

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K16127

研究課題名(和文) ユビキチン依存的DNA-PK活性化が導く抗がん剤感受性のメカニズム解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of cell sensitivity against anti-cancer drug caused by ubiquitination-dependent DNA-PK activation

研究代表者

逆井 良 (SAKASAI, Ryo)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：10549950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：抗がん剤であるカンプトテシン(CPT)は、DNA切断端を一つしか持たない損傷(one-ended DSB)を生じる。one-ended DSBの修復に非相同末端連結(NHEJ)が関与すると細胞にとって毒性を示すと考えられ、CPTによる抗がん効果を考える上では、one-ended DSBに対するNHEJ経路の関与機構を明らかにすることは重要となる。

これまでの研究から、ユビキチン化因子であるUbcH5がNHEJに関与し、染色体異常の発生や、CPTへの抵抗性に寄与することを見出した。E3ユビキチンリガーゼとしてSIAH1も同定したが、UbcH5とは異なる影響が見られた。

研究成果の概要(英文)：Anti-cancer drug camptothecin (CPT) causes DNA double-strand break (DSB) containing a single-DNA end that is referred to as one-ended DSB. Given that contribution of non-homologous end joining (NHEJ) to the repair of one-ended DSBs are considered to sensitize cells to CPT, it is important to reveal the mechanism of NHEJ contribution to the repair of one-ended DSBs for consideration of CPT efficacy in the chemotherapy.

Several researches suggested that UbcH5 is involved in the appearance of chromosome aberrations and CPT-resistance via NHEJ. SIAH1 was also identified as E3 ubiquitin ligase that is involved in NHEJ activation, but it has showed different phenotypes from UbcH5 so far.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA二本鎖切断 非相同末端連結 相同組換え修復

### 1. 研究開始当初の背景

放射線等によって引き起こされる DNA 二本鎖切断 (DSB) は二つの DNA 末端を持ち、非同末端連結 (NHEJ) 経路または相同組換え (HR) 経路で修復される。一方、DNA 一本鎖切断 (SSB) が DNA 複製を介して、DNA 末端を一つしか持たない DSB (RM-DSB) へと変換されることがある。抗がん剤であるカンプトテシン (CPT) は、SSB を蓄積させ、複製を介して RM-DSB を発生させる。RM-DSB は、主に HR 経路で修復されると考えられている。しかし、その一部が NHEJ で修復されると、染色体異常が発生し細胞死につながることを研究代表者らを含めた研究から示唆されている。即ち、CPT による抗腫瘍 (殺細胞) 効果は、NHEJ 依存的であると言える。

研究代表者は、CPT 処理後、NHEJ 因子である DNA-PK の活性化がユビキチン化依存的であり、DNA-PK の活性化により S 期 DNA 損傷チェックポイントの活性化と細胞死が誘導されることを見出し、RM-DSB に特異的な DNA-PK の活性化経路が存在するのではないかと考えた。その経路に関わる因子を見出し、それらの因子の発現や挙動を調べることで、CPT による抗腫瘍効果の予測を可能にすると考えられる。

### 2. 研究の目的

CPT を含む DNA トポイソメラーゼ I 阻害剤の抗がん剤としての効果を考える上で、NHEJ の寄与が大きく影響することが示唆されている。そこで本研究では、RM-DSB に対する DNA-PK 活性化のメカニズムを解明し、DNA-PK の RM-DSB 修復と細胞周期制御、細胞死における役割を明らかにする事を目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、RM-DSB に対する DNA-PK 活性化のメカニズムとその意義を明らかにする目的で、以下に示すように、特に 3 つの研究を行うことを計画した。

#### (1) RM-DSB による DNA-PK 活性化機構の解明 (図 1)

##### ① Ku タンパク質要求性

ヒト培養細胞で Ku ノックアウト細胞を作成する。CRISPR/CAS9 技術と、タンパク質を即座に分解できる AID システムを利用し、Ku タンパク質を相補した上で Ku 遺伝子をノックアウトする。これにより、任意のタイミングで Ku タンパク質を除去でき、DNA-PK 活性化への影響を解析可能となる。

##### ② DNA end resection との関連

CtIP は DNA end resection 反応自体を制御するマスター制御因子であり、Mre11 および Exo1 というヌクレアーゼが直接 DNA を削り込む。これらの因子のノックダウンや阻害剤等を用い、DNA-PK が活性化する RM-DSB の構造を明らかにする。

