

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31年 3月22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 分子科学部門
 職 名 助教
 研究代表者 黒沢 綾

下記のとおり平成30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	非相同末端連結因子を特異的に阻害する新規化合物のスクリーニング		
2. 共同研究目的	本研究では、DNA 二本鎖切断修復経路の一つである非相同末端連結を抑制する新規化合物の取得を目指している。非相同末端連結を抑制する化合物は、がん治療の新たな分子標的薬となる可能性がある。しかし、非相同末端連結はがんの種類ごとに異なる活性調節を受けている可能性があるため、その評価には由来の異なるさまざまながん細胞を用いた検証を欠かすことはできない。そこで、多数のがん由来の細胞株保を保有されている生調研 山下先生と共同研究をさせていただき、得られた化合物の有用性の検証を行う。		
3. 共同研究期間	平成30年 4月 1日 ~ 平成31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	理工学府 分子科学部門	助教	研究計画の立案、遂行、統括
(分担研究者) 堀口 明志	理工学部 化学生物化学科	大学4年生	実験の補助(組換えタンパク質の精製等)
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: 17017)

6. 共同研究計画

本研究では、まずヒト NHEJ に必須の因子である Ku70/Ku80 複合体および LIG4/XRCC4 複合体をそれぞれ昆虫細胞 Sf9 で発現させ精製する。精製を簡便化するため、これらのタンパク質には His タグが付加するように発現ベクターを設計してある。精製した組換えタンパク質と基質 DNA を混合し、*in vitro* NHEJ アッセイ系を構築する。

次いで、この系を用いて、化合物ライブラリーから NHEJ 必須因子を特異的に阻害する化合物をスクリーニングする。化合物ライブラリーは、理研等からの入手を予定している。

最後に、得られた NHEJ 必須因子を阻害する候補化合物の有効性を、由来の異なるさまざまながん細胞や正常細胞を用いてさらに検証する。

7. 共同研究の成果

ヒト Ku70/Ku80 複合体ならびに LIG4/XRCC4 複合体の組換えタンパク質取得のため、バキュロウイルス発現系を利用した。今年度は、発現ベクターが完成した Ku 複合体に関する解析を進めた。

ヒト Ku70 と Ku80 の ORF をコードするウイルスを昆虫細胞 Sf9 に感染させ、その抽出物を調製した。ウェスタン解析により、Ku70 と Ku80 が発現していることを確認した。次に、DNA セルロースを用いたプルダウンアッセイにより、組換え Ku 複合体が DNA に結合することを確認した。そこで現在、Ku 特異的阻害剤として報告されている化合物 7-[[2-(3,4-dimethoxyphenyl)ethyl]amino]-3-(3-fluorophenyl)pyrimido[4,5-d]pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione の効果を検討した。プルダウンによって得られた沈殿物、すなわち DNA 画分を用いてウェスタン解析を行うと、阻害剤添加の有無にかかわらず Ku 特異的なバンドが検出された。プルダウンによって得られた画分を電気泳動し、ゲルを CBB 染色すると、阻害剤を添加した画分からは多くのバンドが濃く検出された。これらのことから、この化合物には Ku 特異的な阻害効果がない可能性が示唆されると同時に、本研究課題の目標とする新規 Ku 特異的阻害剤の取得の重要性が示唆された。一方、細胞抽出液を電気泳動したゲルの染色の結果から本研究で用いた Ku 複合体の発現量は高くないことがわかった。このことにより阻害剤が非特異的に作用した可能性もある。そこで現在、Ku 複合体を高発現で得るため、発現系の改良を進めている。

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