

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成 30 年 4 月 27 日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 群馬大学 大学院理工学府
職 名 助教
研究代表者 黒沢 綾

下記のとおり平成29年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号:17017)

1. 共同研究課題名	DNA 修復因子特異的阻害剤のスクリーニング系の構築と取得			
2. 共同研究目的	多様なバイオリソースを利用した in vitro および in vivo の解析により、DNA 修復因子因子を特異的に阻害する新規化合物を取得し、新規抗がん剤の創出および、核内における分子メカニズムの解明を目指す。			
3. 共同研究期間	平成 29 年 4 月 1 日 ~ 平成 30 年 3 月 31 日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役割分担	
(研究代表者) 黒沢 綾	群馬大学 大学院理工学府	助教	実験の計画および遂行、統括	
(分担研究者) 木村 悠夏	群馬大学 理工学部	大学 4 年生	タンパク質発現の検討と解析	
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	遺伝子情報分野	氏 名	山下 孝之

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号:)

6. 共同研究計画

非相同末端連結(non-homologous end-joining: NHEJ)はヒト細胞における主要なDNA二本鎖切断修復経路であるが、一部のがん細胞ではNHEJ活性が亢進し、電離放射線やDNA損傷を誘発する抗がん剤による治療効果を低下させる要因となっている。また近年、一部の乳がんや卵巣がんなどに用いられているオラパリブと同様に、NHEJ阻害剤も、「合成致死(synthetic lethality)」と呼ばれるメカニズムを利用した分子標的薬として臨床治療への利用が期待されているが、NHEJに必須の因子であるKu70/Ku80複合体やLIG4/XRCC4複合体に対する阻害剤の報告はほとんどなく、また特異性についても十分に検証されていない。

そこで本研究では、組換えタンパク質を用いた *in vitro* 化合物スクリーニングを行い、NHEJ 必須因子の特異的阻害剤の取得を試み、さらにさまざまなヒト細胞を用いて、その有効性を詳細に検討する。

7. 共同研究の成果

本研究ではスクリーニングに必要な組換えヒト Ku70/Ku80 を得るため、Bac-to-Bac 発現系を用いることにした。まず、HEK293 細胞を由来とする cDNA を鋳型として、Ku70 と Ku80 のコーディング DNA 配列を PCR で増幅し、pFastBac1 ベクターに組み込んだ。このベクターを大腸菌株 DH10Ba に形質転換し、大腸菌内で起きる相同組換えを利用し、Ku70 や Ku80 のコーディング DNA 配列を含む Bacmid を得た。最後に Bacmid を昆虫細胞 Sf9 に感染させ、ウイルスベクターを取得した。

次に、Ku70 と Ku80 をそれぞれ発現するウイルスベクターを 1:1 の割合で同時に感染させた Sf9 から細胞抽出液を調製し、遠心分離により上清画分と沈殿画分をそれぞれ得た。ウェスタン解析の結果から、上清画分に組換え Ku70/Ku80 が含まれていることを確認した。そこで、この上清と DNA セルローズビーズとの混合物を遠心分離し、得られた沈殿物、すなわちビーズを含む画分をウェスタン解析したところ、Ku70 や Ku80 を特異的に認識する抗体でバンドを検出することができた。したがって、Sf9 で発現した組換え Ku70/Ku80 の DNA 結合性を確認することができたと考えられる。しかし、CBB 染色や銀染色では、Ku70 や Ku80 を示すと考えられる顕著なバンドを確認することができなかつたため、今後、細胞数や抽出液の調製法を改変し、大量調製を目指したい。また、Ku70/Ku80 の DNA 結合能を特異的に阻害すると報告されている 7-[[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl]amino]-3-(3-fluorophenyl)pyrimido[4,5-d]pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione をコントロールとして利用し、調製した Ku70/Ku80 を用いた簡便なアッセイ系の確立も進めたい。

平行して、細胞レベルの解析の構築についても検討を行った。NHEJ 因子の一つである DNA 依存性プロテインキナーゼは、活性に二本鎖 DNA と Ku70/Ku80 を必要とし、DNA 二本鎖切断の誘発に応答して、2056 番目のセリン残基を自己リン酸化修飾することから、このリン酸化 DNA-PK を認識する抗体を用いた免疫染色により評価することにした。無処理またはトポイソメラーゼ II 阻害剤エトポシドで処理した HeLa 細胞を免疫染色すると、エトポシドで処理した時のみ、核が全体的に染まることを確認した。HeLa 細胞を 7-[[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl]amino]-3-(3-fluorophenyl)pyrimido[4,5-d]pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione で予め処理すると、エトポシド処理によるリン酸化 DNA-PK は阻害剤濃度依存的に減少することを確認した。今後、これら *in vitro*, *in vivo* の実験系を組み合わせ、スクリーニング系を確立させたい。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

①本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文

なし

②この共同研究に基づくとの記載のある論文

なし