##### ③ E3 ユビキチンリガーゼの探索

DNA-PK 活性化に必要な E2 ユビキチン結合酵

素 UbcH5 と共に働く E3 ユビキチンリガーゼを同定するため、UbcH5 と相互作用する E3 リガーゼの中から DNA 損傷応答に関連するもの (候補として 27 遺伝子を考えている) に対して、DNA-PK 活性化を指標に RNAi スクリーニングを行う。

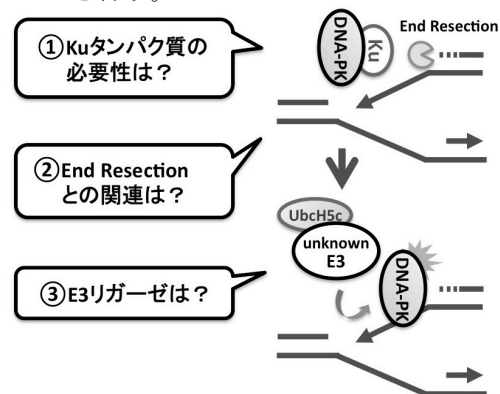


図1 RM-DSBに対するDNA-PK活性化機構の解析

#### (2) RM-DSB 修復経路および細胞周期制御における DNA-PK 経路の機能の解明 (図 2)

##### ① RM-DSB 修復経路の解析

局所的に誘導された DSB では NHEJ 因子の集積を観察できることが知られている。そこで、UV レーザーを用いて核内の局所に RM-DSB を誘導する新たな系を構築する。DSB 誘導の場合は、レーザー照射前に BrdU 等を添加するが、未添加で照射すると SSB が生じる事が知られている。したがって、S 期で BrdU 未添加でレーザーを照射する事で、RM-DSB を誘導できると考えられる。これにより、RM-DSB への修復因子の集積を可視化でき、経時的な解析が可能となる。UbcH5 経路の不活化細胞で NHEJ および HR 因子の集積を解析し、UbcH5 の NHEJ への関与機構を解析する。レーザー照射実験は、群馬大学で柴田淳史氏の協力のもと行う予定である。

また、RM-DSB に対し、NHEJ 経路が働く事で染色体異常が生じると考えられている。そこで、NHEJ 経路の指標として Radial chromosome と呼ばれる分岐型染色体異常の出現頻度を解析し、HR 欠損細胞において UbcH5-DNA-PK 経路が実際に染色体異常を促進するかを調べる。

##### ② DNA 損傷チェックポイントへの関与機構

DNA-PK の S 期チェックポイントへの関与を明らかにするため、合成 DNA をラベルし、DNA 複製効率および DNA 複製鎖長の解析を行う。加えて、DNA-PK 経路のチェックポイントシグナルへの関与も解析し、チェックポイントにおける DNA-PK の作用点を明らかにする。

#### (3) 抗がん剤の抗腫瘍効果に対する DNA-PK 経路の影響の解明 (図 2)

DNA-PK 経路の機能が、最終的に細胞の抗がん剤感受性を上げるかどうかを解析する。CPT と同じく、RM-DSB 型抗がん剤と考えられている PARP 阻害剤も用いる。具体的には、UbcH5c-DNA-PK 経路を不活化した細胞が、抗

がん剤に対し抵抗性を示すかどうかを解析する。また、HR 経路を不活化した細胞においても、DNA-PK 経路の不活化が抗がん剤抵抗性を与えるかどうかを解析する。解析には、96 well プレート上で、発光により細胞生存量を測定する系を用いることで、非常に迅速で簡便に感受性試験が可能となる。

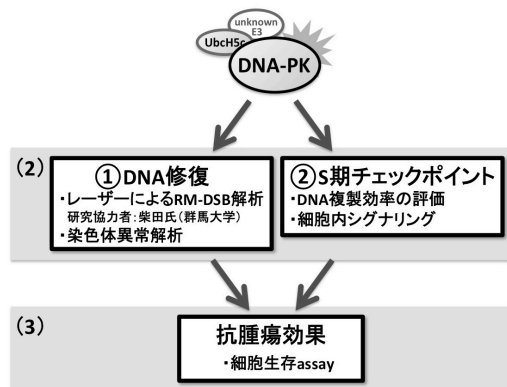


図2 DNA-PKによるDNA修復・チェックポイント・抗腫瘍効果に対する影響解析

#### 4. 研究成果

##### (1) RM-DSB による DNA-PK 活性化機構の解明

① Ku の要求性に関しては、siRNA によるノックダウンで試みたが、条件検討を重ねても高効率でのノックダウンがうまくいかず、RM-DSB に対する応答への Ku の影響は評価できていない。実際、同条件で DSB に対する DNA-PK 活性化を評価しても、影響は見られていないため、Ku のノックダウンが不十分であると考えられた。Ku ノックアウトと AID を組み合わせた方法に関しては、CRISPR/Cas9 の条件検討もあり、細胞株作製には進んでいないため、RM-DSB に対する DNA-PK 活性化に対する Ku の要求性に関しては、結論が出ていない状況である。

