

平成 31 年 5 月 4 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18428

研究課題名(和文) ミスマッチ修復依存のアポトーシスを誘導するクロマチン動態の解析

研究課題名(英文) Analysis of the induction of apoptosis by DNA mismatch

研究代表者

武石 幸容 (TAKEISHI, YUKIMASA)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号：00758055

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)：SMARCAD1欠損株(SMARCAD1)を樹立し解析したところ、野生株と比べ、SMARCAD1はMNUに対する感受性、サブG1の出現頻度、Caspase-9の活性化の全てが抑制された。SMARCAD1の突然変異頻度は野生株と比べて上昇しており、免疫沈降法解析によりSMARCAD1はMNU処理後のMutS複合体とMutL複合体の結合効率が減少した。ATP分解能を欠失させた変異型はこれらアポトーシス誘導の回復が認められなかった。よってMMR依存のアポトーシス誘導にはSMARCAD1のクロマチンリモデリング活性が重要であ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

本研究によりMMR依存のアポトーシス誘導にはSMARCAD1のクロマチンリモデリング活性が重要であることが示唆された。遺伝性非ポリポシス大腸がん(HNPCC:Hereditary nonpolyposis colorectal cancer)の発症原因はMMR遺伝子の変異によるものであることがよく知られている。そのためこの癌に対する抗がん剤の新たな分子基盤を提供することができた。またMMR依存のアポトーシス誘導にクロマチン動態が関わることを示されたことにより新たな研究領域を広げる学術的意義があったと考える。

研究成果の概要(英文)：We provide the evidence showing that SMARCAD1, which has an ATP-dependent nucleosome remodeling activity, is a novel factor associated with the induction of MMR-dependent apoptosis. SMARCAD1 knockout cells (SMARCAD1), as compared with control, were resistant to MNU, and the appearances of a sub-G1 population as well as caspase-9 activation were suppressed. Moreover, the MNU-induced mutant frequencies were increased in SMARCAD1. In immunoprecipitation analysis, the formation of MMR complex in SMARCAD1 was decreased as compared with control, and this effect was strongly dependent on the ATPase activity of SMARCAD1. Thus, we proposed the role of SMARCAD1 in the induction of apoptosis through the chromatin remodeling activity.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミスマッチ修復 アポトーシス クロマチン動態 DNA複製 癌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

DNA を構成する 4 種類の塩基は対合相手が決まっており、この相補性が生物にとって必須である遺伝情報を保存させる。一本鎖/二本鎖 DNA の切断損傷に比べ、塩基のアルキル化修飾は非常に小さな損傷である。しかし DNA 複製の誤対合を引き起こして突然変異を誘発し、細胞のガン化や老化の原因となる。DNA 修復の 1 つであるミスマッチ修復(MMR)は、鋳型鎖と新生鎖を判別し、DNA 複製のエラーによって誤対合した新生鎖側の塩基を除去する(1)。それに対して損傷塩基である O<sup>6</sup>-メチルグアニン(O<sup>6</sup>-mG)による誤対合は MMR 因子が認識し、その後アポトーシスを誘導する。日本において死因の多くを占めているガンの一つ、遺伝性非ポリポーシス大腸がん(HNPCC:Hereditary nonpolyposis colorectal cancer)の発症原因は MMR 遺伝子の変異によるものであり、この分子機構の解明がガン抑制の研究に対する意義が大きい。MMR 研究は誤対合を校正する「修復」の理解が進む一方、「アポトーシス」の研究は進んでいない。

### 2. 研究の目的

近年、MMR にクロマチンリモデリング因子が関与することや MutS 複合体がクロマチンリモデリング活性をもつことが示された。一方、我々はクロマチンリモデリング因子 SMARCAD1 のノックダウンによって O<sup>6</sup>-mG に誘導されるアポトーシスが抑制され、アルキル化剤に耐性となることを見出した。

SMARCAD1 をはじめとしたクロマチンリモデリング因子は、ヒストンの脱アセチル化、メチル化に関わる因子との相互作用によりクロマチン動態を制御する。なかでも SMARCAD1 は DNA 二本鎖切断箇所のユークロマチン化とヘテロクロマチン化の両現象に関与する。損傷箇所のクロマチン動態の切替は他因子とのアクセシビリティを変化させるため損傷の応答に重要となると予想される。さらに SMARCAD1 は MMR 因子 MutS 複合体のサブユニット MSH2 や DNA 複製に必須な因子である PCNA と結合することが報告されている。

