

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 31 年 4 月 30 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30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を介した、DNA 修復や細胞増殖などの重要な生命現象の制御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 30 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 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	量子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 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6～9の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6～9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

ヒト RAD52 タンパク質は、p300 及び CBP によりアセチル化され、SIRT2 及び SIRT3 によって脱アセチル化される。これまで、RAD52 のアセチル化修飾は、相同組換え(HR)による DNA 二重鎖切断(DSB)修復に必要であることを明らかにしていた。また、RAD52 の脱アセチル化酵素の SIRT2 あるいは SIRT3 を siRNA でノックダウンすると、細胞内の HR 修復が阻害される結果を得ていた。そこで、このメカニズムをさらに明らかにするために、RAD51 など相同組換えに関わるタンパク質の DNA 二重鎖切断部位への局在についての影響を、細胞染色により調べる。また、非相同末端結合(NHEJ)修復など、HR 以外の DNA 二重鎖切断修復に、SIRT2 と SIRT3 が関わるのかどうかを調べる。

ヒト RAD52 のアセチル化修飾をモデルにして、酵素化学反応に量子効果が関わっているのかどうかを調べる。酵素化学反応は、これまで、生化学的に分子のレベルや、構造生物学的に原子のレベルで解析されてきた。一方、酵素による化学結合の切断や連結において、化学結合に関わる電子は、量子的な振る舞いをすることが予想される。化学反応において、触媒は、反応の出発物質と反応中間体を形成することで、活性化エネルギーがより低い別の反応経路を生み出し、反応速度を速める。これに関して、量子力学においては、電子や陽子などの軽い粒子は、反応に必要な障壁の山を、トンネルを潜り抜けるようにすり抜けるという量子トンネル効果が存在する。この理論が関連する現象として、化学反応の結合に関わる原子について、この原子を質量が異なる同位体に置き換えると反応速度が変化するという速度論的同位体効果が存在する。より重い原子を含む結合を切断するためには、より多くのエネルギーが必要であり、反応速度は低下する。従って、速度論的同位体効果を指標にして、RAD52 のアセチル化修飾酵素の酵素化学反応について、量子効果が関わるのかどうかを調べる。

7. 共同利用研究の成果

ヒト細胞における、様々な DSB 修復経路の頻度を、ゲノムに組み込まれたレポーター遺伝子を用いて調べることができる様々な細胞が開発されている。これらの細胞では、I-SceI の DNA 切断酵素を細胞で発現して、不活性型の GFP レポーター遺伝子内に存在する I-SceI 切断部位で特異的な DSB を誘導する。このようにして生じた DSB が、HR や NHEJ など特定の修復経路で修復された場合だけ、活性のある GFP 遺伝子が生じるため、GFP ポジティブ細胞の出現頻度により特定の DSB 修復の効率を調べることができる。この方法を用いて、NHEJ 修復における SIRT2 及び SIRT3 の関与を調べた。NHEJ 修復に関わる DNA-PKcs の阻害剤を細胞に添加すると、確かに HNEJ 修復が阻害された。しかし、SIRT2 及び SIRT3 のノックダウンでは、NHEJ 修復に対する阻害的影響は無く、むしろ HNEJ 修復効率が若干促進された。この効果は、HR 修復に関わる RAD52 をノックダウンした場合にも現れた。したがって、SIRT2 及び SIRT3 のノックダウンは、HR 修復経路を阻害することで、NHEJ 修復経路による DSB 修復を促進したと考えられた。RAD52 は、一本鎖 DNA アニールリング(SSA)修復に関わっているが、SIRT2 及び SIRT3 は、SSA 修復には関わっていなかった。SIRT2 と SIRT3 をノックダウンすると、HR 修復が阻害されたが、これは、DSB 部位への RAD51 の局在が阻害されたためであることが、細胞染色による実験結果から明らかになった(共同利用研究成果の論文執筆中)。

RAD52 のアセチル化修飾の酵素化学反応に関して、原子量1の水素(H)からなる水の H_2O 、あるいは原子量2の重水素(D)からなる重水 D_2O を、酵素反応の反応バッファー溶液に用いて、速度論的同位体効果が検出されるのかどうかを調べた。水が化学反応に直接関与していない、p300 による RAD52 のアセチル化反応では、反応溶液に、 H_2O を用いても D_2O を用いても、反応速度に有意な差が無かった。一方、アセチル化した RAD52 が SIRT3 により脱アセチル化される反応では、溶液中の水分子が直接化学反応に関与している。この場合は、反応溶液に H_2O を用いた方が、 D_2O を用いた場合よりも、反応速度が有為に速くなった。この影響は、様々な試薬メーカーの H_2O や D_2O を用いて比較しても、同様に検出された。このように、RAD52 の SIRT3 による脱アセチル化の触媒化学反応には速度論的同位体効果が現れたことから、この化学反応には量子トンネル効果が関与していることが示唆された(共同利用研究成果の論文執筆中)

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。