを作製した。発現ベクターを Tet-on 細胞である T-Rex-293 にトランスフェクトして、ベクターが安定に組み込まれた細胞を作製した。この実験で、全てのアセチル化部位や C 末側の部位が変異した遺伝子はトランスフェクト効率が低下する傾向があったことから、C 末側のアセチル化部位が細胞増殖に影響を与える可能性が示唆された。

DNA 相同組換えに関わるヒト RAD52 タンパク質は、*in vitro* で p300 および CBP と直接相互作用してアセチル化されること、また細胞内では DNA 二重鎖切断後にアセチル化修飾を受けることを明らかにしていた。細胞染色の実験の結果、RAD52 と p300 および CBP は、DNA 二重鎖切断部位で共局在していた。また、クロスリンカーを用いて細胞内のタンパク質間相互作用を調べた結果、細胞内でも RAD52 は p300 および CBP と相互作用することが確認された。さらに、siRNA で p300 と CBP をノックダウンすると、DNA 二重鎖切断後の RAD52 のアセチル化が阻害されたことから、細胞内でも RAD52 は p300/CBP によってアセチル化されることを示すことができた。明星大学の香川博士らとの共同研究で、DNA 相同組換えに関わる RAD52 の精製タンパク質を用いた実験により、RAD52 の1本鎖 DNA 結合活性がアセチル化修飾により促進されることが明らかになった。

#### 8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本センターの担当教員の氏名の記載、又はこの共同利用研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

#### 9. 共同利用研究に関連した受賞、博士学位論文の取得、大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。