

令和元年6月18日現在

機関番号：82606

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12602

研究課題名(和文) In vitro DNA複製系を利用したDNA複製応答性ATR機能解析

研究課題名(英文) ATR functional analysis using in vitro DNA replication system

研究代表者

塩谷 文章 (Shiotani, Bunsyo)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・主任研究員

研究者番号：10627665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、DNA複製に不可欠なATRキナーゼの役割の解明を目的とし、ヒト正常上皮細胞のDNA複製、およびがん遺伝子誘発性のDNA複製ストレスに応答するリン酸化因子を解析したところ約200種類のリン酸化因子に顕著なATR阻害剤感受性を認めた。これらの因子のpathway解析より従来のDNA損傷応答に加えて細胞骨格制御に関わるRhoA経路、さらにはクロマチンリモデリング因子制御の可能性が示唆された。これらのことから内因性DNA複製ストレス応答におけるATRは外的要因によるDNA損傷応答時とは異なる基質群をリン酸化することにより染色体を安定に維持し正常細胞の生存を維持することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、内因性DNA複製およびDNA複製ストレスに応答するATR基質群が同定されたことにより、外因性DNA損傷応答時とは異なる機構により染色体を安定に維持し正常細胞の生存を維持する機能が示唆された。このことはDNA複製にともなう複製エラー(突然変異)によるゲノム不安定性誘発・発がん過程におけるATRの機能解明が進み、これを応用しATR阻害療法が新たながん治療として開発が進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the role of ATR kinase that is essential for DNA replication. Analysis of phosphorylation factors in response to DNA replication in human normal epithelial cells and oncogene-induced DNA replication stress revealed remarkable ATR inhibitor sensitivity in approximately 200 types of phosphorylation factors. The pathway analysis of these factors suggested the possibility of RhoA pathway involved in cytoskeleton regulation as well as chromatin remodeling factor regulation in addition to conventional DNA damage response. These results suggest that ATR in the endogenous DNA replication stress response stably maintains the chromosome and maintains the survival of normal cells by phosphorylating different substrate groups from the DNA damage response caused by external factors.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：DNA複製 DNA複製ストレス ATR

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

正確な DNA 複製・遺伝及びゲノム安定性の維持は真核生物における最も重要な生命現象の一つである。DNA 複製のエラーは時間とともに増幅・蓄積し、ゲノム不安定性の要因となりがんや老化を誘発する。DNA 損傷応答を最上流で制御する Ataxia telangiectasia and Rad3 related (ATR) は HU や UV などの外的 DNA 複製ストレスによって生ずる一本鎖 DNA (ssDNA) の露出によって活性化し、細胞周期を停止させ、新たな origin firing を阻害・複製フォークを安定化する事により細胞の生存を維持する。マウスにおいて ATR 欠損は胎生致死であること (Genes & Dev; 2000, 14:397) や ATR 選択的阻害剤は急激な ssDNA 露出を誘発し replication catastrophe による細胞死を誘導することから (Cell; 2013, 155: 1088, Mol Cell; 2015, 59: 1011) ATR は外的損傷のない状況下においても DNA 複製に必須であると考えられている (Fig. 1)。また酵母における解析から、ATR (Mec1) 基質の DNA 複製に関わる機能が示唆された (Mol Cell; 2015, 57: 1124)。しかし、DNA 複製の開始・進行・完結に関わる具体的な ATR の機能はほとんど説明されていない。

