

研究題目 小児遺伝病ファンconi貧血原因遺伝子 SLX4 の UBZ ドメイン 結合タンパク質の同定

研究組織

研究代表者：高田 穰（京都大学大学院生命科学研究科附属放射線生物研究センター）

共同研究者：小迫 英尊（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：勝木 陽子（京都大学大学院生命科学研究科附属放射線生物研究センター）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

ファンconi貧血 (FA)は骨髄不全、奇形、高発がん性を特徴とする小児の遺伝性疾患である。造血分化に伴う細胞内代謝により発生したアルデヒドがつくる DNA クロスリンク損傷 (ICL) の修復不全によって、造血幹細胞が障害され、本疾患を発症することが示唆されている。FA の原因遺伝子のひとつ *SLX4/FANCP* は、構造特異的エンドヌクレアーゼ複合体の構成因子で、N 末端に UBZ4 型ユビキチン結合モチーフをもつ。この UBZ4 ドメインのホモ欠失変異によってファンconi貧血を発症すること、またユビキチン結合能のない変異体の発現細胞は、ICL 誘導剤に高感受性を示すことから、このドメインが修復に必須であることは明らかである。

既報において、*SLX4* UBZ4 は K63 ポリユビキチン鎖に結合し、DNA 損傷部位への集積に機能することが報告された。*SLX4* の損傷部位への局在にはユビキチン化経路の介在が強く示唆されるが、このドメインに結合するユビキチン化基質や E3 ユビキチンリガーゼは報告されていない。本共同利用では、*SLX4* の UBZ4 ドメインが結合するユビキチン化タンパク質を同定する目的でプロテオーム解析を行った。

[1-2]研究の方法・経過

これまで代表者らは、DNA クロスリンク修復に必須のドメインが集中している *SLX4* の N 末部分の配列 (約 N 末半分に相当) を GFP 融合タンパク質 (GFP-*SLX4*-N) として細胞に発現させ、*SLX4* の UBZ4 依存的な損傷部位への局在を単純化・明瞭化できるシステムを樹立した。その細胞で約 760 遺伝子の siRNA ライブラリーを用いてスクリーニングを行った結果、*SLX4*-N の損傷集積に必要な E3 リガーゼ RNF168 を同定した (リバイズ論文を投稿中)。本研究ではこの細胞株を用いて、UBZ4 結合タンパク質を同定するため、小迫教授のご協力のもとプロテオーム解析に用いるサンプルの調整を行った。サンプルには、UBZ4 ドメイン野生型、およびユビキチン結合能をもたない変異型の GFP-*SLX4*-N を、レンチウイルスベクターによって恒常的に発現した2種類のヒト細胞株を用いた。DNA クロスリンク損傷誘導剤マイトマイシン C (MMC) 処理前後のサンプルで、低濃度ホルムアルデヒドによるタンパク質間架橋を行い、0.05%SDS, 0.25%デオキシコール酸ナトリウムと Benzonase を含む HEPES-RIPA バッファーにて細胞抽出液を調整し、*SLX4*-N の免疫沈降後質量分析を行った。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

UBZ4 野生型および変異型の GFP-SLX4-N 発現細胞株から細胞抽出液を調製し、小迫教授のグループによって GFP-Trap を用いた免疫沈降-質量分析が行われた。損傷後の UBZ4 野生型 SLX4-N 発現サンプルで検出数が比較的高く、未処理、ならびに UBZ4 変異体発現サンプルでは低いタンパク質がいくつか同定され、SLX4 UBZ4 結合因子の候補を得た。一方、十分量の細胞数を用いたにもかかわらず、検出された SLX4 自身の PSM(peptide spectrum matches)が比較的少なかった点、また代表者らの過去の実験データから、SLX4-N はやや難溶性のタンパク質であり、今回溶出に用いた条件では、DNA 損傷部位に集積した SLX4-N を十分に可溶化できていない可能性が考えられた。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

これまでに全長 SLX4 タンパク質の会合因子を質量分析により同定、報告した論文はあるが、DNA 損傷に応答して SLX4 UBZ4 が結合するユビキチン化タンパク質はいまだ明らかにされていない。その原因として、まず第一に、SLX4 細胞内局在がテロメアを含み、数々の会合分子が存在するため、解析が困難であることがあげられる。さらに、UBZ4 と結合因子との相互作用が一過性であること、不安定であること、等が考えられ、サンプル調整から免疫沈降のステップで、両者の会合が失われやすい可能性があげられる。われわれが樹立した SLX4-N 発現細胞株は、UBZ4 依存的な SLX4 の損傷集積にかかわる因子の探索により適していると考えている。小迫博士のグループですでに確立されている、ホルムアルデヒドによるタンパク質間架橋後の GFP-Trap 法や、難溶性タンパク質の会合因子の同定に強い近位依存性ビオチン標識法 (BioID) を行うことで、SLX4 UBZ4 が結合しているユビキチン化基質を同定することができれば、造血系の維持やゲノム安定性に必要な未知の分子機構の一端を解明できると考えている。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表
なし

[3-2]学会発表
なし

[3-3]成果資料等
なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

今年度の共同利用で、SLX4-N 発現細胞を用いた損傷依存的な UBZ4 結合因子の探索の可能性が示されたが、今回の条件では SLX4-N が抽出液中に十分に可溶化されなかった可能性がある。バッファーをより高塩濃度にする、グアニジン塩酸塩、尿素など変性剤を添加する、Benzonase 反応後に SDS 濃度をあげる、等可溶化条件を検討し、最適化する必要がある。また GFP-Trap 法での同定が困難であると判断した場合は、TurboID 融合 SLX4-N 発現細胞を用い、BioID 法を試みる予定である。