

サブテーマ名：DNA・抗体マイクロアレイの作製技術開発及びその作製・評価 小テーマ名：新規がん関連遺伝子の探索
サブテーマリーダー（所属、役職、氏名）千葉県産業振興センター（研究員）今井一英 小テーマリーダー（所属、役職、氏名）千葉県がんセンター（共同研究員）中川原 章 研究従事者（所属、役職、氏名）千葉県がんセンター（共同研究員）中川原 章
研究の概要、新規性及び目標 ①研究の概要 かずさDNA研究所では、独自の遺伝子ライブラリーの中から機能未知の巨大蛋白質をコードするKIAA遺伝子を大量に取得し、ヒト疾患における重要遺伝子の同定を目的としたプロジェクトを展開している。そこで、それらの遺伝子リソースの中から、がんに関連すると思われる新規遺伝子を抽出し、その発がんやがんの進展における役割を解析することによって、治療の分子標的を同定し、新しいがんの治療法の開発を目指す。 ②研究の独自性・新規性 かずさDNA研究所で取得された遺伝子リソースは国際的にもユニークであり、なかでも機能未知の巨大蛋白質をコードするKIAA遺伝子は、がんを含む多くのヒト疾患において、極めて重要な機能的役割を果たしていることが予測される。我々が抽出したKIAA0170遺伝子は、COOH-端にBRCTドメインを有し、発がんとの関連が示唆されたが、当初、その機能は全く未知であった。 ③研究の目標（フェーズ毎に数値目標等をあげ、具体的に） フェーズⅠ（H14-H15）：該当しない フェーズⅡ（H16-H18）：我々の初期の機能解析から、KIAA0170は転写因子で細胞死を抑制する機能を有することを明らかにし、遺伝子名をNFBFD1（ <u>N</u> uclear <u>F</u> actor with <u>BRCT</u> <u>D</u> omain-1）と命名した。NFBFD1の更なる機能解析を展開し、発がんおよび分子標的としての意義を明らかにする。 フェーズⅢ（H18、11.25事業完了日以降）：分子標的としての意義に基づき、その機能を修飾する低分子量化合物の設計をコンピューター上でを行い、創薬への展開を図る。
研究の進め方及び進捗状況（目標と対比して） （1）DNA損傷時におけるNFBFD1の機能的役割：DNA double strand breakを誘起するアドリアマイシンでA549細胞を処理し、その後のNFBFD1のmRNA発現および蛋白質発現の経時的变化を調べる。また、NFBFD1の細胞内局在の変化についても調べ、とくに発がんにおいて重要な役割を果たしているp53がん抑制蛋白質との関係について検討する。 （2）NFBFD1の転写制御機構の解析：NFBFD1の転写制御による遺伝子発現の調節は、DNA損傷後のNFBFD1の機能を知る上で極めて重要である。そこで、NFBFD1のプロモーターを同定し、その制御機構を明らかにする。
主な成果 具体的な成果内容： （1）DNA損傷時におけるNFBFD1の機能的役割：A549細胞をアドリアマイシン処理すると、6時間までにKIAA0170/NFBFD1がmRNAおよび蛋白質レベルとともに軽度上昇し、その後著しく発現が低下した。このとき、p53は蛋白質レベルで安定化され、さらに、Ser-15のリン酸化が強く誘導された。また、これに伴って、細胞のアポトーシスが誘導された。内在性p53とKIAA0170/NFBFD1の発現が高いHEK293T細胞のlysateを用いて、抗KIAA0170/NFBFD1抗体により免疫沈降し、次に抗p53抗体でブロットしたところ、両者の共沈が確認された。今回の解析結果から、ストレスのかからない通常状態では、細胞内のKIAA0170/NFBFD1はp53と物理的に結合し、Ser-15のリン酸化を抑制することによってp53の活性化を抑制し、そのアポトーシス誘導機能を阻害していることが示唆された。しかし、制癌剤などによりDNAの二重鎖切断が起こると、修復に失敗し死を宣告された細胞ではKIAA0170/NFBFD1がp53から離れ、その活性化を抑制できない状態になっていることが示された。P53との結合部位を明らかにするために、NFBFD1とp53両者の欠変異体を作製し、その結合部位を明らかにした。興味深いことに、NFBFD1のCOOH-端側がp53のNH2-端の転写活性化ドメインに結合し、MDM2と共にp53を抑制的に制御していることが明らかになった。

(2) NFBD1の転写制御機構の解析：NFBD1遺伝子のプロモーター領域を知るために、候補となる領域の欠失変異体を多数作製し、レポーターアッセイを行った。その結果、転写制御領域を同定し、その転写制御因子も明らかにした。

(3) 明らかになったNFBD1のDNA損傷時の機能的意義：(a) DNA損傷早期の機能：通常状態では、NFBD1は核内の内在性p53と結合し、その機能を抑制的に制御している。しかし、DNA損傷が入ると、NFBD1は活性化されたATMからリン酸化を受け、いわゆる修復複合体をDNAの損傷部にリクルートし、その修復にあたる。(b) DNA損傷後期の機能：DNA損傷の修復に成功した細胞では、NFBD1はそのままp53を抑制的に制御し、細胞を死から守る。しかし、DNA損傷の修復に失敗した細胞では、NFBD1は転写レベルで発現が抑制され、p53を負に制御できなくなる。その結果、p53がATM経路で活性化され、細胞を死に至らしめる。以上のことが、今回の我々の解析から明らかになった。

特許件数： 論文数： 9 口頭発表件数： 1

研究成果に関する評価

1 国内外における水準との対比

NFBD1とp53の結合、およびその機能的制御機構の解明についてはこれまでに全く報告がなく、我々が初めて明らかにした事実である。また、NFBD1の転写制御機構についてもこれまでに報告はない。

2 実用化に向けた波及効果

現在使用されている制がん剤の多くは、DNA損傷を誘起する製剤である。したがって、DNA損傷およびその修復の機構の解明は、新しい制がん剤の開発や、多剤耐性獲得を克服するために極めて重要である。NFBD1をターゲットとした新規薬剤の開発は、がん治療の新薬開発に繋がる可能性が高く、緊急の課題として取り組むべきである。

残された課題と対応方針について

(1) 今後は、モデルマウスを用いた研究が必要である。対応方針として、現在、トランスジェニックマウスの作製を行っている。また、ノックアウトマウスの作製も必須である。

(2) ヒト疾患におけるNFBD1の役割について、解析を進める必要がある。とくに、いろいろながんにおける発現レベル、遺伝子変異の有無に関する解析は重要である。さらに、神経変性疾患におけるNFBD1の役割についても調べる必要がある。

	J S T負担分 (千円)							地域負担分 (千円)							合 計
	H 13	H 14	H 15	H 16	H 17	H 18	小計	H 13	H 14	H 15	H 16	H 17	H 18	小計	
人件費															
設備費															
その他研究費 (消耗品費、 材料費等)											744	250	125	1,119	
旅費															
その他															
小 計											744	250	125	1,119	

代表的な設備名と仕様 [既存 (事業開始前) の設備含む]

J S T負担による設備：なし

地域負担による設備：蛍光顕微鏡、動物細胞培養装置、蛋白質解析装置など

※複数の研究課題に共通した経費については按分する。