

京都大学教育研究振興財団助成事業  
成果報告書

平成25年10月31日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会長 辻 井 昭 雄 様

所属部局・研究科 医学研究科 放射線遺伝学

職名・学年 博士課程4年

氏名 小林 俊 介

助成の種類	平成24年度 ・ 若手研究者在外研究支援 ・ 在外研究中期助成		
研究課題名	遺伝学とプロテオミクスを用いた、DNA損傷依存的なユビキチン化タンパク質の		
受入機関	エラスムス医療センター(オランダ)		
渡航期間	平成24年10月 1日 ～ 平成25年 1月 1日		
成果の概要	タイトルは「成果の概要／報告者名」として、A4版2000字程度・和文で作成し、添付して下さい。「成果の概要」以外に添付する資料 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有( )		
会計報告	交付を受けた助成金額	750,000円	
	使用した助成金額	750,000円	
	返納すべき助成金額	0円	
	助成金の使途内訳	交通費(航空運賃含む)	200,000円
		滞在費	550,000円
当財団の助成について	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。) この助成のおかげで、海外のトップクラスの施設での研究生活を体験する事が出来ました。経済的な不安を取り除いて頂いたおかげで、研究に集中することができ、オランダの文化にも触れることができました。		

## 研究概要・成果／小林俊介

### 遺伝学とプロテオミクスを用いた、DNA 損傷依存的なユビキチン化タンパク質の同定

平成24年10月より3ヶ月間、京都大学教育研究振興財団様の援助を受け、オランダのエラスムス医療センターにある、Roland Kanaar 教授の研究室でユビキチン化タンパク質の遺伝学的解析を行った。まずは研究の背景をご紹介したい。

私たちの体を構成する細胞の染色体 DNA は、常に DNA の損傷を受けている。DNA 損傷が正しく修復されないと、がん化につながる。その為、細胞は、DNA 損傷を修復する機構を複数種類備えている。私が所属する研究室では、ニワトリの B リンパ球細胞を用いて、効率よく特定の遺伝子を人工的に破壊できる優れた実験手法を確立している。この優位性を活かし、DNA 損傷修復に関連する遺伝子を破壊した細胞を網羅的に作製してきた。

その中で私は RNF8 というユビキチン化タンパク質の機能解析を行っている。タンパク質は、様々な種類の化学修飾を受けるが、RNF8 はユビキチン化という化学修飾を触媒する。これまで、ユビキチンによるタンパク質修飾は、そのタンパク質が不要な物であるという目印であり、基質を分解する為に必要とされてきたが、近年、ユビキチンを介したタンパク質の相互作用が DNA 損傷の修復に重要であるという事が多数報告されている。上述の通り、当研究室では、既に、RNF8 を破壊した細胞株を作製している。また、RNF8 と複合体をつくとされているタンパク質 UBC13 の破壊株も作製しており、まずはその二つの破壊株の表現型を調べた。興味深い事に、RNF8 と UBC13 は一緒に働いているとされているにも関わらず、各々の破壊株の表現型に多々違いが観られた。この事は、RNF8 は UBC13 以外にもパートナーを持っている可能性を示唆しており、さらには、これまでに報告されている RNF8 の基質以外に、標的タンパク質がある可能性も示している。これらのタンパク質を見つけ出す為に、留学前に様々な実験を行い、RNF8 の新たなパートナーとして RAD6 というタンパク質が候補に挙げられた。RNF8 と RAD6 が共同して働くかどうかを調べる為には、これらの遺伝子を破壊した2重破壊株を解析するのが最も効果的である。この破壊株をニワトリで作製しようとしたところ、ニワトリには RAD6 の完全な遺伝子情報が揃っておらず、困難であることが判明した。そこでオランダの Kanaar 博士が持つ、マウスの RAD6 破壊株を用いて、RNF8 との関連を解析する事にした。

RAD6 には RAD6A と B があり、オランダにあるのはそれぞれの破壊株であった。その為、もう片方の RAD6 を細胞内から排除する必要がある。その為には、siRNA という技術を使い、目的のタンパク質の量を極力少なくするという方法（ノックダウン）が

最も一般的である。RAD6A 破壊株において、RAD6B を siRNA を用いてノックダウンし、細胞内の RAD6 の量を減らした状態で、放射線照射後の RAD51 フォーカス形成を観察した所、野生型と変わらないフォーカス形成効率を示した。このことから、RAD6 は RAD51 のフォーカス形成に関与しておらず、ニワトリの RNF8 破壊株から得られた結果を考慮すると、RAD6 と RNF8 には機能的関連性はないと考えられる。同様の細胞を用いて、RNF8 のノックダウンを行おうと試みたが上手く行かず、RAD6 と RNF8 の直接的な遺伝学的解析は行えなかった。

今回の留学によって、ネガティブな結果ではあったが、RNF8 と RAD6 には機能的関連性が無いという事がわかった。将来的には、ニワトリの細胞株を用いて、RNF8 への新たな知見を見だし、それらを元に新たなパートナーと標的タンパク質を見つけることが必要だと思われる。最終的には今回のように、高等真核生物での実験も必要に成ると思われる。