

DNA 損傷修復過程における NFBD1/KIAA0170 蛋白質の機能解析

千葉県がんセンター研究局長（共同研究員） 中川原 章

【目的と概要】

かずさ DNA 研究所においてクローニングされた KIAA0170 遺伝子は、そのカルボキシル末端に BRCT ドメインと称される特徴的な構造を持つ核蛋白質をコードする。我々は既に KIAA0170 蛋白質が抗アポトーシス活性を持つことを明らかにし、この蛋白質を NFBD1 (nuclear factor with BRCT domain 1) と命名した。本研究では、DNA 損傷修復過程における NFBD1 の機能を調べる目的で、野生型 p53 を発現するヒト肺がん由来の A549 細胞をモデルシステムとして実験を行った。その結果、制癌剤の一種であるアドリアマイシン処理によるアポトーシス誘導過程において、p53 の発現昂進および NFBD1 の発現低下が認められた。さらに、NFBD1 はその BRCT ドメインを介して p53 と結合し、DNA 損傷に応答したそのリン酸化を阻害することによって、p53 のアポトーシス誘導活性を抑制する機能を持つことが判明した。従って、今回の実験結果は NFBD1 が p53 の活性を制御することによって、DNA 損傷に応答した細胞の運命決定に重要な役割を果たしていることを示唆した。

【研究成果の概要と今後の取り組み】

アドリアマイシン処理に起因する DNA 損傷の初期応答過程においては、p53 の発現誘導は観察されず、DNA 損傷部位 (nuclear foci) への NFBD1 および DNA 修復複合体である MRN コンプレックスの集積が認められた。一方、DNA 損傷の後期応答過程においては、A549 細胞は 2 極化することが判明した。すなわち、p53 の発現誘導が認められず NFBD1 の nuclear foci への集積が維持されている細胞群と、NFBD1 の発現そのものが検出されず p53 の細胞核における顕著な蓄積およびリン酸化が観察される細胞群である。前者は DNA 修復を完了し通常の細胞周期に入るが、後者は p53 の発現昂進によってアポトーシスに陥ると考えられる。従って、DNA 損傷に応答した NFBD1 と p53 との相互作用の有無が制癌剤に暴露されたがん細胞の運命決定に重要な意義を持つことが推察される。過剰発現系を用いた免疫沈降実験および in vitro pull-down assay の結果、NFBD1 はその BRCT ドメインを介して p53 のアミノ末端領域に物理的に結合することが明らかになった。この p53 のアミノ末端領域には、DNA 損傷に応答してリン酸化される重要なセリン残基 (Ser-15, Ser-20, Ser-46) が存在しているとともに、p53 の転写活性化能を担う領域である。これらのセリン残基のリン酸化は、E3 ユビキチンリガーゼである MDM2 による p53 の分解を阻止することが知られている。一過性の過剰発現実験およびルシフェラーゼレポーターアッセイの結果、NFBD1 はアドリアマイシンによる p53 の Ser-15 のリン酸化を顕著に阻害するとともに、その転写活性化能およびアポトーシス誘導能を抑制することが認められた。また、siRNA を用いて内在性の NFBD1 をノックダウンすると、アドリアマイシンに対する感受性の昂進が観察されるとともに、p53 の転写因子としての活性が上昇した。従って、今回の実験結果は野生型の p53 を発現しているがん細胞においては、制癌剤に応答した NFBD1 の発現低下に起因する p53 の抑制の解除がアポトーシスを介したがん細胞の除去において極めて重要な役割を担っていることを強く示唆している。

NFBD1 は損傷 DNA を認識した γ H2AX を目印にして、DNA 修復複合体である MRN コンプレックスを DNA 損傷部位にリクルートし、損傷 DNA の修復を誘導する機能を持つことが知られている。今回の我々の研究結果から、DNA 損傷に応答した NFBD1 の転写レベルにおける発現の制御が、制癌剤に対するがん細胞の感受性を制御する重要なメカニズムの一つであることが示唆された。我々の知る限り、NFBD1 の転写レベルでの制御機構の詳細についての報告はないことから、今後の重要な研究課題の一つであると考えられる。