② RM-DSB に対する DNA-PK 活性化への end resection 因子の影響を解析したところ、まず、CtIP ノックダウンにより CPT による DNA-PK 活性化が亢進したため、resection は DNA-PK 活性化に抑制的に働き、DNA-PK は resection を受ける前の blunt 型の末端構造に対し活性化していると考えられた。CtIP ノックダウン細胞でさらに Ubch5 をノックダウンすると、コントロール細胞と同様に DNA-PK の活性化は抑制されるため、Ubch5 による DNA-PK 活性化制御は、resection の亢進等ではなく、DNA-PK 活性化機構そのものに関与していると考えられる。

##### (2) RM-DSB 修復経路および細胞周期制御における DNA-PK 経路の機能の解明

① RM-DSB 修復経路の解析として、UV レーザーを用いた局所での RM-DSB の誘導系の開発を、群馬大学の柴田淳史氏の協力のもと試みた。RM-DSB を誘導させるには、S 期の細胞を識別できる必要がある。そのため、緑色蛍

光タンパク質である mAG を融合させた Geminin タンパク質を定常的に発現する BJ 線維芽細胞を用いた。また RM-DSB の検出には、53BP1 の foci 形成に必要な領域に mCherry を融合させたタンパク質を用いて行った。レーザー照射およびライブでの観察は Deltavision OMX で行った。DSB の誘導が目的ではないため、増感剤としての BrdU は添加しない。レーザー出力および照射時間の検討を行い、レーザートラックに 53BP1 の集積が観察される条件は見出したが、残念ながら Geminin 陰性の細胞でも集積が検出されてしまい、RM-DSB が誘導できているとする条件の設定には至っていない。

NHEJ 関与の指標としての radial chromosome の検出も試み、resection 抑制細胞では、DNA-PK 活性化の亢進と関連して、Radial chromosome の上昇が観察された。この条件で Ubch5 をノックダウンすると Radial chromosome が減少したことから、Ubch5 が DNA-PK の活性化を制御することで NHEJ に関与することが示唆された。また、53BP1 のノックダウンでも減少がみられ、radial chromosome は離れた領域にある RM-DSB 同士が連結されてしまう現象であることが確認された。しかし、HR 欠損細胞で radial chromosome が増加するかについては検証に至っていない。一方、パートナー-E3 として同定した SIAH1 のノックダウン細胞では、Radial chromosome への影響は観察されなかった。

② DNA 損傷チェックポイントへの関与機構の解析としては、これまでに PI 染色による細胞周期全体の動きはモニターされており、CPT 処理後の細胞周期の停止が、DNA-PK 阻害および Ubch5 ノックダウンでは、抑制されていることが見出されていた。そこで、さらに詳しく解析するため、EdU で合成 DNA をラベルして解析したところ、Ubch5 ノックダウン細胞では EdU の取り込み自体が減少しており、Ubch5 ノックダウンにより、DNA 複製が下がる、もしくは S 期の細胞が減少している可能性が考えられた。

##### (3) 抗がん剤の抗腫瘍効果に対する DNA-PK 経路の影響の解明

抗腫瘍効果の評価として、CPT への感受性試験を U2OS 細胞を用いて行った。CPT を短時間処理し、CPT 添加から 48 時間後の生細胞数から CPT の影響を評価した。その結果、Ubch5 ノックダウン細胞では CPT に対して感受性となった。これまで、NHEJ 欠損細胞は CPT に対し抵抗性になることが報告されており、これと逆の結果であった。Ubch5 は、CPT に対する応答以外にも非常に多岐にわたる現象への関与が報告されている。したがって、CPT 感受性となった原因は、NHEJ への関与以外にも多くの要因が重なった結果ではないかと推測した。しかし、SIAH1 ノックダウン細胞では CPT 感受性は見られず、コントロールと

