

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06825

研究課題名(和文) 発がんシグナルが誘導する複製ストレス応答機構

研究課題名(英文) Analysis of oncogene-induced replication stress response pathways

研究代表者

関本 隆志 (Sekimoto, Takayuki)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：20436322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん遺伝子が誘導する複製ストレス(発がんRS)はゲノム不安定性を介して発がんを促進する一方、このRSは細胞老化・死を引き起こすため、RSを緩和する応答機構ががん細胞の生存に寄与する。損傷乗越え合成(TLS)ポリメラーゼはRS応答に重要な役割を果たすが、発がんRSにおける機能はほとんど判明していない。

本研究では、Y-family TLSポリメラーゼPol $\eta$ がMyc誘導性RSを軽減することを見出した。また、RSによる二重鎖切断がヌクレアーゼMUS81/EME2に依存し、Pol $\eta$ とMUS81-EME2の発現抑制がRSを増強し細胞死を促進した。以上の結果は、これらが治療標的となる可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Growth of cancer cells relies on their tolerance of oncogene-induced replication stress (RS). Translesion synthesis (TLS) plays an essential role in cellular tolerance of various types of RS. However, limited information is available about the role of TLS polymerases in oncogene-induced RS.

Pol $\eta$ , a Y-family TLS polymerase, promotes cellular tolerance of Myc-induced RS. Pol $\eta$  was recruited to Myc-induced RS sites, and Pol $\eta$  depletion enhanced the Myc-induced stalling of replication forks and the subsequent generation of double-strand breaks (DSBs). In the absence of Pol $\eta$ , Myc-induced DSB formation depended on MUS81-EME2, and concomitant depletion of MUS81-EME2 and Pol $\eta$  enhanced RS and cell death in a synergistic manner. Collectively, these results indicate that Pol $\eta$  facilitates fork progression during Myc-induced RS. Additionally, the present study highlights the possibility of a synthetic lethal interaction between Pol $\eta$  and MUS81-EME2 in cells experiencing Myc-induced RS.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：発がん性複製ストレス Y-familyポリメラーゼ Polymerase Mus81 and EME2 合成致死

1. 研究開始当初の背景

がん遺伝子の活性化などの発がんシグナルは、複製開始点の過剰活性化、DNA 再複製、酸化ストレス、ヌクレオチド不足や転写・複製装置の衝突などを原因とする DNA 損傷を引き起こし、複製フォークを遅延・停止させる (発がん性複製ストレス {replication stress}: 発がん RS)。その結果活性化するヌクレアーゼにより生じる DNA 二重鎖切断(DSB)は、細胞死や細胞周期チェックポイントを介した細胞老化を誘導し腫瘍抑制に働く。一方、DSB はゲノム不安定性を介した発がんやその悪性化の原因となり、また、RS 応答機構による DSB 修復や複製フォークの修復・複製再開は腫瘍細胞の増殖、生存に重要な働きを果たす。したがって、これら発がん RS やそれに対する応答機構を明らかにすることは、発がん過程を解明し、がんの新規治療法の開発に繋がる事が考えられ非常に重要である。

紫外線や化学物質に対する RS 応答機構については、近年理解が進み、(1) 細胞周期チェックポイントを作動させる「ATR-Chk1 経路」、(2) ファンconi 貧血 (fanconi anemia: FA) と家族性乳がん(BRCA)の原因遺伝子群から構成され、ゲノム安定化と腫瘍抑制に働く「FA/BRCA 経路」、(3) Y-family ポリメラーゼ (Y-Pol) をはじめとする複製忠実度の低いポリメラーゼにより損傷 DNA を乗り越えて複製を継続する「損傷乗り越え DNA 合成 (TLS)」、(4) リコンビナーゼ Rad51 を中心とする「相同組換え (HR)」などが協同して RS の解消・軽減に働く (図 1)。発がん RS に