Simian Virus 40 (SV40) はサルやヒトに感染することで知られ、環状二本鎖 DNA 型ウイルスであり、古くから動物細胞 DNA 複製機構のモデル系として繁用されている (Ann rev of biochem; 1998, 67, 721)。興味深いことに、感染細胞における SV40 ゲノム複製に対して ATR 阻害剤は抑制的に働くことから、ATR の SV40 ゲノム DNA 複製進行における必須な機能が示唆されている。そこで本研究では、合成 DNA とヒト細胞核抽出液を用いた ATR 活性化機構を明らかにしてきた申請者の経験から (Mol. Cell; 2009, 33: 547, Mol. Cell; 2011, 43: 192, Cell Reports; 2013, 3: 1651, Methods in Mol. Biol.; 2011, 782: 181)、DNA 複製過程における新規 ATR 機能解析ため in vitro SV40 ゲノム複製を DNA 複製モデルとして利用するシステムを着想するにいたった (Fig. 1)。

2. 研究の目的

In vitro SV40 ゲノム DNA 複製系を利用し、外的 DNA 損傷非存在下における DNA 複製進行に伴って ATR が活性化するかどうかを明らかにする。また DNA 複製の開始・進行・完結における ATR の関与について、リン酸化基質を同定し解析することにより明らかにすることを目的とする。ATR 直接的基質の動的には AS-ATR (ATP-analog による基質のラベルを可能にした ATR 変異体)を開発し、これを利用することにより SV40 ゲノム DNA 複製過程における ATR 直接的基質を網羅的に同定、機能を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ATP アナログに感受性の AS-ATR を作成する。

生物種間でよく保存されている ATR の ATP 結合領域における Gatekeeper (Y2365) H-bond (I2377) Salt-bridge (V2493) アミノ酸残基に変異を導入、さらにそれぞれの組み合わせを用いて AS-ATR の候補を数種類作成する。

次に AS-ATR の候補を用いて ATR の特異的基質として知られる RPA32(Ser33)を基質に用いて in vitro キナーゼアッセイを行い、WT-ATR と同等の活性を示す AS-ATR を選定する。さらに N6 位を改変した ATP アナログ存在下でキナーゼ活性を示す AS-ATR を決定する。

(2) SV40 genome DNA in vitro 複製系を構築する。

In vitro SV40 genome DNA 複製系構築のため、293 細胞抽出液および複製開始に必須な SV40 Large T 抗原を精製する。鋳型 SV40 DNA は複製開始点含有 origin(+)DNA および複製開始非含有 origin(-)DNA 調整する。

1)で調整した材料を用い in vitro DNA 複製反応の最適化を行う。具体的に反応に用いる細胞抽出液量及び SV40DNA 量、ATP 濃度、反応時間等を決定する。

(3) ATR 制御性リン酸化基質を in vivo DNA 複製ストレス系を用いて解析する。

ヒト正常肺上皮細胞 (SAEC) における外的・内的ストレス非存在下におけるリン酸化プロテオーム解析をおこなう。ATR 機能阻害には ATR 阻害剤を利用する。

変異型 ER-K-ras^{G12V}(4OHT により誘導: DNA 複製ストレス誘発)を導入し K-ras^{G12V} 誘発性 DNA 複製ストレス抵抗性に関連する ATR リン酸化基質(in vivo)を同定する。これらの細胞群から細胞抽出液を調整し、TMT(Tandem Mass Tag)法を用いてリン酸化基質の LC-MS/MS により網羅的比較定量を行う。

同定された基質の Gene Ontology・パスウェイ解析を行い ATR による DNA 複製、複製ストレス制御機構について検討する。

4. 研究成果

(1) 本研究では ATR 特異的リン酸化基質の網羅的な解析を行うため、自然界には存在しない ATP アナログを利用できるように ATR のキナーゼドメイン中の ATP-binding pocket を改変した。ATR のファミリーキナーゼである ATM における Y2365A 改変によって AS-ATM 作成に成功したとの報告を参考に ATR において Y2365A を導入したところ、予想に反してキナーゼ活性が完全に失われた。そこで Y2365A に加えて ATP 結合部位に

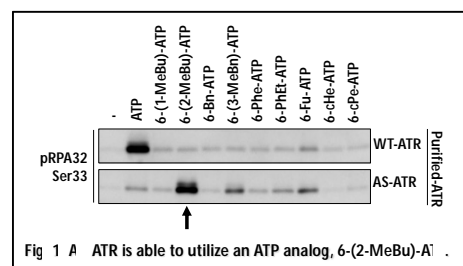


Fig 1 A ATR is able to utilize an ATP analog, 6-(2-MeBu)-Aⁱ.

