

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18478

研究課題名(和文) ATR-CDC6系を介した内因性複製ストレス応答によるゲノム安定性維持機構の解明

研究課題名(英文) A role of ATR-CDC6 pathway for the maintenance of genome integrity in response to endogenous stress during DNA replication

研究代表者

吉田 和真 (Yoshida, Kazumasa)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：80715392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：複製チェックポイントキナーゼATRは、細胞の生存に不可欠である。本研究では、内因性複製ストレスによるATRの活性化機構とそこでのCDC6の役割を明らかにすることを目的とし、外的複製ストレス有無の条件下でヒトATRおよびその関連因子の染色体結合動態を解析した。また、DNA-タンパク質複合体による複製フォーク停止を人工的に誘導できる実験系を新規に構築した。本実験モデル系は、異常停止したフォークでのストレス応答機構の解析に有用であり、ゲノム不安定性を示すがんや遺伝性疾患の原因究明および治療法研究開発の強化につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：ATR is a checkpoint kinase responding to DNA replication stress and essential for cell survival. This study aimed to reveal how ATR is activated in response to the endogenous replication stress and how CDC6 functions in such process. We analyzed the chromatin binding kinetics of human ATR and its co-factors in the presence and absence of exogenous replication stress. In addition, we have established an experimental model system that recapitulates replication fork arrest using an artificial DNA-protein tethering on the chromatin. This model system is useful for the analysis of stress response mechanism(s) at stalled forks and would provide a further understanding of cancer and genetic diseases characterized by genomic instability. Further development in therapy of such diseases would also be anticipated.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA複製 複製ストレス ATR 染色体 DNA損傷応答 ゲノム安定性 細胞周期

## 1. 研究開始当初の背景

DNA複製フォークの異常な停止は、一本鎖DNAの露出やDNA二重鎖切断(DSB)につながり、染色体不安定性の一因となる。ゲノムの恒常性を維持するために、細胞はDNA複製が阻害されるとその負荷(複製ストレス)を感知し、複製フォークの安定化、細胞周期の進行阻止、損傷の修復等を行う。ATR (Ataxia telangiectasia and Rad3-related)は、複製ストレスへの応答経路の最も上流で働くキナーゼであり、停止した複製フォークに呼び込まれて種々の下流因子をリン酸化する (Cimprich & Cortez, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 9:616, 2008)。同じくDNA損傷応答に関わるPI3キナーゼファミリーであるATMおよびDNA-PKとは異なり、ATRは細胞増殖に必須である。これは、自然な染色体代謝が内的な複製ストレス要因になっており、それらに応答するATRの機能が重要であることを示唆している(図1)。しかし、通常の細胞周期におけるATR機能とその制御については、微弱な活性の検出が困難なためか、ほとんど解析が進んでいなかった。

近年、複製ストレス応答機構の重要な制御因子として、ATRの新規結合因子がいくつか同定されている。その一つとして、我々は、複製開始制御因子でもあるCDC6を同定した (Yoshida et al., *J. Cell Sci.*, 123: 225, 2010)。ヒト培養細胞系及びカエル卵抽出液のin vitro系において、我々はCDC6がS期にATRと結合することを見だし、これが細胞内dNTPを枯渇させるヒドロキシウレア(HU)による複製フォーク停止時の細胞周期停止制御に関わることを明らかにした。ATR依存性の複製ストレス応答にCDC6が必要であることは、我々の結果に加えて分裂酵母においても報告があり (Hermand & Nurse, *Mol. Cell*, 26:553, 2007)、これは真核生物に保存された重要な機構であると考えられた。

これまで、複製ストレス応答機構の研究は、DNA複製阻害薬(HUやアフィディコリン等)に対する応答の解析を中心に進んできた。現在のモデルにおいて、ATRは一本鎖DNA部分に結合したRPA依存的にストレス部位へと呼び込まれ、そこでRad9-Hus1-Rad1複合体やTopBP1等の補助因子の働きによって活性化されて機能を果たすと考えられている。しかし、通常の細胞増殖におけるATRの活性化については不明な点が多い。どのような内的要因が、ゲノム中のどこで、どのようにしてATRを活性化するのかは明確ではない。

## 2. 研究の目的

我々は、発がんに結びつく内因性複製ストレスに対して応答するゲノム安定性維持機構の理解をめざしている。本研究では、CDC6がATR制御に重要であるという発見も踏まえて、微弱な複製ストレスに対するATR活性化の制御機構の解明を目的とした。下記の2つのアプローチにより、種々の複製ストレス

条件下におけるヒトATRおよびその関連因子の染色体結合動態を解析した。

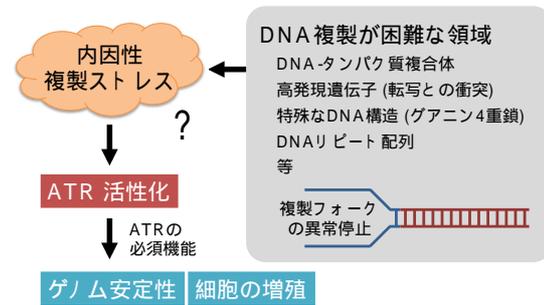


図1: ATRの必須機能とその活性化メカニズムは?

