

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

令和2年4月27日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所 属 機 関 名 国立大学法人群馬大学
職 名 助教
研 究 代 表 者 黒沢 綾

下記のとおり令和元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す。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ができない。そこで、生調研 山下先生との共同研究のもと、多数のがん由来の細胞株をもちいた評価を目指した。			
3. 共同研究期間	平成31年 4月 1日 ~ 令和 2 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	研究の総括	
(分担研究者) 西場 晟也	大学院理工学府 理工学専攻	大学院生	組換えタンパク質発現ならびにスクリーニングに係る実験・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。

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

申請者は平成 30 年度に、昆虫細胞発現系により精製したヒト組換え Ku 複合体を用いて、Ku 複合体の DNA 結合能の阻害効果を持つことが示唆されている化合物の効果の評価を行った。その際、Ku 複合体の収量が低いことが課題となった。細胞抽出液を可溶性画分と沈殿画分にわけ、SDS-PAGE/CBB 染色やウェスタン解析を行うと、発現させた Ku 複合体のほとんどが不溶性画分に含まれることがわかった。これを改善するため、本年度は Ku 複合体の発現条件の検討を行った。細胞内において Ku70 と Ku80 は 1:1 で結合し、Ku 複合体を形成していることから、Ku タンパク質を発現させるそれぞれのウイルスベクターの力価の違いが発現効率に影響を与えている可能性がある。そこで、ヒト Ku70 と Ku80 をそれぞれ発現するウイルスベクターを調製し、異なる割合 (1:1, 1:2, 2:1) で昆虫細胞 Sf9 に感染させた。回収した細胞の破碎液を用いて、ウェスタン解析により可溶性画分に含まれる Ku タンパク質の割合を比較したが、Ku タンパク質のほとんどが依然として不溶性画分に含まれることがわかった。そこで、ウイルスベクターの力価に依らない発現系の改善を目指し、一つのウイルスベクターで二つのタンパク質の発現が可能な発現ベクターの作製を行った。pFastBacDual にヒト Ku80 の ORF を組み込んだ pFastBac Dual-Ku80 を得た。シーケンス解析の結果、一箇所変異が認められたが、アミノ酸レベルでは変化がないことがわかった。このベクターにヒト Ku70 の ORF を組み込み、pFastBacDual-Ku70-Ku80 を得た。現在、シーケンス解析の準備を行っている。シーケンスを確認し、アミノ酸レベルで変異が認められない場合、pFastBacDual-Ku70-Ku80 を用いてウイルスベクターを調製し、Sf9 に感染させ、可溶性画分への発現量の変化を調べ予定である。その後、精製したヒト Ku 複合体を用いて、阻害剤スクリーニングの系を確立させる予定である。pFastBacDual による発現系が良好の場合、LIG4/XRCC4 複合体の発現系も pFastBacDual を用いて行う予定である。

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

② この共同研究に基づくとの記載のある論文