

平成30年6月6日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05601

研究課題名(和文)複製ストレス応答とオートファジーの融合による新領域開拓

研究課題名(英文) Determination of a role for autophagy in suppression of genome instability caused by replication stress

研究代表者

川端 剛 (KAWABATA, Tsuyoshi)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

研究者番号：60734580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内バルク分解系オートファジーは様々な疾患を防ぐ生体防御機構として機能する。近年、その発がん抑制機能が実験的に示されており、詳細なメカニズムの解明が待望されている。我々は、大規模なゲノム再編を引き起こすDNA複製ストレスに着目し、オートファジーが複製ストレスに由来するゲノム不安定性を防ぐ事を明らかとした。オートファジーはDNA複製ストレスを回避するためのバイパス経路に関与するタンパク質の分解を間接的に制御していた。本研究よりオートファジーが複製ストレスに由来するゲノム不安定性を抑制して発がんを防ぐ分子機構のアウトラインが示された。

研究成果の概要(英文)：Despite of redundant DNA repair systems, cells suffer tumor-causing gross chromosomal rearrangements caused by replication stress. Although recent evidence suggests that replication stress response suppresses these aberrations, the mechanism how replication stress promotes tumorigenesis in vivo is still under debate. Here we show that autophagy, intracellular bulk degradation system, protects cells from genome instability caused by replication stress. Compromise in basal autophagy results in deregulation of DNA repair systems and increase in chromosomal instability, which stem from deregulated pathway choice. Altogether, we propose that replication stress response and autophagy cooperatively facilitate chromosomal integrity during genome duplication.

研究分野：細胞生物学、遺伝学

キーワード：オートファジー 複製ストレス ゲノム安定性 がん

1. 研究開始当初の背景

近年、複製ストレスがガンを引き起こす原因として注目されている。これは、DNA複製がゲノム情報全体のコピーを作るというダイナミックな機構であり、その異常がゲノム情報の大規模な変化を引き起こすためである。残念ながら、我々の細胞がおかれている環境は理想とは程遠く、代謝から生じる活性酸素や紫外線などに由来する塩基の損傷など直接的な因子のみならず、エネルギーの不足やDNAの材料であるdNTPの欠乏などの各種生理学的要因によりDNA複製は頻繁に阻害され、複製ストレスを生じる (Zeman et al, Nature Cell Biology, 2014)。哺乳類の細胞は実際にS期に活性化されるよりもおおよそ10倍もの過剰の潜在的に使われうる複製開始点を持っている事が知られている。

これまでの研究を通じて常に問題となっていたのは、前述の通りDNA複製は周りの環境に強く影響されるため、複製ストレスの原因を探るには細胞内代謝など他の生理現象の関与を考慮するのが不可欠な事である。その中でも、細胞内バルク分解システムであるオートファジーが、DNA複製を行う最適な環境を維持するために必要であると考えていた。そこで、研究代表者はオートファジー研究を世界に先駆けて展開している吉森保教授の研究室で複製ストレスの抑制にオートファジーが関与する仕組みの研究を開始した。

本研究では、複製ストレス応答、そしてオートファジーという一見全く別の生理現象が協調して制御される機構を明らかとする。なお、本研究は異分野の融合であり、複製ストレス応答とオートファジーの詳しい関係を初めて明らかとするものである。元々、複製ストレス応答はDNA複製、修復、組換え、細胞周期制御、アポトーシスなど複数の学問領域を包含する分野である。さらに

オートファジーも大きくメンブレントラフィックに含まれ、多数の細胞内小器官が関与する複雑な機構であるため、本研究は非常に集学的な特徴を示す。複製ストレス応答は個体発生やガン抑制に必須であり、また、オートファジーは、ガン、糖尿病、腎症、感染症、心不全、神経変性疾患や炎症など多彩な疾病を抑制する。さらに免疫応答、個体発生と分化、飢餓および低酸素ストレス時の細胞生存にも必要であり、本研究は両方の基礎研究分野に大きなインパクトを与えると共に、医科学発展に大きく貢献するものである。

