

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23570012

研究課題名(和文)ゲノム安定性維持機構に関連する遺伝子の分離と機能解析

研究課題名(英文)The isolation and characterization of the genes involved in the maintenance of genome integrity

研究代表者

菅谷 公彦(Sugaya, Kimihiko)

独立行政法人放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・主任研究員

研究者番号：80280741

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、哺乳類培養細胞の温度感受性変異株を用いて、染色体安定性維持機構に関連する遺伝子を分離し、その機能を明らかにすることを目的とする。

温度感受性変異株tsTM3に関して、ユビキチン活性化酵素Uba1遺伝子上に変異を同定した。また、制限温度下のtsTM3株では核内のUba1が著しく減少し、ユビキチン化活性が低下するとともに、複製のライセンス因子の分解に異常が起こることを見出した。これは核内のUba1の減少と反比例しており、ユビキチン活性化酵素Uba1の温度感受性変異が複製反応に影響を与える有力なメカニズムとして発表した。

研究成果の概要(英文)：A temperature-sensitive (ts) CHO-K1 mutant, tsTM3, exhibits chromosomal instability and cell-cycle arrest in the S to G2 phases with decreased DNA synthesis at the nonpermissive temperature, 39 °C. In the present study, we identified a point mutation in a gene encoding ubiquitin activating enzyme, Uba1, isolated from the tsTM3 cells, which led to a Met-to-Ile substitution at amino acid 256 in deduced Uba1 protein. Mutant cells at the nonpermissive temperature showed a significant decrease of Uba1 in the nucleus with decreased ubiquitination activity. This defect in ubiquitination led to significant accumulation of geminin and retention of Cdt1, resulting in an inappropriate balance between Cdt1 and geminin. Both Cdt1 and its inhibitor, geminin, are crucial regulators of the licensing of DNA replication. Uba1 plays an important role in the nucleus, and a ts mutation found in tsTM3 cells appears to result in the loss of localization of Uba1 in the nucleus.

研究分野：分子生物学

キーワード：温度感受性変異株 GFP 染色体不安定性 相補性試験 DNA複製 ユビキチン活性化酵素

1. 研究開始当初の背景

ゲノム安定性維持機構に関連する遺伝子を分離し、その機能を解析するために、放射線医学総合研究所の辻らは、チャイニーズハムスターCHO-K1細胞から、細胞周期制御機構や染色体安定性維持機構に異常を示す温度感受性変異株(13相補性群)を分離した(表1, Tsuji et al., 1990)。申請者は、これらのうちの二種類の変異株(tsTM4とtsTM18)を解析し、転写やスプライシング反応に関与する分子の温度感受性変異が、ゲノム安定性維持機構を破綻させることを明らかにしてきた。

表1 本研究で使用した温度感受性変異株

細胞株	姉妹染色体交換誘発	染色体異常誘発	DNA合成活性	原因遺伝子
CHO-K1	-	-	+	
tsTM4	++	±	-	Rpb1: the largest subunit of RNA polymerase II
tsTM18	+++	+++	-	Smu1: a protein involved in splicing
tsTM3	±	++	-	(E1: ubiquitin-activating enzyme)
tsTM19	++	±	-	
tsTM20	++	+++	-	
tsTM26	+++	++	-	
tsTM2	±	±	-	
tsTM11	±	-	±	
tsTM8	±	+	+	
tsTM24	+	++	+	
tsTM1	±	±	+	
tsTM7	-	-	+	
tsTM13	+	+	+	

Tsuji et al. (1990) Somatic Cell Mol. Genet. 16 461-476

2. 研究の目的

本研究課題は、哺乳類培養細胞の温度感受性変異株を用いて、染色体安定性維持機構に関連する遺伝子を分離し、その機能を明らかにすることを目的とする。研究対象である温度感受性変異株は、制限温度(39℃)において染色体不安定性やDNA合成活性の低下などの表現型を示す。本研究では、解析が進んでいない変異株に関して原因遺伝子の分離と機能の解明を行う。染色体不安定性に関連する遺伝子を効率的に同定し、その機能を明らかにすることでゲノム安定性維持機構の研究に貢献したい。

本研究課題で対象とする温度感受性変異株には、DNA合成活性の低下やS期での細胞周期の異常などの表現型を示すものも少なくない。そこで、変異株におけるDNA複製、特に伸長反応を解析し、染色体不安定性との連関を解明する。