変わらない生存率をしめした。これらの結果から、UbcH5 と SIAH1 は同一経路ではなく、SIAH1 はDNA-PKの活性化には影響するものの、NHEJ の効率にまでは影響を及ぼさない程度の寄与度ではないかと考えられる。

#### 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4件)

①Sunatani Y, Kamder RP, Sharma MK, Matsui T, Sakasai R, Hashimoto M, Ishigaki Y, Matsumoto Y, Iwabuchi K. Caspase-mediated cleavage of X-ray repair cross-complementing group 4 promotes apoptosis by enhancing nuclear translocation of caspase-activated DNase. *Exp. Cell Res.* (2017) doi: 10.1016/j.yexcr.2017.12.009 査読有り

② Sakasai R, Isono M, Wakasugi M, Hashimoto M, Sunatani Y, Matsui T, Shibata A, Matsunaga T, Iwabuchi K. Aquarius is required for proper CtIP expression and homologous recombination repair. *Sci. Rep.* (2017) doi:10.1038/s41598-017-13695-4 査読有り

③Iimori M, Watanabe S, Kiyonari S, Matsuoka K, Sakasai R, Saeki H, Oki E, Kitao H, Maehara Y, Phosphorylation of EB2 by Aurora B and CDK1 ensures mitotic progression and genome stability. *Nat. Commun.* (2016) doi: 10.1038/ncomms11117 査読有り

④ Sakasai R and Iwabuchi K, The distinctive cellular responses to DNA strand breaks caused by a DNA topoisomerase I poison in conjunction with DNA replication and RNA transcription. *Genes and Genetic Systems* (2015) 187-194 査読有り

[学会発表] (計8件)

①ユビキチン化因子UBE2E2によるDNAトポイソメラーゼIIの制御. 逆井良、砂谷優実、松井理、岩淵邦芳, 第24回DNA複製・組換え・修復ワークショップ 平成29年11月27日～11月29日 (岐阜県岐阜市)

②Analysis of repair pathway for one-ended DNA double-strand breaks. 逆井良、砂谷優実、松井理、岩淵邦芳, 日本放射線影響学会第60回大会 平成29年10月25日～10月28日 (千葉県千葉市)

③PARP- and TDP1-dependent repair pathways of one-ended DNA double-strand breaks

caused by camptothecin. 逆井良、砂谷優実、松井理、岩淵邦芳, 第76回日本癌学会学術総会 平成29年9月28日～9月30日 (神奈川県横浜市)

④RNAヘリカーゼAquariusはDNA-RNAハイブリッドを解消して相同組換え修復を促進する. 逆井良 磯野真由 若杉光夫 橋本光正 砂谷優実 松井理 柴田淳史 松永司 岩淵邦芳, 第39回日本分子生物学会年会 平成28年11月30日～12月2日 (神奈川県横浜市)

⑤RNAヘリカーゼAquariusはR-loopを解消して相同組換え修復を促進する. 逆井良 磯野真由 若杉光夫 橋本光正 砂谷優実 松井理 柴田淳史 松永司 岩淵邦芳, 日本放射線影響学会第59回大会, 平成28年10月26日～10月28日 (広島県広島市)

⑥Topoisomerase II switching is regulated by ubiquitination. Sakasai R, Sunatani Y, Matsui T, Iwabuchi K, Gordon Research Conference, DNA Topoisomerase in Biology & Medicine 平成28年8月7日～8月12日 (米国メーン州Sunday River)

⑦Top2 poisonに対する主要調節因子であるユビキチン化酵素の同定. 逆井良、砂谷優実、松井理、橋本光正、岩淵邦芳, 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会 平成27年12月1日～12月4日 (兵庫県神戸市)

⑧Ubiquitin-dependent activation of DNA-PKcs leads to chromosomal aberration in response to one-ended DNA double strand breaks. Ryo Sakasai, Yumi Sunatani, Tadashi Matsui, Mitsumasa Hashimoto, Kuniyoshi Iwabuchi, ICRR2015 15th International Congress of radiation Research 平成27年5月25日～5月29日 (京都府京都市)

[その他]

ホームページ等

<http://kmu-bc1.jimdo.com>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

逆井 良 (SAKASAI, Ryo)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号: 10549950

(2) 研究協力者

柴田 淳史 (SHIBATA, Atsushi)

群馬大学・大学院医学系研究科・大学院研究教育支援センター・研究講師

研究者番号: 30707633