2. 研究の目的

複製ストレスとオートファジーの両分野にまたがる融合領域を開拓し、オートファジーが発がんを抑制するメカニズムの解明を目指す。さらに、複製ストレスをオートファジー異常の観点から捉え直し、オートファジーの関与する様々な病態に即した複製ストレスのインパクトを推察する。

3. 研究の方法

細胞生物学およびゲノム生物学の手法により以下の項目を解明し、複製ストレス応答とオートファジー両方の観点から互いの機能への関与を多面的に検討する。

- (1) 複製ストレス応答によるオートファジーの制御機構
- (2) オートファジーによる複製ストレス環境下における細胞内恒常性の維持機構

4. 研究成果

- (1) 複製ストレス応答によるオートファジーの制御機構

予備実験結果として、複製ストレスがオートファジーを誘導しうる事が示唆されていた。これをtfLC3アッセイおよび新たに開発したフローサイトメトリーを用いた手法により詳細に検討したところ、複製ストレスは

acute response としてオートファジーを誘導する事が明らかとなった。オートファジーを上流で調節する mTOR の制御を調べたが、複製ストレスは mTOR 活性に影響を与えず、飢餓誘導オートファジーと複製ストレスオートファジーは異なる機構により誘導されることが分かった。この Acute response のオートファジー誘導には、複製ストレス応答のセンサーとして主要な役割を果たす ATR の関与が siRNA および ATR kinase 活性阻害剤を用いた結果より示唆された。

ATR による翻訳後修飾によるオートファジーの制御を想定し、オートファジーの各ステップで鍵となる因子のタンパク質の変化を解析した。Rubicon は、オートファゴソームがリソソームと融合するオートファジーの最終ステップの negative regulator である。ATR の阻害剤を処理した細胞では Rubicon タンパク質が蓄積していた。これより、ATR は Rubicon タンパク質の制御を通じて複製ストレス誘導オートファジーを調節している可能性が示唆された。その他、ATR の siRNA によるノックダウンにより複数のオートファジー関連タンパク質の変化が見られたため、おそらく ATR によるオートファジーの調節は Rubicon 以外にも複数のステップをターゲットとしていると考えられる。今後これらを総合した制御機構を明らかとする予定である。

では、複製ストレスが acute で誘導するオートファジーの意義は何であろうか。複製ストレスにより複製フォークの進行が阻害された際には、通常の複製から TLS と呼ばれる特殊な複製へのスイッチが起きる。本研究では、このスイッチの鍵となるイベントである PCNA タンパクのユビキチン化がオートファジーの阻害により低下することが明らかとした。今後は複製ストレス、ATR、オートファジー誘導、PCNA のユビキチン化という流

れの詳細な分子機構を明らかとする予定である。

(2) オートファジーによる複製ストレス環境下における細胞内恒常性の維持機構
オートファジーは飢餓などにより誘導されずとも、低いレベルで常に起きており、細胞内の恒常性の維持に貢献している（基底オートファジー）。複製ストレスによる acute なオートファジー誘導に加え、この基底オートファジーが複製ストレスに関係するタンパク質の制御に関与する可能性を考慮し、オートファジー欠損細胞におけるこれらタンパク質レベルの変化を検討したところ、CtIP 等の DNA 相同組換えに関与するタンパク質量に変化が観察された。これらは DNA 複製フォークが停止した際に、regressed fork と呼ばれる中間体のプロセッシングに関与するヌクレアーゼ複合体を制御することが知られている。これに伴い、オートファジー不全細胞では、複製ストレスにより誘導される micronuclei (MN、染色体異常のマーカー) の形成が顕著に上昇していた。ヌクレアーゼ複合体の阻害剤もしくは CtIP タンパク質レベルの減少により MN の形成が抑制されたため、ヌクレアーゼ複合体の制御の異常がオートファジー不全細胞で見られる複製ストレスに由来する染色体異常の原因であると考えられる。これら CtIP 等タンパク質の異常は、オートファジーによる直接の分解ではなくむしろ、オートファジーのアダプタータンパクとして知られる p62 タンパク質の分解を介した細胞内恒常性の維持としてのオートファジーの機能が破綻して引き起こされる事を示す結果が得られた。