3. 研究の方法

(1) 温度感受性変異株の原因遺伝子の探索と機能解析

ヒトDNAによる温度感受性の相補と形質変換株の分離

実験材料には、CHO-K1細胞由来の温度感受性変異株(10株)を用いる。これら変異株に断片化したヒトDNAを導入し、遺伝学的相補により制限温度で生育可能となった形質変換株を分離する。

分離した形質変換細胞よりゲノムDNAを調製し、ヒト特異的なAlu配列を利用したPCRにより相補に関連したヒトDNA断片を特定し原因遺伝子を探索する。

温度感受性変異株tsTM3の原因遺伝子の同定

温度感受性変異株tsTM3は細胞融合による相補性試験により、ユビキチン活性化酵素に異常があるts85細胞と同じ相補性群に分類された(Tsuji et al., 1990)。tsTM3に関しては、ユビキチン活性化酵素Uba1のcDNAを用いた相補実験を行う。その際GFP結合タンパク質を発現するベクターを構築し、Uba1の発現と局在を解析する。

また、野生型と変異型のUba1遺伝子の塩基配列を決定して変異を特定する。さらに、レポーターシステムを利用して核内のユビキチン化を詳細に解析する。

(2) DNA複製反応の解析

複製DNA鎖の標識と解析

各種の核酸前駆体アナログの細胞内への導入とDNA鎖の標識と検出の評価を行う。また、DNAファイバーを作成してDNA複製伸長反応を評価する。さらにクリック反応を用いて、変異株のDNA複製反応を解析する。

複製解析ゲノム領域の探索

制限温度下でDNA合成に異常を示す温度感受性変異株を対象として、DNA複製を解析する遺伝子座を探索し、そのゲノム構造と転写やスプライシングとの関係を解析する。

4. 研究成果

(1) 温度感受性変異株の原因遺伝子の探索

平成23年3月11日に発生した東日本大震災の影響や福島第一原発の事故に関連する業務などで、ヒトDNAによる温度感受性の相補と形質変換株の分離が遅れていたが、平成24年度に全ての温度感受性変異株に関して相補実験を終了した。最終的に3株の変異株から制限温度下で生育可能となった形質変換株が得られ、平成25年度にヒト特異的なAlu配列を利用したPCRによる原因遺伝子の探索と塩基配列の解析、およびサザンハイブリダイゼーションによるヒトゲノム断片の探索を行った。しかし、形質変換株から相補に関連したヒト遺伝子を同定することはできなかった。これらの結果から形質変換株として分離した細胞は、形質復元株と考えられた。また、温度感受性変異株には、制限温度下の自然発症の生存コロニーの出現頻度が高い細胞株や、相補実験操作により形質復元株の出現頻度が上昇する細胞株が含まれていることが明らかとなった。以上の結果より解析が進んでいない変異株は、相補実験による原因遺伝子の同定に不向きな細胞群と考えられ、温度感受性変異株の原因遺伝子を探索する方法を抜本的に見直す必要があると結論する。これらの温度感受性変異株の原因遺伝子の同定には、次世代シーケンサーを用いた網羅的な塩基配列の決定と比較による方法が有力であると考えている。

(2) 温度感受性変異株 tsTM3 の原因遺伝子の同定と機能解析

温度感受性変異株 tsTM3 に関して、ユビキチン活性化酵素 Uba1 遺伝子上に本変異株の原因である変異を同定した(図1)。また、レポーターシステムを利用して核内のユビキチン化を詳細に解析できる評価系を開発・提案した。さらに、ウェスタンブロッティングにより核内のユビキチン活性化酵素が著しく減少することを見出した。これらの解析を統合して、制限温度下の tsTM3 株では核内のユビキチン化活性の低下に伴って、複製のライセンス因子の分解に異常が起こることを見出した。これは核内のユビキチン活性化酵素の減少と反比例しており、ユビキチン活性化酵素の温度感受性変異が複製反応に影響を与える有力なメカニズムと考えられる。これらの成果を国内外の学会にて発表するとともに、原著論文として取りまとめて投稿し受理された(Sugaya et al. PLoS ONE 2014)。

