

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

重点研究報告書

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

ゲノム修復と細胞分裂に関連する因子の構造機能解析 と応用に関する研究

所属 国立感染症研究所 免疫部

研究者 葛西正孝

分担研究者

第一製薬.東京研究開発センター

創薬第三研究所

高子 徹

要旨

細胞の異常増殖は、癌のみならず、動脈硬化やリウマチ等、様々な疾病に及んでいる。本研究事業では、DNA 不安定性に起因する疾病と関連した Translin 蛋白が、染色体分配と細胞分裂に係わって、細胞の異常増殖に極めて重要な機能を担っていることを明らかにした。

1. 研究目的

細胞内のゲノム DNA や蛋白質は、放射線や紫外線などの外的要因以外に代謝活動によって生じる活性酸素種のような反応性の高い中間産物などによっても常に傷害を受けている。細胞は、このような外的、内的要因に対処するために、一時的に細胞分裂の進行を停止して損傷を修復した後、次の分裂に移行するという細胞周期のチェックポイント機構を進化の過程で獲得している。細胞周期のなかでも、DNA 複製と染色体の娘細胞への分配機構は、最も重要なものと考えられ、その破綻は様々な疾病の要因と考えられる。特に、ゲノム修復や細胞増殖の異常増殖を伴う疾病は、癌や免疫系のみならず炎症やアレルギーなど、広範に及んでいる。我々は、DNA 不安定性に起因する疾病と関連した Translin 蛋白を発見し、この蛋白の発現が Atm キナーゼによって制御され、細胞周期の S 期と G2/M 期に最も強く発現されることを明らかにした。本研究では、Translin 蛋白の構造と機能を中心にして、ゲノム恒常性の維持や細胞分裂の制御機構とその破綻のメカニズムの解明を目的とする。

2. 研究方法

免疫組織染色及び共焦点レーザー顕微鏡

細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定後、ウサギ抗 Translin 抗体とマウス抗ブロムデオキシウリジン(BrdU)抗体で二重染色した。更に、Alexa 546 ヤギ抗ウサギ IgG 抗体と Alexa 488 ヤギ抗マウス IgG 抗体で一次抗体の結合を検出した。また、核染色は DAPI でおこなった。次に、組織の染色は、凍結切片をウサギ抗 Translin 抗体と反応させ、ビオチン標識抗ウサギ IgG とアビジン標識ペルオキシダーゼで反応させた後、0.05% ジアミノベンチジン(DAB)と 0.01% 過酸化水素水で発色させた。

共焦点レーザー顕微鏡解析は、以下の様におこなった。細胞を4%パラホルムアルデヒドで固定後、ウサギ抗 Translin 抗体と FITC 抗 Tubulin 抗体で二重染色した。更に、種間交差のない RITC ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を Translin 抗体に結合させ、Zeiss LSM510 共焦点レーザーキャニング顕微鏡で観察した。

抗ペプチド抗体の作製と Western ブロットティング

Translin 蛋白の抗原性部位によって決定された N 末端や C 末端ペプチド等をキャリアー蛋白質 (KLH)に結合後、NZW ウサギに免疫して特異抗体を得た。抗体の精製は、抗原ペプチドのアフィニティーカラムクロマトグラフィーによっておこなった。

Western ブロットティングは、サンプルを 10% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS)で分離し、PVDF 膜に転写後、一次抗体およびペルオキシダーゼ標識二次抗体を反応させた enhanced chemiluminescence (ECL 法)で特異的バンドを検出した。

3. 研究成果

(1) Translin 蛋白の細胞分裂における役割

Translin 蛋白の発現が細胞周期に依存しているかどうかを FACS で解析したところ、G0/G1 期に低く、S 期及び G2/M 期に最も高く発現されていることが明らかとなった。この発現パターンは、Translin 蛋白を過剰発現させた場合にも維持されているので、G0/G1 期における抑制や S 期及び G2/M 期における活性化など、細胞周期に依存した制御機構によって Translin 蛋白の発現が厳密に調節されていることが考えられる。

