

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 27 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 東北医科薬科大学・医学部
 職 名 助教
 研究代表者名 加藤晃弘

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: 282001)

1. 共同利用研究 課題名	紫外線に応答した NBS1 の核内挙動とゲノム維持機能の解析			
2. 共同利用研究 目的	貴センターが保有する紫外線損傷応答に関する貴重なリソースを活用し、ゲノム安定性維持機構における NBS1 遺伝子の新規分子機能を解明する。			
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) 加藤晃弘	東北医科薬科大学・医学部・ 医学科・放射線基礎医学教室	助教	実験と総括	
(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	酒井 恒

※ 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

紫外線によるNBS1の核内挙動の細胞周期特異性を観察するため、S期の細胞をBrdUでパルスラベルしてlocal UV irradiationを行い、NBS1の集積がDNA複製にカップルした現象なのかどうかを調べる。紫外線照射には受入研究者所属研究室所有の紫外線照射装置を用いる。同様の実験を細胞周期同調させた細胞で行い、紫外線によるNBS1の核内動態と細胞周期との関係を明らかにする。また、同研究室所有の紫外線点照射機能付き蛍光顕微鏡を使用し、紫外線照射時のGFP-NBS1の挙動を生細胞のまま経時観察し、DNA二重鎖切断(DSB)と紫外線損傷への集積メカニズムの違いを明らかにする。さらに、紫外線応答機能を欠いたNBS1変異細胞でのゲノム不安定性を定量測定するため、微小核試験と突然変異頻度測定を行う。他のDNA複製阻害剤処理後に同様の実験を行い、複製阻害との関連を明らかにする。

7. 共同利用研究の成果

マイクロポアフィルターメンブレンを用いた紫外線局所照射を行い、紫外線損傷であるシクロブタン型ピリミジンダイマー(CPD)に対する抗体で免疫染色を行うことで、紫外線DNA損傷の有無を常に可視化しながら、NBS1の局在観察に適切な紫外線照射条件が決定できた。

BrdUでS期の細胞を標識した実験からは、NBS1の紫外線損傷への集積はS期特異性が高いことが示された。NBS1の集積がS期特異的であるという結果は、DNA複製との関わり、特にDNA複製フォークの進行との関連を推測させるものである。

生きた細胞の中でGFP-NBS1が紫外線局所照射部位に集積することも観察され、ライブセルイメージング実験の基盤も確立された。紫外線照射装置一体型顕微鏡を用いた紫外線点照射部位への集積観察では、照射からある程度の時間が経過しないとNBS1の集積が見られないことが明らかとなった。この結果は、紫外線損傷を修復するヌクレオチド除去修復タンパク質XPC等が照射直後に集積するのは異なっており、NBS1集積までの細胞内シグナル伝達メカニズムが興味深い。また、 γ 線照射で照射直後にNBS1がDSBに集積することも対照的であり、紫外線損傷部位へのNBS1の集積は、DSBへの集積メカニズムとは異なることが示唆された。実際、DSBへのNBS1の集積はタンパク質リン酸化酵素ATMに依存しているのに対し、紫外線照射部位への集積はATM非依存的であることが明らかとなった。

紫外線損傷応答に機能欠損をもったNBS1変異細胞では、染色体不安定性が増加しており、これはDNA複製阻害剤処理によりさらに顕著となった。この結果は、紫外線損傷応答におけるNBS1の機能が、DNA複製時におけるゲノム安定性維持機構に関連したものであることを示唆している。

これらの成果は、受け入れ研究室が保有する実験設備、実験技術、解析法を有効活用することで得られたものであり、また、受け入れ教員を含め貴センター所属教員とのディスカッションが研究推進の大きな手助けとなった。

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。)

なし

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。

なし