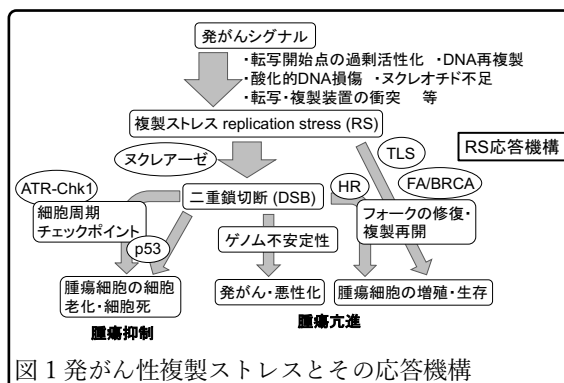


図 1 発がん性複製ストレスとその応答機構

おいてもこれらがストレスの軽減に働く事が明らかになりつつあるが、発がん RS の発生・応答機構は多様であり、いまだ不明な点が多い。

2. 研究の目的

我々は、Y-Pol と FA/BRCA 経路の制御機構の研究を行い、分子シャペロン Hsp90 が、FA 蛋白の一つ FANCA の安定性や細胞内動態の制御を介して FA/BRCA 経路を調節していること、Y-Pol の安定性や複製障害部位への動員の制御を介して TLS に影響することを報告してきた。これらの研究を遂行する中で、発がん RS 応答機構に着目し研究を開始した。その成果として、発がんシグナルによる複製異常の主な現象の一つである DNA 再複製に Y-Pol が関与する事を報告した。さらに、がん遺伝子 c-Myc (Myc) が誘導する発がん RS を Y-Pol の一員であるポリメラーゼ  $\eta$  (Pol $\eta$ ) が軽減する可能性を見いだした。そこで、本研究では Myc 誘導性 RS における Pol $\eta$  の働きを解明する事を目的として研究をおこなった。

3. 研究の方法

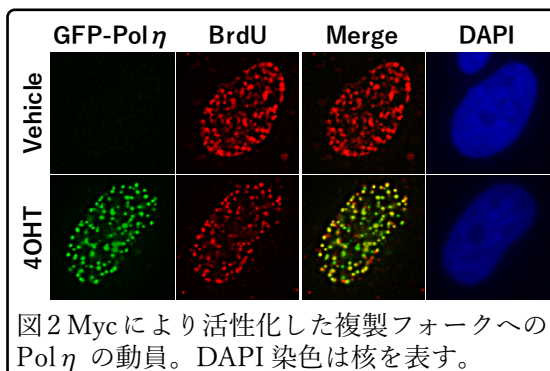
Myc 誘導性発がん RS のモデル細胞系として、タモキシフェン感受性のエストロゲンレセプターリガンド結合ドメインと Myc 融合タンパクを定常的に発現したヒト骨髄腫由来低悪性腫瘍細胞株 U2OS を作成した (U2OS/Myc-ER)。この細胞は、4-hydroxytamoxifen (4OHT) 添加により、Myc 発現・活性化を誘導できる。このモデル実験系において、種々の細胞生物学、分子生物学、生化学的手法を用いて、Myc 誘導性発がん RS における Pol $\eta$  の働きを解析する。

4. 研究成果

(1) 4OHT 処理による Myc 活性化は一過的に DNA 合成を促進させ、その結果生じる RS により、G2 期細胞周期停止や細胞死を介した増

殖抑制を誘導する。RNA 干渉法により各 Y-Pol (Pol  $\eta$ , Pol  $\iota$ , Pol  $\kappa$ , REV1)の発現を抑制した上で4OHT 処理をおこなったところ、G2 期細胞周期停止、細胞死が Pol  $\eta$  抑制により増加したが、その他の Y-Pol 抑制ではほとんど効果が無かった。このことから、Myc 誘導性 RS の軽減に Pol  $\eta$  が関与することが示唆された。

(2) Myc 誘導性 RS 部位への Pol  $\eta$  の動員を確認するために GFP 標識 Pol  $\eta$  を安定的に発現する U2OS/Myc-ER 細胞を作製した。この細胞において、4OHT 処理により Y-Pol の動員に重要な働きをするモノユビキチン化 PCNA (Ub-PCNA)の増加や、免疫沈降法により Ub-PCNA と GFP-Pol  $\eta$  の結合を確認した。また、Myc によって活性化される複製フォーク (BrdU 取り込みにより検出)に GFP-Pol  $\eta$  が動員された (図 2)。さらに、割合は低いが内在性 Pol  $\eta$  の動員も確認された。