変異を様々に導入しキナーゼ活性を維持する AS-ATR 候補を約 60 種類作成し、これらの中から 6-(2-Mebu)-ATP 存在下で活性を示す Analog sensitive ATR (AS-ATR)を同定した(Fig. 1)。また ATR 候補基質に対して、AS-ATR を用いて in vitro kinase assay を行い、Phos-tag gel (リン酸化タンパク質は泳動が遅れる)を用いて分離することにより ATR 特異性を決定するシステムの構築に成功した(Fig. 2)。

- (2) SV40 genome DNA in vitro 複製系の構築に関しては、SV40 ウイルス T 抗原による DNA 複製にともなう P32TTP の取り込みが観察され、DNA の複製進行を in vitro で再現することに成功した(Fig. 3)。しかし in vitro 複製効率が低いために抽出液中におけるリン酸化動態の変化を観察することができなかった。また基質検出に必要な利用可能な SV40 ウイルス T 抗原量に限りがあること、および細胞抽出液中における基質回収率が低いことから質量分析に十分なサンプルを得られなかった。
- (3) そこで本研究では当初の予定を変更し細胞内におけるリン酸化基質を同定することとした。外的刺激非存在下における正常細胞の DNA 複製に関連したリン酸化基質を同定するため、対数増殖期にある正常肺上皮細胞 (SAEC) を用いた。またがん遺伝子誘発性の内因性 DNA 複製ストレス応答を解析するため、変異型 K-Ras を正常肺上皮細胞に導入し形質転換を誘導する肺腺がんモデルを構築した。これらの細胞において ATR 高発現細胞および ATR 阻害剤を用いることによって ATR 依存性のリン酸化イベントを抽出した(Fig. 4)。これらのサンプルに対して TMT 法を用いて比較定量を行ったところ、全 6800 種類のリン酸サイトを 3500 種類のタンパク質に同定した。このうち ATR の認識配列とされる SQ/TQ サイトを 155 同定した。これらのリン酸化サイトのうち ATR 阻害剤存在下による変動を算出、主成分解析および IPA 解析を行ったところ、予想された DNA 損傷応答 (Role of BRCA1 in DNA damage response, NER pathway, Cell cycle G1/S checkpoint regulation, Cell cycle G2/M checkpoint regulation) に関連する pathway に加えて RhoA シグナリング pathway が検出された。これらの結果は ATR シグナル経路の一つとして細胞骨格制御に関わることを示す

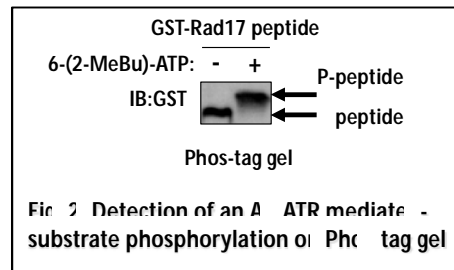


Fig. 2 Detection of an ATR mediated substrate phosphorylation on Phos-tag gel

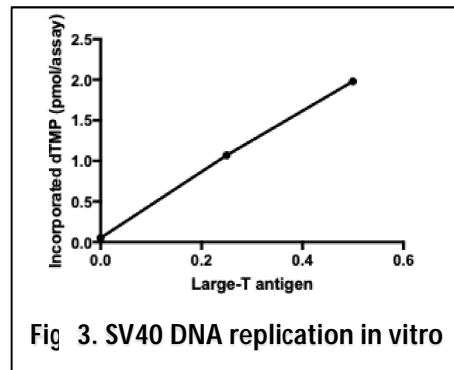


Fig. 3. SV40 DNA replication in vitro

	sample ID	ATR inhibitor	K-Ras
CSII	#1	-	-
	#2	+	-
	#3	-	+
	#4	+	+
ATR-18	#5	-	-
	#6	+	-
	#7	-	+
	#8	+	+

