

京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書

令和2年 4月 28日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局 大学院生命科学研究科

職 名 特定助教

氏 名 勝木 陽子

助 成 の 種 類	令和元年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究 課 題 名	DNAクロスリンク修復因子SLX4のユビキチン化経路を介した制御機構の解析			
上記以外で助成金 を 充 当 した 研 究 内 容				
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名) 大学院生命科学研究科・教授・高田穰			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会) Elucidation of the ubiquitination pathway mediating recruitment of SLX4 during ICL repair. Yoko Katsuki, Masako Abe, Minoru Takata. The 62nd Annual Meeting of the Japanese Radiation Research Society, 2019. Kyoto, Japan.			
成 果 の 概 要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)			
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	1,000,000 円		
	使用した助成金額	1,000,000 円		
	返納すべき助成金額	0 円		
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		消耗品費	935,566	
		旅費	45,600	
		雑費	18,834	
当財団の助成に つ い て	基盤Cが採択されなかった年度に助成していただき、ありがとうございました。研究を進めるにあたり大変助かりました。使途が比較的自由なところがよいと思います。HPに各学部からの応募者数や採択率なども公表していただけると、応募の参考にしやすいかもしれません。今後も本助成制度が続き、多くの研究が支援されることを願っています。			

成果の概要／勝木陽子

研究内容

DNA クロスリンク(DNA interstrand crosslink, ICL)修復因子 SLX4 は、小児遺伝病ファンconi貧血(Fanconi anemia, FA)の原因遺伝子産物で、本疾患は生体内で発生したクロスリンク損傷を正常に修復できないことに起因して発症すると考えられている。報告者は、SLX4 のゲノムの損傷部位への局在を制御するユビキチン化経路の探索をおこなっている。

SLX4 はアミノ末端にタンデムに並んだユビキチン結合(UBZ4)ドメインをもち、このドメインを介して 1)K63 ポリユビキチン鎖に結合すること、2)損傷部位に局在することが示唆されている(Kim Y et al. 2011, Lachaud C et al. 2014)。またこのドメインの欠失タンパク質を発現する遺伝子変異によって FA を発症することから、修復には UBZ ドメインを介した SLX4 の損傷部位への局在が重要と考えられる。しかし SLX4 の UBZ ドメイン結合分子はいまだ特定されていない。報告者らも過去に、質量分析による結合因子の同定を試みたが、顕著な候補タンパク質は見つからなかった。これらの結果から報告者は、SLX4 の UBZ とユビキチン(化された基質)の会合は、精製中に失われるような弱く不安定な結合なのではないかと考えた。そこで、一過性の結合因子や不安定な会合因子を同定する手法として近年注目されている、I)近位依存性ビオチン標識(BioID)法、および II)分子間架橋剤処理による会合因子の探索を試みることにした。

研究成果と今後の見通し

BioID は、BirA* (大腸菌由来ビオチン化酵素、基質特異性変異体)を目的遺伝子に融合させ、その遺伝子産物が会合する(近位にある)タンパク質をビオチン化する活性を利用し、従来のアフィニティ精製技術では検出困難であった、一過性、あるいは不安定な会合を同定するパワフルなツールである。本助成の獲得により、報告者はまず I)について、高効率に BioID 法を行うために改良された BirA*高活性型 TurboID および miniTurbo 融合 SLX-N(SLX4 の N 末)発現ベクターの構築を行った。またこれらのベクターを導入したヒト細胞株を樹立し、ビオチン添加条件下において、細胞内ビオチン化が上昇することを確認した。現在、クロスリンク損傷部位において、SLX4 とビオチンの共局在が見られるかどうかを検討中である。一方 II)において用いる予定の、EGFP-

SLX4-N 野生型および UBZ 変異型発現細胞株は過去に樹立し、種々の条件検討もおこなってきたが、今回あらたに、より発現の高い細胞の再樹立を行った。以上のような進捗状況を 2020 年度科研費申請においてアピールした結果、幸運なことに基盤 C を獲得することができ、本助成に深く感謝申し上げたい。今回樹立した細胞株を用いて、UBZ 結合因子の同定を行うため、現在条件検討を鋭意すすめている。また質量分析による会合因子の同定に実績をもつ、他大学研究所との共同研究を行う予定である。