## 3. 研究の方法

(1) 複製ストレスへの感受性が高い染色体領域として、例えばCommon Fragile Siteと呼ばれる脆弱部位が知られている (Durkin & Glover, *Annu. Rev. Genet.*, 41: 169, 2007)。この領域では複製フォークの停止が頻発すること、ATR経路がこの領域の染色体安定性を維持していることが報告されている。本研究では、このような領域や複製開始領域におけるATR関連因子のクロマチン結合を、外的複製ストレス有無の条件下において、クロマチン免疫沈降-定量PCR (ChIP-qPCR)法により調べた。主にHeLa細胞を用いた。外的複製ストレスを誘導するために、HUを種々の濃度で用いた。各タンパク質の染色体全域への集合・遊離のパターンは、生化学的な細胞分画によって検証した。

当初はATRのクロマチン結合の解析を試みた。しかし、一般的なChIP法ではクロマチン調製の際にATRタンパク質が分解され、免疫沈降を行うことが困難であった。種々の試行を経た現在でも至適条件ではない可能性も残っている(後述)。そこで、計画を変更しATR活性化に関わる他の因子Rad9およびTopBP1のChIP解析を進めた。

(2) 我々は、最近、多コピー-lacO配列を安定保持するU2OS 2-6-3細胞 (Janicki et al., *Cell*, 116:683, 2004)に配列特異的結合タンパク質LacIを発現させることによって、局所的に複製ストレス応答を誘導できる系を作製した<sup>学会発表4</sup>。これは、ヒト培養細胞の染色体上で、強固なタンパク質-DNA複合体との衝突による複製フォークの異常停止を再現できる系であると考えられた。本研究では、この人工的フォーク停止部位へのATR関連因子の集積を免疫蛍光染色法およびChIP法により検出した。

## 4. 研究成果

ヒト培養細胞において、ChIP-qPCR法および新規に構築した人工的複製フォーク停止誘導系を駆使し、複製ストレス応答機構を解析した。主な成果として以下の5つがあげられる。

**(1) ATR およびその活性化因子 Rad9 と TopBP1 は、外的ストレスがない時でも複製ストレス高感受性領域に結合している。**

ATR の染色体結合について ChIP-qPCR 法により解析した。低濃度の HU 有無の条件下で、染色体脆弱部位および初期複製開始点への結合について調べた。現在の実験条件において、ATR は調べた全ての部位に HU 処理前から一定量が結合しており、低濃度の HU 処理によって結合量が減少することが示された。さらに、高濃度 HU で処理した場合にも同様に ATR の染色体からの遊離が観察された。ATR の結合シグナルが ATR 発現抑制により減少することによって、ChIP の特異性を確認した。ATR のこの動態は、ATR が複製フォークの異常停止に反応してクロマチンに呼び込まれるという現在の ATR 活性化機構のモデルとは異なっており、興味深い。しかし、生化学的分画法を行ったところ、HU 処理により ATR 結合は増加し、ChIP の結果とは一致しなかった。今後、ATR-ChIP シグナル減少の原因を精査し、外的複製ストレス有無での ATR のクロマチン結合制御機構を明らかにしていく必要がある。

続いて、ATR 活性化因子である TopBP1 と Rad9 のクロマチン結合を同様に ChIP-qPCR 法によりストレス有無条件下で調べた。その結果、Rad9 や TopBP1 も外的ストレスのない時に染色体脆弱部位や初期複製開始領域に結合していた。ATR の結果と合わせて、通常の細胞増殖時でも内因的な複製ストレスが生じていることが示唆される。一方、低濃度 HU 存在下においては、TopBP1 と Rad9 の染色体結合量が増加するという、従来のモデル通りの動きが明らかとなった。ATR と活性化因子の挙動が異なる点について、現在のモデルでは十分な説明ができず、今後の検討が必要である。