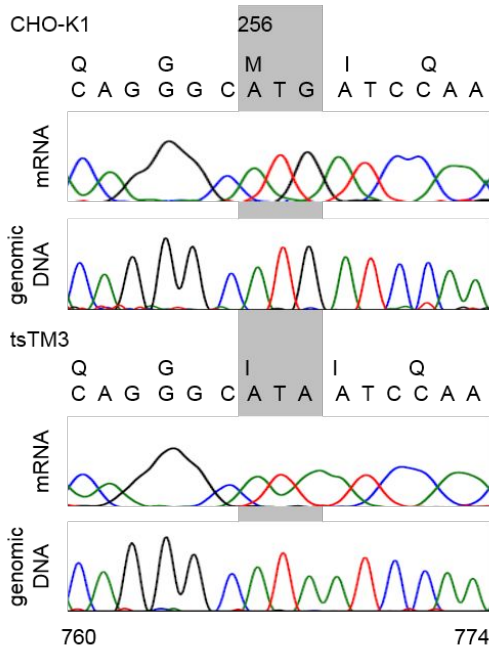


図1 Uba1 遺伝子の温度感受性変異

温度感受性変異株 tsTM3 の Uba1 は、256 番目のメチオニンがイソロイシンに変わっていた。

DNA 複製反応の解析に関して、制限温度下で DNA 合成に異常を示す温度感受性変異株において、スプライシングに異常を生ずる遺伝子座を新たに 2ヶ所同定し、DNA 複製を解析する遺伝子座の候補とした。

また、各種の核酸前駆体アナログを用いた DNA 複製反応の評価を行った。特にクリック反応を用いてゲノム複製反応を詳細に解析し、その一部を Uba1 の温度感受性変異と複製反応の研究結果と合わせて学会にて発表するとともに、原著論文として取りまとめて投稿し受理された(図2, Sugaya et al. FEBS Open Bio 2015)。

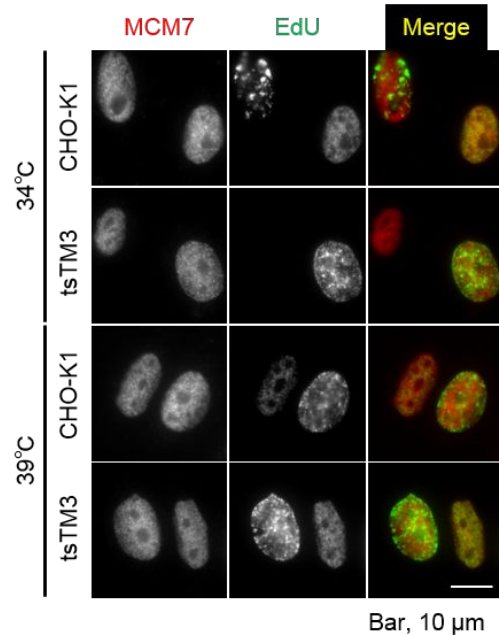


図2 Uba1 変異株の複製反応の解析

MCM7: DNA複製に必要なタンパク質
EdU: 核酸前駆体アナログ

制限温度処理直後の tsTM3 細胞の核内では、DNA合成活性が残っている。

Uba1 の tsTM3 株における核内分布と機能に関して、GFP 結合 Uba1 タンパク質の発現と局在を詳細に解析し、その核内分布と温度感受性の相補との関連を明らかにした(図3, Sugaya et al. Genes Cells 2015)。

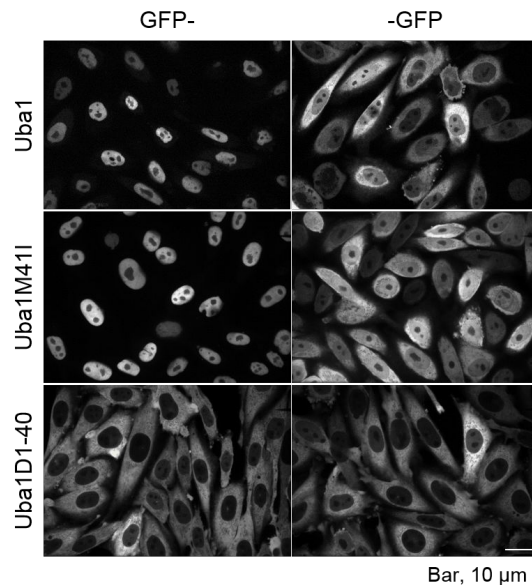


図3 Uba1 タンパク質の細胞内局在

GFP-: GFPアミノ末端結合型
-GFP: GFPカルボキシル末端結合型
Uba1: 野生型Uba1
Uba1M41I: 41番目のメチオニンがイソロイシンに置換したUba1
Uba1D1-40: アミノ末端の40アミノ酸残基を欠くUba1

