

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 (Fanconi anemia, FA)は再生不良性貧血、身体の奇形、白血病や固形がんの好発性を特徴とする小児の重篤な遺伝性疾患である。造血分化の過程で生じる DNA クロスリンク損傷 (DNA interstrand crosslink, ICL) が正常に修復されず、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スキヤフォールド因子で、N 末端に UBZ4 型ユビキチン結合モチーフをもつ。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などから、このドメインが DNA 修復と FA 発症抑制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。したがって *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、その経路にかかわる因子はあきらかにされていない。代表者らのグループは、本課題の前段階となる研究において、この経路にかかわる E3 ユビキチン化酵素 RNF168 を同定した(Katsuki Y and Takata M *et al.*, Cell Rep, 2021)。本研究では前研究で用いた方法を改変し、*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。昨年度の共同利用研究において、UBZ4 野生型および変異型の GFP-*SLX4*-N 発現細胞株から HEPES-RIPA バッファーで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。その結果、損傷後クロマチンに存在する *SLX4*-N は難溶性で、可溶化が不十分であった可能性が課題として残った。

そこで今年度の研究ではまず、*SLX4*-N の可溶化条件を検討するため、組成の異なる複数のバッファーによる抽出液の調整を行った。またホルムアルデヒド(HCHO)によるタンパク質間架橋条件での抽出も試みた。一方、難溶性タンパク質の結合因子の同定、弱いタンパク質間結合の検出に優れた、近位依存性ビオチン標識法 (BioID)も検討することとした。小迫教授のグループは BioID による相互作用因子の同定に多数の実績があるため、原理の詳細は割愛する。小迫教授のご助言を得て BirA*の高活性化型 TurboID を用いることとし、プルダウンには streptavidin の他、結合の特異性が高く reversible な Tamavidin 2-REV を用いた。サンプルには、

TurboID を融合した 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 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ヒト細胞株 U2OS 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、指定のバッファー (GdmCl-TCEP buffer) にて抽出液を調整し、西野耕平特任技術員のご協力のもと、ビオチン化タンパク質のプルダウン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

まず、高塩濃度、グアニジン塩酸塩や尿素等の変性剤、より高濃度の SDS 添加など、細胞抽出液を調整するバッファーの条件を検討し、GFP-Trap による免疫沈降-質量分析を行った。その結果、従来の HEPES-RIPA buffer がより最適な条件であることが示唆された。そこで次に、サンプル中の細胞数を増やし、HCHO によるタンパク質間架橋前後でタンパク質抽出を試みたところ、GFP-SLX4-N の検出数が架橋処理により顕著に低下したため、従来の HEPES-RIPA buffer での抽出による相互作用因子の探索を検討した。しかし再現実験によって候補因子である可能性が強く示唆される分子はみとめられなかった。

次に BioID 法を用いて UBZ4 依存的な SLX4-N 会合因子の質量分析を 2 回行った。1 回目は各サンプル N=1、2 回目は N=4 で行った。2 回目の分析に用いたサンプル群では、1 回目と比較してビオチン化の効率がやや低かったため、1 回目の分析結果から候補因子を検討し、その中で両結果に共通して MMC 処理後 UBZ4 野生型でビオチン化がみとめられるタンパク質を絞り込んだ。その遺伝子群において、これまで代表者らが実施した siRNA スクリーニングの結果と照合したところ、SLX4-N の ICL 損傷部位への集積に影響をおよぼすと考えられる分子がいくつか認められた。

[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明らかにされていない。その原因としてまず、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不安定であること等が考えられ、通常の免疫沈降-質量分析法では、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。本研究では、小迫博士のグループで確立されている BioID を行った結果、SLX4 UBZ4 の結合因子候補となりうる分子をいくつか同定した。今後の検証実験の対象であり、詳細な解析を進めることによって、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

今回 BioID 法で検出された候補因子は、従来の免疫沈降法による目的分子(SLX4)との結合の確認は困難であると考えられ、どのように会合を確認するかが課題である。今後、これらの分子のいずれかが SLX4-UBZ4 結合因子として SLX4 の損傷部位への集積に機能するか否かあきらかにするため、1) K63 ポリユビキチン化の基質となるか、2) RNF168 の基質であるか、3) ICL 誘導剤に対する感受性に関与するか、等を判断基準として、ユビキチン化アクセイヤノックアウト細胞の作成、ノックダウン後の相補実験などによって検討したいと考えている。