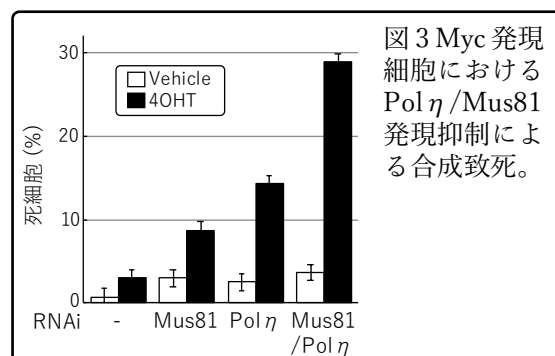


(3) IdU, CldU でパルス標識した DNA を抽出し、1 分子ごとに複製ダイナミクスを定量化出来る DNA fiber 法により複製速度を測定した。Pol  $\eta$  発現抑制は Myc による複製速度低下をさらに亢進させた。複製速度低下は、フォークの遅延・停止のどちらでも観察されるため、フォーク停止の指標としフォークの非対称性を測定したところ、Myc による非対称性が Pol  $\eta$  発現抑制で増加した。この結果は Pol  $\eta$  が Myc による複製フォークの停止を軽減する事を示唆する。また、RS の結果生じる

DSB も Pol  $\eta$  発現抑制で増加した。

(4) RS の軽減に Pol  $\eta$  の酵素活性が必要か調べるため、触媒活性を欠損し、内因性 Pol  $\eta$  に対して dominant-negative 効果を示す Pol  $\eta$  変異体 (dead-Pol  $\eta$ ) を作製した。U2OS/Myc-ER 細胞に野生型 Pol  $\eta$  と dead-Pol  $\eta$  をレンチウイルスで導入後、4OHT 処理をおこなったところ、野生型 Pol  $\eta$ 、dead-Pol  $\eta$  のどちらも Myc により foci を同程度形成したが、野生型 Pol  $\eta$  と異なり dead-Pol  $\eta$  foci のほぼ全てが DSB マーカーである  $\gamma$ H2AX と共局在した。これは、Myc によるフォーク停止の Pol  $\eta$  による軽減を dead-Pol  $\eta$  が阻害して DSB を生成したと考えられ、Myc による RS の解消に Pol  $\eta$  のポリメラーゼ活性が必要な事を示唆する。

(5) RS により活性化される構造特異的ヌクレアーゼ Mus81 は、S 期では EME2 と、G2/M 期では EME1 とヘテロダイマーを形成し働くことが報告されている。Pol  $\eta$  抑制条件における Myc による DSB 形成にこれらヌクレアーゼが関与するかを、DSB 形成を指標として解析した。Myc 活性化/Pol  $\eta$  発現抑制による DSB の増加が Mus81 および EME2 発現抑制で減少し、一方、EME1 発現抑制ではその効果が見られなかった。また、Pol  $\eta$ , Mus81, EME2 の抑制で Myc による RS や細胞死は増加し、Pol  $\eta$  と Mus81 もしくは EME2 の二重抑制により RS、細胞死が相乗的に増加した (図 3)。これらのことは、Myc 高発現細胞にお



いて Pol $\eta$  が機能しない時には Mus81/EME2 による DSB 形成を介するフォーク修復・再開が RS を軽減していることを示唆する。

以上の結果は、Pol $\eta$  が Myc 誘導性発がん RS を軽減することでがん細胞の増殖・生存に寄与し、Pol $\eta$  が機能しない時には、Mus81/EME2 が fail-safe 機構として同様に働くことを示唆する。

臨床的知見との関連では、未治療の肺がんや卵巣癌のがん幹細胞などで Pol $\eta$  の発現増加が報告されており、これは発がん RS によって選択を受けた細胞の増大による可能性が考えられる。また、Pol $\eta$  と Mus81/EME2 の阻害が合成致死を利用する治療開発につながる事が期待される。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Kurashima, K., Sekimoto, T., Oda, T., Kawabata, T., Hanaoka, F., Yamashita, T. Pol $\eta$ , a Y-family translesion synthesis polymerase, promotes cellular tolerance of Myc-induced replication stress. *J. Cell Sci.* 査読有, in press.  
DOI: 10.12412/jcs.212183
- ② Oda, T., Sekimoto, T., Kurashima, K., Fujimoto, M., Nakai, A., Yamashita T. Acute HSF1 depletion induces cellular senescence through the MDM2-p53-p21 pathway in human diploid fibroblasts. *J. Cell Sci.* 査読有, 131, 2018, jcs210724  
DOI:10.12412/jcs.210724

[学会発表] (計 13 件)