以上、温度感受性変異株 tsTM3 の解析に関して、ユビキチン活性化酵素 Uba1 の核内における機能の一端が解明されるなど計画以上に研究が進展した。

<引用文献>

Hideo Tsuji, Yasushi Matsudo, Satsuki Tsuji, Fumio Hanaoka, Masao Hyodo, and Tada-aki Hori. (1990) Isolation of temperature-sensitive CHO-K1 cell mutants exhibiting chromosomal instability and reduced DNA synthesis at nonpermissive temperature. *Somat. Cell Mol. Genet.* 16, 461-476.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5件)

Kimihiko Sugaya, Yoshie Ishihara and Sonoe Inoue (2015) Nuclear localization of ubiquitin-activating enzyme Uba1 is characterized in its mammalian temperature-sensitive mutant. *Genes to Cells*, 査読有, in press. DOI: 10.1111/gtc.12257

Kimihiko Sugaya, Yoshie Ishihara and Sonoe Inoue (2015) Analysis of a temperature-sensitive mutation in Uba1: Effects of the click reaction on subsequent immunolabeling of proteins involved in DNA replication. *FEBS Open Bio*, 査読有, 5: 167-174. DOI: 10.1016/j.fob.2015.02.004

Kimihiko Sugaya, Yoshie Ishihara, Sonoe Inoue and Hideo Tsuji (2014) Characterization of ubiquitin-activating enzyme Uba1 in the nucleus by its mammalian temperature-sensitive mutant. *PLoS ONE*, 査読有, 9: e96666. DOI:10.1371/journal.pone.0096666.

[学会発表](計 9件)

菅谷 公彦, 石原 よし江, 井上 園江. コピキチン活性化酵素 Uba1 の温度感受性変異の複製反応に対する影響. 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 26 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

Kimihiko Sugaya, Yoshie Ishihara, Sonoe Inoue, Hideo Tsuji. Characterization of the role of ubiquitin-activating enzyme Uba1 in the nucleus. 2013 ASCB Annual Meeting, December 15, 2013, The New Orleans Ernest N. Morial Convention Center (New Orleans, USA).

菅谷 公彦, 石原 よし江, 井上 園江, 辻 秀雄. コピキチン活性化酵素 Uba1 の温度感受性変異と核内の機能. 第 86 回日本生化学会大会, 2013 年 9 月 12 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜

市).

Kimihiko Sugaya, Yoshie Ishihara, Sonoe Inoue, Hideo Tsuji. A Temperature-sensitive mutation in the Ubiquitin-activating enzyme E1 and its relation to the maintenance of chromosome integrity. 2012 ASCB Annual Meeting. December 18, 2012, Mscone Center (San Francisco, USA).

菅谷 公彦, 石原 よし江, 井上 園江, 辻 秀雄. 染色体安定性維持機構に関連する遺伝子の分離と機能解析 - コピキチン活性化酵素 E 1 とその温度感受性変異株の解析. 第 35 回日本分子生物学会年会(口頭発表とポスター発表), 2012 年 12 月 13 日, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市).

Kimihiko Sugaya, Yoshie Ishihara, Hideo Tsuji. A temperature-sensitive mutation in the ubiquitin-activating enzyme E1 is related to maintenance of chromosome integrity. 第 34 回日本分子生物学会年会(口頭発表とポスター発表), 2011 年 12 月 15 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

6. 研究組織

(1)研究代表者

菅谷 公彦 (SUGAYA, Kimihiko)
放射線医学総合研究所・放射線防護研究センター・主任研究員
研究者番号: 80280741

(2)連携研究者

辻 秀雄 (TSUJI, Hideo)
放射線医学総合研究所・福島復興支援本部・専門業務員
研究者番号: 40163795

(3)研究協力者

石原 よし江 (ISHIHARA, Yoshie)
井上 園江 (INOUE, Sonoe)