さらに、Translin 蛋白の発現が細胞分裂速度と密接に関連していることを示す以下の事例も明らかになった。造血系や神経系細胞の分化に伴う細胞分裂の停止と一致して Translin 蛋白レベルが低下すること、CDK インヒビター、p21 の阻害により蛋白レベルが回復すること等である。

同様の結果は放射線照射後の細胞分裂の停止でも観察された。すなわち、Ataxia telangiectasia 原因遺伝子、Atm を欠損したマウスの実験から、Translin 遺伝子の発現が Atm kinase を頂点とする細胞周期制御機構によって調節されていることが明らかとなった。

更に、Translin 蛋白を tetracycline 存在下で過剰発現させることのできる細胞株を樹立した。その結果、Translin 蛋白の過剰発現によって細胞分裂が顕著に促進された。

また、Translin 蛋白の過剰発現に伴って BrdU の取り込みが促進された。このことは、Translin 蛋白が、細胞分裂のみならず DNA 複製反応にも関わっていることを示している。

(2) Translin 蛋白の染色体分配機構における役割

共焦点顕微鏡を駆使した解析によって、体細胞分裂期における Translin 蛋白の細胞内局在を詳細に解析した。その結果、Translin 蛋白が細胞分裂前期の centrosome (中心体)、中期の spindle fiber (紡錘糸)、後期、終期の midbody に局在することを明らかにした。しかも、Translin 抗体で染色される細胞内部位は、tubulin 抗体による染色部位とほぼ一致した。この事実は、Translin が microtubule と関連していることを示唆している。そこで、Translin-Sepharose beads を利用した免疫沈降法によって解析した結果、Translin 蛋白が tubulin, 特に gamma-Tubulin と特異的に結合することが証明された。

4. 考察

細胞分裂は、高度に組織化されたメカニズムによって調節された生命の基本現象であり、その制御機構の破綻は、癌のみならず細胞の異常増殖を伴う様々な疾病に及んでいる。一方、このような疾患における細胞の異常増殖機構については不明のことが多く、国内外における研究は立ち遅れているのが現状である。我々は、染色体転座に関連した DNA 結合蛋白として Translin を発見し、その DNA 結合ドメインや特異的結合する蛋白などを明らかにした。本研究において、Translin 蛋白の機能の一つが、染色体分配機構を直接制御して細胞分裂に深く関わっていることが明らかにされた。以上の成果を更に発展させることによって、細胞の異常増殖機構を解明し、医療と創薬への応用に研究が進展することが期待される。

5. まとめ

本研究事業において、ゲノム修復と細胞分裂に関連する因子として Translin 蛋白に着目して研究をおこなった。その結果、(1) Translin 遺伝子の発現が Atm kinase を頂点とする細胞周期制御機構によって調節されていることを明らかにした。(2) Translin 蛋白の過剰発現によって細胞分裂が促進されることを見出した。(3) Translin 蛋白が、microtubule を介して染色体分配機構を直接制御していることを明らかにした。このように、Translin 蛋白が染色体分配と細胞分裂に極めて重要な機能を担っていることを示唆する結果を得た。以上の結果を基盤にして、蛋白の構造と機能を中心とした詳細な解析を行うことにより、細胞の異常増殖機構を解明し、医療と創薬への応用を目的とした応用研究に発展させる予定である。

6. 研究発表

1) VanLoock, M., Yu, X., Kasai, M., and Egelman, E.

Electron Microscopic Studies of the Translin Octomeric Ring

J. Struct. Biol. 135, 58-66 (2001)

2) Fuks, F., Burgers, W., Godin, N., Kasai, M., and Kouzarides T.

Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription.

EMBO J 20, 2536-2544 (2001)

3) Hosaka, T., Kanoë, H., Nakayama, T., Murakami, H., Yamamoto, H., Nakamata, T., Tsuboyama, T., Oka, M., Kasai, M., Sasaki, M., Nakamura, T., and Toguchida J.

Translin binds to the sequences adjacent to the breakpoints of the TLS and CHOP genes in liposarcomas with translocation t(12;6).

Oncogene 19, 5821-5825 (2000)

7. 知的所有権の取得状況

1) 特許取得 なし

2) 実用新案登録 なし

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社