SMARCAD1 のノックダウン条件下において O<sup>6</sup>-mG によるアポトーシス誘導が抑制されたという我々が得た結果と上記の報告を鑑みて、SMARCAD1 が DNA 複製と共役し、O<sup>6</sup>-mG 損傷部位にアポトーシス誘導を促進するクロマチン動態を構築しているという着想に至った。MMR 過程でのクロマチン動態の変化は未だ研究されておらず、他のクロマチンリモデリング因子でも同様にアポトーシスを誘導する可能性も考えられる。本申請は O<sup>6</sup>-mG が誤対合を形成する 1 回目の DNA 複製とアポトーシスが誘導される 2 回目の DNA 複製におけるクロマチン動態の変化と SMARCAD1 をはじめとしたクロマチンリモデリング因子がどう関与するか明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

解析には O<sup>6</sup>-mG の修復酵素 MGMT (O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase) が欠損した細胞 HeLa MR を用いた。この株に CRISPR/Cas9 システムを用いて SMARCAD1 ノックアウト細胞 (ΔSMARCAD1) を構築した。HeLa MR と ΔSMARCAD1 を比較することで MMR に依存するアポトーシス誘導における SMARCAD1 の機能を評価した。ΔSMARCAD1 に野生型 SMARCAD1、並びに ATPase 活性を不活化した変異型 SMARCAD1 をそれぞれ発現した細胞 (WT、K528R) を構築し、同様の解析で評価した。

### 4. 研究成果

MMR に依存したアポトーシス誘導における ΔSMARCAD1 の表現型

HeLa MR と ΔSMARCAD1 を用いて a) MNU に対する感受性、b) アポトーシスマーカー、c) 突然変異率、d) DNA 損傷マーカーの検証を行った。

a) siRNA による SMARCAD1 のノックダウン細胞と同様に ΔSMARCAD1 は HeLa MR と比べて抵抗性を示した。これにより MNU によってできる O<sup>6</sup>-mG という損傷に対して SMARCAD1 が関与する可能性を示唆できた。

b) アポトーシスマーカーとしてサブ G1 の量、カスパーゼ活性を指標にした。どちらの結果も HeLa MR に比べ、ΔSMARCAD1 はアポトーシスが抑制することが確認された。これより SMARCAD1 がアポトーシス誘導を促進すると予想した。

c) MNU 処理後における突然変異率を測定した。SMARCAD1 が MMR に無関係なら HeLa MR と ΔSMARCAD1 は同じ突然変異率を示す。しかし ΔSMARCAD1 の突然変異率は HeLa MR と比べ有意に上昇していた。この結果より SMARCAD1 は、アポトーシスへ誘導することで O<sup>6</sup>-mG による変異を抑制していると予想される。

d) DNA 損傷マーカーとして ATR、ATM のリン酸化を指標にした。HeLa MR は O<sup>6</sup>-mG が認識され、MMR 複合体が活性化、その後 2 回の DNA 複製中に ATR、ATM のリン酸化がなされアポトーシスが誘導される。しかし ΔSMARCAD1 は HeLa MR と比べ、各リン酸化量は減少していた。この結果は O<sup>6</sup>-mG の認識、もしくは MMR 複合体活性化に SMARCAD1 が働くことを示唆する。

MMR に依存したアポトーシス誘導過程の SMARCAD1 の分子機序

SMARCAD1 は MutS 複合体のサブユニットである MSH2、DNA 複製の必須因子 PCNA にそ

れぞれ結合することが報告されている (Okazaki N et al., *J Mol Biol*, 382, 257-265, 2008 ; Rowbotham SP et al., *Mol Cell*, 42, 285-296, 2011)。実際、これら相互作用は確認できた。MMR 複合体と SMARCAD1 の関係を明らかにするため、MMR 複合体の形成効率を HeLa MR と  $\Delta$ SMARCAD1 間で比較した。その結果、 $\Delta$ SMARCAD1 では MNU 処理後 MMR 複合体の形成効率が有意に減少することがわかった (図 1)。この結果は SMARCAD1 が MMR 複合体形成において機能していることを示す。