**(2) 染色体上の強固な DNA-タンパク質複合体は種々の DNA 損傷応答経路を活性化する。**

我々は、ヒトゲノムに挿入した *lacO* リポート配列に LacI タンパク質が結合することにより、そこに ATR がリクルートされることを発見した。これが、DNA-タンパク質複合体に衝突した複製フォークの異常停止を反映した応答であると予想し、検証を進めた。その結果、*lacO* において一本鎖 DNA が過剰に露出しており、ATR チェックポイント経路の他の因子である RPA、TopBP1、ATRIP、そして CDC6 等が集積していることが分かった。さらに、Fanconi 貧血経路因子の FANCD2 (ID 複合体)や FANCA (FA コア複合体)、DSB 修復経路の p-ATM (Ser1981)や 53BP1 も *lacO* へ集積しており、フォーク停止に対する幅広い損傷修復ネットワークの関与が明らかになった。*lacO* への集積が LacI 結合に依存することは、TopBP1 と FANCD2 の ChIP-qPCR により確かめた。

複製ストレス応答経路の異常は、がんをは

じめとする染色体不安定性を示す疾病の原因となる。例えば、高発がん性 Fanconi 貧血は、複製を阻害する DNA 鎖間架橋に反応する修復因子群の遺伝子異常が原因である。一方、*lacO*-LacI のような DNA-タンパク質複合体と複製フォークが衝突した時に、どのような損傷・反応が起きるのかは未だ明らかではない。本系を用いて、異常停止したフォークでのストレス応答機構を研究することは、がんや遺伝性疾患等の原因究明や治療法研究開発の強化につながると期待できる。

**(3) *lacO*-LacI 複合体が誘導する ATR 集積は、CDC6 に依存しない。**

まず、この系を利用して CDC6 の ATR 経路への関与について解析した。上記のように、CDC6 は、ATR 同様に LacI の結合した *lacO* 配列に集積し、CDC6 が複製ストレス反応に関与するという我々の仮説が支持された。ATR 集積の CDC6 依存性を明らかにするために、siRNA を用いて CDC6 の発現抑制を行った。しかし CDC6 の発現抑制は、*lacO* への ATR リクルートに影響を与えなかった。また、CDC6-LacI 融合タンパク質を作製し、CDC6 が *lacO* への ATR 集積を増強する可能性を検討したが、CDC6-LacI による ATR リクルートの有意な促進は見られなかった。したがって、本系では ATR のリクルートに CDC6 が直接関与する可能性は低いことが示された。ATR 以外のストレス応答因子の集積への影響については今後の検討が必要である。

**(4) *lacO* への LacI 結合によって、ATR 経路および Fanconi 貧血経路は S 期特異的に活性化されるが、ATM 経路は G1 期にも活性化される。**

実験系の改良のために我々は、改変型エストロゲン受容体 ER<sup>T2</sup> と LacI の融合タンパク質である ER<sup>T2</sup>-LacI を安定発現する株を樹立した。ER<sup>T2</sup>-LacI は通常細胞質に存在するが、タモキシフェンと結合すると核内に移行し、*lacO* 配列と強固に結合することで DNA 損傷応答を誘導する。これによって、より簡便かつ同調的に、ストレス反応を誘導することを可能にした。

タモキシフェンによる誘導と細胞周期の同調を組み合わせることにより、ATR や他のストレス応答因子の *lacO* への集積がどの細胞周期において起きるかを解析した。その結果、ATR チェックポイント経路と Fanconi 貧血経路の因子の集積は、G0/G1 期には起こらず、S 期特異的に起きることが明らかになった。この結果は、*lacO*-LacI 結合が複製フォークブロックとなり、複製ストレス反応を誘導しているという仮説を強く裏付けた。

一方、興味深いことに、DSB 応答経路の pATM と 53BP1 は、G1 期細胞でも S 期細胞でも同程度の集積を示し、これらの反応が DNA 複製に依存しないことが分かった。クロマチン構造変化が ATM 経路を活性化しうる

ことは過去に報告されているが(Bakkenist & Kastan, Nature, 421:499, 2003)、その分子機構および生理的意義は不明であった。今後、本実験モデル系を利用することで、その解明が進むものと期待できる。

#### (5) ATR 経路と Fanconi 貧血経路は相互依存的に働いている可能性がある。

上記(4)において、LacI 結合が誘導する DNA 損傷応答には、複製フォークの衝突が原因と考えられる S 期特異的な応答と、複製には依存せず G1 期にも誘導される応答の少なくとも 2 系統があることが示唆された。このうち S 期特異的であった ATR 経路と Fanconi 貧血経路の互いの依存性を明らかにするために、siRNA や ATR キナーゼ阻害剤を用いた検討を行った、その結果、ATR 経路と Fanconi 貧血経路は相互依存的に働く可能性が示唆された。今後、これら経路を誘導する初期シグナルの詳細を解明することが重要な課題になると考えている。