Fig. 4. Phosph proteomics samples

Rank	Ingenuity Canonical Pathways	-log (p-value)	Ratio
1	Role of BRCA1 in DNA Damage Response	5.55	0.138
2	NER Pathway	4.48	0.107
3	Cell Cycle: G1/S Checkpoint Regulation	3.75	0.119
4	RhoA Signaling	3.16	0.0813
5	Cell Cycle: G2/M DNA Damage Checkpoint Regulation	3	0.122
6	ATM Signaling	2.67	0.0825
7	Role of CHK Proteins in Cell Cycle Checkpoint Control	2.65	0.105
8	Cyclins and Cell Cycle Regulation	2.51	0.0864
9	Mitotic Roles of Polo-Like Kinase	2.33	0.0909
10	Superpathway of Inositol Phosphate Compounds	2.31	0.0542

Fig. 5. Top 10 pathways regulated by ATR in response to ra G12V

ものであり、癌遺伝子発現に応答する新たな ATR 機能の可能性を示唆している。しかし抽出されたリン酸化部位のほとんどは SQ/TQ ではなく SP/TP サイトであり ATR によって直接制御を受けるというよりはむしろ二次的な影響が観察された可能性も考えられた。しかし、ATR の自己リン酸化 pT1989 が TP サイトであることから、上記 SP/TP サイトの中には ATR によって直接制御を受ける基質の存在も考えられ、(1) で構築した ATR 直接的基質同定法を用いて検証を進めている。次に ATR 阻害剤感受性に注目した場合には全てのサンプルセットにおいて HistonH1 のリン酸化が顕著に減少していた。Linker histone である histonH1 のリン酸化部位は CDK1 や CDK2 の認識配列であると報告があるため、ATR による直接的な制御とは考えにくい。また一般に DNA 損傷に反応して ATR-Chk1-cdc25 経路によって活性が抑制されると報告のある CDK1/2 の基質である HistonH1 のリン酸化が ATR 阻害剤存在下で減少することは既知の知見と相反するが、ATR 経路と CDK 経路のクロストークによってクロマチンリモデリングを制御し DNA 複製ストレスに応答する可能性が示されたことは興味深い。HistonH1 のリン酸化はクロマチンの折りたたみの解除 (chromatin decompaction) に関わることから ATR 活性は正常細胞の増殖に伴う DNA 複製時に HistonH1 のリン酸化を介してクロマチンリモデリングを制御し複製フォークの

進行を促進する可能性が示唆される。またこれまで報告のある外的 DNA 損傷応答で認められる ATR 基質のリン酸化は内因性 DNA 複製ストレスに焦点を当てた本研究のサンプルセットからは顕著には認められなかった。これらのことから内因性 DNA 複製ストレス応答における ATR は外的要因による DNA 損傷応答時とは異なる基質群をリン酸化することにより染色体を安定に維持しがん細胞の生存を維持することが示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Yasuhara T, Kato R, Hagiwara Y, **Shiotani B**, Yamauchi M, Nakada S, Shibata A, Miyagawa K. Human Rad52 Promotes XPG-Mediated R-loop Processing to Initiate Transcription-Associated Homologous Recombination Repair. *Cell*;175 :558-570. 2018 doi: 10.1016/j.cell.2018.08.056.

Asano N, Yoshida A, Mitani S, Kobayashi E, **Shiotani B**, Komiyama M, Fujimoto H, Chuman H, Morioka H, Matsumoto M, Nakamura M, Kubo T, Kato M, Kohno T, Kawai A, Kondo T, Ichikawa H. Frequent amplification of receptor tyrosine kinase genes in well-differentiated/ dedifferentiated liposarcoma.

