

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 13 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 柳原 晃弘

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: 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 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) 柳原 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

NBS1 が S 期の細胞の紫外線損傷部位特異的に集まっている可能性を確認するため、BrdU でパルスラベルした細胞に局所紫外線照射を行い、代表的紫外線損傷である CPD に対する抗体と NBS1 抗体、BrdU 抗体で共染色を行い顕微鏡観察する。また、紫外線照射後に NBS1 が集まっている場所に DNA 二重鎖切断 (DSB) が無いことを確認するため、DSB の指標である 53BP1 の抗体と NBS1 抗体の共染色を行う。NBS1 局在の紫外線照射後の経時変化を観察するため、受け入れ研究室で新規に導入された紫外線点照射機能付き共焦点顕微鏡で GFP-NBS1 の挙動変化を経時観測する。NBS1 の紫外線照射部位への集積に、NBS1 タンパク質のどこが必要なのかを特定するため、N 末端欠失 NBS1、C 末端欠失 NBS1 の局在変化を同様に観察する。またノックダウン実験により NBS1 の局在変化に必要な因子の探索を行う。これらの実験結果をもとに、NBS1 集積欠損による紫外線誘発ゲノム不安定化への影響についても評価する。

7. 共同利用研究の成果

NBS1 の免疫染色と同時に、S 期指標として BrdU、紫外線損傷として CPD を同時に染色することで、BrdU 陽性細胞での CPD 生成部位特異的に NBS1 が集積することが直接的に観察された。この結果は、紫外線損傷部位への NBS1 の集積反応が S 期特異的であることを強く示唆するものである。この結果から推測される通り、GFP-NBS1 発現細胞を用いたライブセルイメージング実験では、紫外線を照射しても全ての細胞で NBS1 の局在変化が見られるわけではなく、どの細胞に照射すれば良いかということが問題となった。紫外線照射による局在変化観察のためには S 期の細胞に照射する必要があり、ライブセルイメージングでのデータ収集のためには S 期の細胞を生きたまま標識・識別することが今後の課題である。

NBS1 集積部位に DSB が生じているかどうかを、DSB マーカーである 53BP1 およびリン酸化 H2AX 特異的抗体を用いた免疫染色により調べた結果、紫外線損傷部位にこれらのマーカーも強く局在することが観察された。本研究での紫外線照射線量では DSB は生じないという他のグループの報告があったため、この結果は予想に反するものであった。DSB を生じることが明白な電離放射線照射実験では、これらのタンパク質が DSB マーカーとして利用されているものの、本研究での紫外線照射後の実験結果でも同じように DSB の存在を示しているのかどうかについては、さらなる調査が必要である。

免疫染色でのサンプル調整法を変えることで、NBS1 の局在パターンが二種類存在することを示唆する結果が得られた。この結果は予想外の結果であり、今後さらなる調査が必要である。NBS1 の部分欠失断片を用いた局在解析実験からは、紫外線での局在変化に C 末端領域は不要であることが示されたものの、新たに確立されたサンプル調整法での再調査も必要である。

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