#### 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 6 件)

- (1) Higa, M., Fujita, M., and \*Yoshida, K. (2017) DNA Replication Origins and Fork Progression at Mammalian Telomeres, *Genes*, 8: 112 査読あり doi:10.3390/genes8040112.
- (2) Kayama, K., Watanabe, S., Takafuji, T., Tsuji, T., Hironaka, K., Matsumoto, M., Nakayama, K., Enari, M., Kohno, T., Shiraishi, K., Kiyono, T., Yoshida, K., Sugimoto, N., and Fujita, M. (2017) GRWD1 negatively regulates p53 via the RPL11-MDM2 pathway and promotes tumorigenesis, *EMBO Reports*, 18: 123-137 査読あり doi: 10.15252/embr.201642444
- (3) Higa, M., Kushiyama, T., Kurashige, S., Kohmon, D., Enokitani, K., Iwahori, S., Sugimoto, N., \*Yoshida, K., and Fujita, M. (2017) TRF2 recruits ORC through TRFH domain dimerization, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1864: 191-201 査読あり doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.11.004.
- (4) Aizawa, M., Sugimoto, N., Watanabe, S., Yoshida, K., and Fujita, M. (2016) Nucleosome assembly and disassembly activity of GRWD1, a novel Cdt1-binding protein that promotes pre-replication complex formation, *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell*

*Research*, 1863: 2739-2748 査読あり doi: 10.1016/j.bbamcr.2016.08.008.

- (5) Ohira, M., Iwasaki, Y., Tanaka, C., Kuroki, M., Matsuo, N., Kitamura, T., Yukuhiro, M., Morimoto, H., Pang, N., Liu, B., Kiyono, T., Amemiya, M., Tanaka, K., Yoshida, K., Sugimoto, N., Ohshima, T., and Fujita, M. (2015) A novel anti-microtubule agent with carbazole and benzohydrazide structures suppresses tumor cell growth in vivo, *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1850: 1676-1684 査読あり doi: 10.1016/j.bbagen.2015.04.013.
  - (6) Sugimoto, N., Maehara, K., Yoshida, K., Yasukouchi, S., Osano, S., Watanabe, S., Aizawa, M., Yugawa, T., Kiyono, T., Kurumizaka, H., Ohkawa, Y., and Fujita, M. (2015) Cdt1-binding protein GRWD1 is a novel histone-binding protein that facilitates MCM loading through its influence on chromatin architecture, *Nucleic Acids Research*, 43: 5898-5911 査読あり doi: 10.1093/nar/gkv509.
- [学会発表](計 20 件) 主要なものを示す。
- (1) 吉田 和真, 比嘉 允宣, 杉本 のぞみ, 藤田 雅俊. TRF2 は二量体 TRFH ドメインを介して ORC をリクルートする. 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016.12.1. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
  - (2) Higa, M., Yoshida, K., Kohmon, D., Sugimoto, N., and Fujita, M. TRF2 recruits ORC through TRFH domain dimerization. The 10th 3R International Symposium, 2016.11.15. ホテル一畑 (島根県松江市)
  - (3) 比嘉 允宣, 向門 大介, 倉重 誠一郎, 榎谷 光熙, 杉本 のぞみ, 吉田 和真, 藤田 雅俊. TRF2 は二量体化した TRFH ドメインを介して ORC をリクルートする. 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015.12.3. 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
  - (4) 倉重 誠一郎, 吉田 和真, 杉本 のぞみ, 藤田 雅俊. 複製ストレス時における ATR 及び関連因子のクロマチン結合動態の解析. 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015.12.1. 神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)
  - (5) 吉田 和真, 比嘉 允宣, 倉重 誠一郎, 向門 大介, 榎谷 光熙, 杉本 のぞみ, 藤田 雅俊. TRF2 は TRFH ドメインの二量体化を介して ORC をリクルートする. 第 23 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ, 2015.10.21. 焼津グランド

ホテル (静岡県焼津市)

- (6) Higa, M., **Yoshida, K.**, Kohmon, D., Sugimoto, N., and Fujita, M. TRF2 recruits ORC through the dimerized TRFH domain. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on “Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance”, 2015.9.2. New York (アメリカ)

〔その他〕ホームページ:

<http://tansaku.phar.kyushu-u.ac.jp/saito/top.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

吉田 和真 (YOSHIDA, Kazumasa)

九州大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：80715392