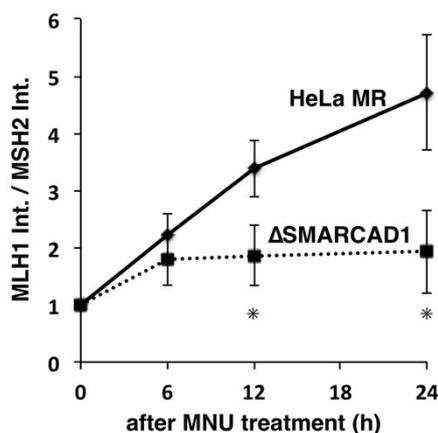
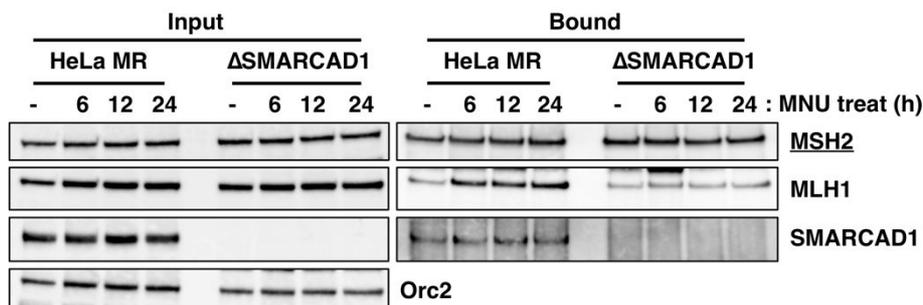


図 1 SMARCAD1 による MMR 複合体の形成促進

#### MMR に依存したアポトーシス誘導と SMARCAD1 のクロマチンリモデリング活性

SMARCAD1 には、ATP 依存性のクロマチンリモデリング活性をもつ。そこでこの活性と MMR 複合体の形成効率の検証を行った。新たに  $\Delta$ SMARCAD1 に野生型 SMARCAD1、並びに ATPase 活性を不活化した変異型 SMARCAD1 を各々発現させた細胞 (WT、K528R) を構築し、これら細胞に MNU に対する感受性、MMR 複合体の形成効率を検証した。その結果、WT は HeLa MR とほぼ同様の感受性、形成効率を示した。しかし K528R は  $\Delta$ SMARCAD1 と同様に変化が見られなかった。この結果は、SMARCAD1 のクロマチンリモデリング活性と MMR 依存のアポトーシス誘導に強い相関関係があることを示す。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 6 件)

武石幸容、藤兼亮輔、関口睦夫、日高真純、アポトーシス誘導過程に起こるクロマチン構造変化の解析、第 23 回 日本歯科医学会 総会、2016 年

武石幸容、藤兼亮輔、関口睦夫、高橋達郎、日高真純、ミスマッチ修復依存のアポトーシス誘導に関わるクロマチンリモデラーの機能、第 39 回 日本分子生物学会 年会、2016 年

武石 幸容、藤兼 亮輔、関口 睦夫、日高 真純、Chromatin remodeler SMARCAD1 facilitates the induction of apoptosis triggered by DNA mismatch, 第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年

武石 幸容、藤兼 亮輔、力武美保子、高橋 達郎、関口 睦夫、日高 真純、Role of chromatin remodeling factor in the induction of mismatch repair-dependent apoptosis, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年

Yukimasa Takeishi, Ryosuke Fujikane, Mutsuo Sekiguchi, Masumi Hidaka, Function of chromatin remodeler SMARCAD1 in the induction of apoptosis triggered by DNA mismatch, 第 77 回日本癌学会学術総会, 2018 年

Yukimasa Takeishi, Ryosuke Fujikane, Mihoko Rikitake, Yuko Obayashi, Tatsuro Takahashi, Mutsuo Sekiguchi, Masumi Hidaka The roles of chromatin remodeler SMARCAD1 in the induction of apoptosis triggered by alkylated DNA damage, 第 41 回日本分子生物学会年会, 2018 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
特になし

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者  
なし

(2)研究協力者  
なし

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。