

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

細胞の異常増殖を伴う様々な疾病の治療と予防を目的として、細胞分裂関連因子、Translinの遺伝子欠損マウスを作製して解析を行った。その結果、この蛋白が細胞分裂の制御に重要な役割を果たし、将来の創薬開発に極めて有用であることが示された。

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、このような内的、外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。特に、S期のDNA複製とM期における4n染色体の娘細胞への分配機構は、細胞周期のなかでも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。

主任研究者らは、DNA不安定性に起因する疾病と関連したTranslin蛋白を発見し、遺伝子クローニングに成功した。更に、この蛋白が細胞周期に依存して制御され、細胞分裂の進行と深く関わっていることを指摘した。本研究では、Translin遺伝子欠損マウスを作製し、細胞分裂増殖機構の解明とその治療への応用を目指した基盤的研究を推進する。

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 FITC ヤギ抗ウサギ IgG 抗体を Translin 抗体に結合させ、Zeiss LSM510 共焦点レーザースキヤ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。

Translin ノックアウトマウスの作製

Translin キメラマウス作製のために、Translin 遺伝子(11 kb)を含むターゲッティングベクターを 129 系統マウス由来 ES 細胞にエレクトロポレーション法で導入した。

次に、遺伝子欠損 ES 細胞をマウス初期胚に導入し、偽妊娠マウスに移植した。

作製されたキメラマウス雄と C57BL/6 マウス雌をかけて得られた F1 マウスから、導入した ES 細胞がキメラ個体内で生殖系列に分化したマウスを選択した。

ホモ遺伝子欠損マウスは、F1 同士のかけあわせで得られた。

遺伝子組み換え体の解析は、Southern, Northern, Western ブロットティング法で確認した。なお、F2 マウスの遺伝子組み換え体のタイピングは、薬剤耐性遺伝子(Neo)と Translin 遺伝子の 3', 5' プライマーを用いた PCR 法で行った。

3. 研究成果

(1) Translin 蛋白の細胞分裂における役割

Translin 蛋白は、細胞周期に依存した制御機構によってその発現が厳密に調節されている。主任研究者らは、体細胞分裂期における Translin 蛋白の細胞内局在を共焦点顕微鏡によって詳細に解析した。その結果、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 Translin 蛋白が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。以上の結果は、Translin 蛋白が染色体分配機構を通して細胞分裂に重要な役割を果たしていることを示唆している。

(2) Translin 蛋白の構造解析

Translin は、27kDa のモノマーが S-S 結合とロイシンジッパーで 8 量体リング状構造を呈した蛋白であり、1 本鎖 DNA や RNA に結合して多彩な機能を示すことが明らかにされつつある。電子顕微鏡を使った 3 次元構造イメージの解析をおこなった結果、リング内のサブユニットの配置や構成から、Helicase ファミリーに類似していることが示唆された。DNA や RNA 代謝に係わる多くリング状蛋白 (rho, Dmcl, T7gp4 等) は、RecA スーパーファミリーに属することが知られているが、Translin は、recombination/repair 蛋白、Rad52 と同様に ATP 結合部位をもたず、他のリング状蛋白と比較してアミノ酸配列に類似性も認められない。このことは、Translin 蛋白が独自の進化過程を経て、共通のリング状高次構造に収斂したことを示唆している。

(3) Translin 遺伝子欠損マウスの作製

また、Translin 蛋白の機能を解明するために行った Translin 遺伝子の targeting によって画期的な結果が得られた。Translin ノックアウトマウス作製のためには、まず、Translin 遺伝子欠損 ES 細胞をマウス初期胚に導入し、偽妊娠マウスに移植した。ES 細胞がキメラ個体内で生殖系列に分化したキメラマウス同士のかけあわせで Translin ホモ遺伝子欠損マウスが得られた。

遺伝子欠損マウスは、野生型マウスと比較して極めて小さく、体重は約 1/2 であった。血液中のリンパ球の形成も未熟な段階で停止しており、成熟 T, B 細胞数も減少していることが明らかとなった。この事実は、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を立証するものであった。今後、放射線や活性酸素種による細胞傷害とその結果として誘導される細胞分裂の停止機構に Translin 蛋白がどのように関与しているかという点について研究をさらに進める予定である。

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。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 Translin 蛋白の細胞内局在や遺伝子欠損マウスの作製で明らかにされた。従って、細胞分裂制御因子を分子標的とした診断や治療を進展させるためには、Translin 蛋白の発現制御機構の解明と機能ドメインの解析が不可欠である。細胞分裂制御因子の発現を自由に調節することができれば、様々な疾患における炎症部位の異常増殖を抑制することが理論的に可能である。

5. まとめ

主任研究者らは、DNA 不安定性に起因する疾病と関連した Translin 蛋白を発見し、遺伝子クローニングに成功した。また、この蛋白が細胞周期に依存して制御され、細胞分裂の進行と深く関わっていることを指摘した。更に、遺伝子欠損マウスを用いた実験から、Translin 蛋白が染色体分配機構を直接制御して細胞分裂に重要な役割を果たしていることを証明した。

以上の結果は、Translin 蛋白の発現や機能を調節することによって、動脈硬化やリウマチ等、様々な疾患における炎症部位の細胞異常増殖を抑制することが理論的に可能であることを示している。したがって、蛋白の高次構造や DNA 結合ドメインの改変も視野に入れた治療の基盤的研究が今後さらに必要であると考えられる。

6. 研究発表

1) Sugiura, I, Sasaki, C, Hasegawa, T, Kohno, Sugio, T, Moriyama, H, Kasai, M and Matsuzaki, T

Crystal structure of human Translin at 2.2Å resolution

ActaCryst.D (In press)

2) Ishida, R., Okado, H., Sato, H., Shionoiri, C., Aoki, K., and Kasai, M.

A role for the octameric ring protein, Translin, in mitotic cell division.

FEBS Lett. 525, 105 (2002)

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

Electron Microscopic Studies of the Translin Octomeric Ring

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

4) 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)

5) Hosaka, T., Kanoe, 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)

6) Meng, G., Inazawa, J., Ishida, R., Tokura, K., Nakahara, K., Aoki, K., and Kasai, M.

Genomic structure and chromosomal localization of the gene encoding TRAX, a Translin-associated factor X.

J. Hum. Genet. 45, 305-308 (2000)

7) Meng, G. Inazawa J., Ishida, R., Tokura, K., Nakahara, K., Aoki, K. & Kasai, M.
Structural analysis of the gene encoding RP58, a sequence-specific transrepressor
associated with heterochromatin.

Gene 242, 59-64 (2000)

8) Endo J, Toyama-Sorimachi N, Taya C, Kuramochi-Miyagawa S, Nagata K,
Kuida K, Takashi T, Yonekawa H, Yoshizawa Y, Miyasaka N, Karasuyama H
Deficiency of a STE20/PAK family kinase LOK leads to the acceleration of
LFA-1 clustering and cell adhesion of activated lymphocytes.

FEBS Lett. 2000, 468, 234-238

7. 知的所有権の取得状況

1) 特許取得

国際特許 特願 2002-096216

【発明の名称】 トランスリン結晶およびトランスリンのセレノメチオニン誘導体
結晶

国際特許 特願 2002-236139

【発明の名称】 トランスリンの3次元構造座標、及び3次元構造座標の使用

2) 実用新案登録 なし