- ① 関本隆志、倉島公憲、小田司、川端剛、松田美弥子、中村瑠里、大圃真澄、花岡文雄、山下孝之。Y-family ポリメラーゼ Pol $\eta$  は Mus81/EME2 スクレアーゼ複合体と協同

してがん遺伝子 c-Myc による replication stress (RS) を緩和する。第 40 回分子生物学会年会、2017 年 12 月 6 日神戸

- ② 小田司、関本隆志、倉島公憲、中村瑠里、松田美弥子、大圃真純、山下孝之。MDM2 阻害因子 Dehydrogenase/reductase 2 (DHRS2) の細胞老化における役割。第 40 回分子生物学会年会、2017 年 12 月 6 日神戸
- ③ 中村瑠里、小田司、関本隆志、松田美弥子、大圃真純、半田寛、笠松哲光、齋藤貴之、村上博和、山下孝之。DNA 架橋剤メルファランは多発性骨髄腫細胞株において腫瘍組織適合抗原クラス II (MHC II) の転写活性化因子 CIITA の発現を促進する。第 40 回分子生物学会年会、2017 年 12 月 7 日神戸
- ④ 倉島公憲、関本隆志、小田司、花岡文雄、山下孝之。Myc 誘導性複製ストレス応答において Pol $\eta$  と MUS81-EME2 の二重阻害は合成致死を示す。第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月 28 日横浜
- ⑤ 小田司、関本隆志、倉島公憲、山下孝之。HSF1 抑制は DHRS2-MDM2-p53 経路を介してヒト線維芽細胞に老化を誘導する。第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月 30 日横浜
- ⑥ 倉島公憲、関本隆志、小田司、花岡文雄、山下孝之。Y-family ポリメラーゼ Pol $\eta$  とエンドヌクレアーゼ Mus81-Eme2 複合体は段階的に協調して c-MYC がん遺伝子誘導性複製ストレスを抑制する。第 39 回分子生物学会年会、2016 年 12 月 2 日横浜
- ⑦ 小田司、関本隆志、倉島公憲、山下孝之。熱ショック応答転写因子 Heat shock factor 1 (HSF1) の発現抑制による細胞老化は MDM2 阻害蛋白 Dehydrogenase/reductase 2 (DHRS2) に

制御されている可能性がある。第 39 回分子生物学会年会、2016 年 12 月 1 日横浜

- ⑧ 倉島公憲、関本隆志、小田司、花岡文雄、山下孝之。Yファミリー損傷乗越えポリメラーゼ Pol $\eta$  は c-Myc 誘導性複製ストレスを軽減する。第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 8 日横浜
- ⑨ 小田司、関本隆志、倉島公憲、山下孝之。HSF1 抑制はタンパク質毒性ストレス非依存的に細胞老化を誘導する。第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 8 日横浜
- ⑩ 倉島公憲、関本隆志、小田司、川端剛、花岡文雄、山下孝之。Y-family 損傷乗り越え DNA ポリメラーゼ(Y-Pol)の一員 Pol $\eta$  は MYC がん遺伝子の誘導する複製ストレスを軽減する。第 38 回分子生物学会年会、2015 年 12 月 2 日神戸
- ⑪ 小田司、関本隆志、倉島公憲、山下孝之。Heat shock factor 1 (HSF1)抑制は DNA 損傷および蛋白変性ストレスと独立して細胞老化を誘導する。第 38 回分子生物学会年会、2015 年 12 月 3 日神戸
- ⑫ 倉島公憲、関本隆志、小田司、花岡文雄、山下孝之。Y-ファミリーDNA ポリメラーゼの一つである Pol $\eta$  は c-myc により誘導される DNA 二本鎖切断の生成を抑制する。第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8 日名古屋
- ⑬ 小田司、関本隆志、倉島公憲、山下孝之。HSF1 抑制は細胞依存的なメカニズムで老化を誘導する。第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月 8 日名古屋

[その他]

ホームページ等

群馬大学生体調節研究所遺伝子情報分野

<http://molgen.imcr.gunma-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

関本 隆志 (SEKIMOTO, Takayuki)

群馬大学生体調節研究所・助教

研究者番号 20436322 :

### (3)連携研究者

山下 孝之 (YAMASHITA, Takayuki)

群馬大学生体調節研究所・教授

研究者番号 : 10166671

小田 司 (ODA, Tsukasa)

群馬大学生体調節研究所・助教

研究者番号 : 10323643