続いて行ったゲノムワイド解析により、オートファジー不全細胞に見られる複製ストレスが引き起こすゲノム情報の異常は完全にランダムではなくある程度の傾向がある事が判明した。今後はこれら特定の genetic locus に的を絞った解析を行い、オ

オートファジーの異常と関連のある各種生活習慣病と発がんの関係を明らかとする予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 9 件)

欧文論文(計 6 件)

- 1) Kurashima K, Sekimoto T, Oda T, Kawabata T, Hanaoka F, Yamashita T. "Pol γ , a Y-family translesion synthesis polymerase, promotes cellular tolerance of Myc-induced replication stress." *J Cell Sci.* 2018 May 18. In press (査読有)
- 2) Lu SL, Kawabata T, Cheng YL, Omori H, Hamasaki M, Kusaba T, Iwamoto R, Arimoto H, Noda T, Lin YS, Yoshimori T. "Endothelial cells are intrinsically defective in xenophagy of *Streptococcus pyogenes*." *PLoS Pathog.* 2017 Jul;13(7):e1006444. (査読有)
- 3) Sasai M, Sakaguchi N, Ma JS, Nakamura S, Kawabata T, Bando H, Lee Y, Saitoh T, Akira S, Iwasaki A, Standley DM, Yoshimori T, Yamamoto M. "Essential role for GABARAP autophagy proteins in interferon-inducible GTPase-mediated host defense." *Nat Immunol.* 2017 Aug;18(8):899-910. (査読有)
- 4) Hubber A, Kubori T, Coban C, Matsuzawa T, Ogawa M, Kawabata T, Yoshimori T, Nagai H. "Bacterial secretion system skews the fate of Legionella-containing vacuoles towards LC3-associated phagocytosis." *Sci Rep.* 2017 Mar 20;7:44795. (査読有)
- 5) Tanaka S, Hikita H, Tatsumi T, Sakamori R, Nozaki Y, Sakane S, Shiode Y,

Nakabori T, Saito Y, Hiramatsu N, Tabata K, Kawabata T, Hamasaki M, Eguchi H, Nagano H, Yoshimori T, Takehara T. "Rubicon inhibits autophagy and accelerates hepatocyte apoptosis and lipid accumulation in nonalcoholic fatty liver disease in mice." *Hepatology.* 2016 Dec;64(6):1994-2014. (査読有)

- 6) Kawabata T, Yoshimori T. "Beyond starvation: An update on the autophagic machinery and its functions." *J Mol Cell Cardiol.* 2016 Jun;95:2-10. (査読有)

和文論文(計 3 件)

- 7) 川端剛、吉森保、"オートファジーの分子機構とその破綻" **再生医療(日本再生医療学会雑誌)**, Vol.16 No1, 6-21. (2017) (査読なし)
- 8) 川端剛、吉森保、"発癌とオートファジー" **肝胆臓**, 73(2), 169-174. (2016) (査読なし)
- 9) 川端剛、吉森保、"オートファジーの膜動態分子機構と病態への関与" **THE LUNG perspectives**, Vol.23, No.2 60-65. (2015) (査読なし)

[学会発表](計 2 件)

1. 川端剛、"がんの抑制機構としてのオートファジー" **第9回横断的腫瘍フォーラム**、大阪 (2016)
2. Tsuyoshi Kawabata, Kanako Akamatsu, Tamotsu Yoshimori "Replication stress-induced autophagy promotes chromosomal stability", **2016 International A3 Foresight Symposium on Autophagy** Daejeon, Korea (2016)

[図書](計 1 件)

オートファジー 分子メカニズムの理解から病態の解明まで (監修:大隅良典、編集:吉森保、水島昇、中戸川仁) 分担執筆:第18章、オートファジーと癌、川端剛・吉森保、p188~197、(2018) 南山堂

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川端 剛 (KAWABATA, Tsuyoshi)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

研究者番号：60734580

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし