

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 30 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 量研機構 放医研・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29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 29 年 4 月 1 日 ～ 平成 30 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)	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 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つ同定していた。この中で、アセチル化部位が同定できているタンパク質に関して、アセチル化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のグルタミンに置換したタンパク質を細胞内で発現させてその影響を調べることで、アセチル化の役割を明らかにする。特に、DNA 二重鎖切断 (DSB) 損傷の修復に関わるヒトの RAD52 タンパク質のアセチル化修飾については、アセチル化部位の変異が DNA 相同組換え修復に与える影響を分子レベルで明らかにする。また、同定しているタンパク質の中で、DNA 複製などに関連した機能を持つタンパク質については、T-Rex-293 細胞を用いた目的タンパク質の Tet-on 発現細胞をすでに作製しており、この細胞を用いてテトラサイクリンの添加によりアセチル化部位変異タンパク質を発現させた場合に細胞増殖が影響を受けるのかどうかを調べることで、このタンパク質のアセチル化修飾が DNA 複製に関わるのかどうかを明らかにする。

7. 共同利用研究の成果

DNA 複製の関わるタンパク質については、アセチル化部位変異タンパク質の発現を誘導しても、細胞増殖には影響がなかった。これは、内在性のタンパク質量が多いためであることがわかり、内在性のタンパク質の発現だけを特異的に抑制する実験系を作製した。この実験系を用いて、解析をやり直す予定である。

ゲノム編集により、RAD52 のアセチル化部位変異遺伝子が本来のプロモーターにより発現するノックイン細胞を作製して、アセチル化修飾の役割について調べた。その結果、RAD52 がアセチル化されない場合は、RAD52 や RAD51 修復タンパク質が DSB 部位に集まった後、これらが修復途中で DSB 部位から解離してしまい、それにより相同組換え修復が阻害されるという結果が得られ、RAD52 のアセチル化は相同組換え修復に必要であることが明らかになった。さらに、酵母 two-hybrid 法によって、定量的にタンパク質間相互作用を調べた結果、RAD52 のアセチル化類似変異により、RAD52 同士の相互作用や、RAD52 と RAD51 あるいは一本鎖 DNA 結合タンパク質複合体 RPA の RPA1、RPA2、RPA3 各サブユニットとの相互作用の強さがいずれも上昇した。また、我々は、RAD52 はアセチル化により1本鎖 DNA に対する結合力が上昇する結果を得ている。これらの実験結果から、RAD52 のアセチル化は、DSB 末端に生じる 1 本鎖 DNA との結合能力や、DSB 部位に集まる RAD51 や RPA の修復タンパク質との相互作用の強さを制御していることが明らかになった。これは、様々な反応ステップを必要とする複雑な相同組換え修復において、多彩な生化学的活性を示す RAD52 が様々な役割を果たすために必要であることが示唆された。RAD52 のアセチル化修飾に関する共同利用研究成果を PLOS Genetics 誌で発表した。

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。)

Takeshi Yasuda, Wataru Kagawa, Tomoo Ogi, Takamitsu A. Kato, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, Kazuya Takizawa, Yuka Nakazawa, Matthew D. Genet, Mika Saotome, Michio Hama, Teruaki Konishi, Nakako Izumi Nakajima, Masaharu Hazawa, Masanori Tomita, Manabu Koike, Katsuko Noshiro, Kenichi Tomiyama, Chizuka Obara, Takaya Gotoh, Ayako Ui, Akira Fujimori, Fumiaki Nakayama, Fumio Hanaoka, **Kaoru Sugasawa**, Ryuichi Okayasu, Penny A. Jeggo, Katsushi Tajima, “Novel Function of HATs and HDACs in Homologous Recombination through Acetylation of Human RAD52 at Double-Strand Break Sites”, PLOS Genetics 14(3):e1007277. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007277>

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。