Oncotarget. 8 : 12941-12952 doi: 10.18632/oncotarget.14652; 2017

[学会発表](計 15 件)

Bunsho Shiotani, がん遺伝子誘導性 DNA 複製ストレスに対する ATR 応答機構. 第 41 回 日本分子生物学会年会、11 月・2018 年、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

倉島公憲、柏木秀人、河野隆志、**塩谷文章**、Intrinsic DNA Replication Stress Provides an Indication of Sensitivity to ATR inhibitor in Lung Adenocarcinoma Cell、第 41 回 日本分子生物学会年会、11 月・2018 年、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

Kiminori Kurasima, Takashi Kohno, and **Bunsho Shiotani**, Intrinsic DNA Replication Stress Confers Sensitivity to ATR Inhibitor in Lung Adenocarcinoma Cell 第 77 回 日本癌学会学術総会、9 月・2017 年、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

Bunsho Shiotani, Intrinsic DNA Replication Stress Confers Sensitivity to ATR Inhibitor in Lung Adenocarcinoma Cell. Gordon Research Conference、7 月・2018 年、香港(中国)

塩谷文章, 内在性 DNA 複製ストレスを標的とした肺線がん細胞における ATR 阻害療法、日本放射線腫瘍学会、7 月・2018 年、国立がん研究センター中央病院 (東京都・中央区)

塩谷文章, DNA replication stress response regulated by ATR in cancer cells DNA 損傷ワークショップ、4 月・2018 年、ホテル金沢 兼六荘 (石川県・金沢市)

塩谷文章, マリアンヌ マズヴェ、林田直也、Elucidation of the mechanism underlying development and maintenance of tumor by ATR-dependent DNA replication stress response, Conbio2017、12 月・2016 年、神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

Marianne Mazevet, Naoya Hayashida, **Bunsho Shiotani**, ATR overexpression promotes K-Ras induced tumorigenesis through replication fork protection, Conbio2017、12 月・2016 年、神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

林田 直也、マズヴェ マリアンヌ、**塩谷文章**, Elucidation of the mechanism underlying lung adenocarcinoma cell death induced by ATR inhibitor. 第 76 回 日本癌学会学術総会、9 月・2017 年、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

塩谷文章, Oncogenic DNA replication stress response regulated by ATR. DNA 損傷ワークショップ 浜名湖ミーティング、4 月・2017 年、ジ・オーシャン (静岡県・浜松市)

Bunsho Shiotani, Development of a direct ATR substrates identification system utilizing ATP analog. Gordon Research Conference、7 月・2016、香港(中国)

塩谷文章, Dark side of ATR. DNA 損傷ワークショップ 浜名湖ミーティング、4 月・2016 年、ジ・オーシャン (静岡県・浜松市)

Bunsho Shiotani, Identification of ATR substrates utilizing analog ATP sensitive-ATR. 第 75 回 日本癌学会学術総会、10 月・2016 年、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

Bunsho Shiotani, Establishment of direct substrates identifying system by analog sensitive-ATR kinase. 第 39 回 日本分子生物学会年会、12 月・2016 年、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

Bunsho Shiotani, Sensing and signaling of DNA damage by master checkpoint kinase ATM and ATR, Tenth AACR-JCA Joint conference、2 月・2016 年、Hawai・USA

[図書](計 1 件)

***Shiotani B** and *Zou L. Signaling of DNA Replication Stress through the ATR Checkpoint. In Hanaoka F. and Sugawara K. (ed.) *DNA Replication, Recombination and Repair - Molecular Mechanisms and Pathology*, Springer, 405-428, https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-4-431-55873-6_16 (2016)

[その他]

ホームページ等

<https://www.ncc.go.jp/jp/ri/division/genetics/member/20151209151751.html>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。