

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K11642

研究課題名(和文)複製ストレスにおけるATR-ATRIPキナーゼの新規活性化機構

研究課題名(英文) Novel activation mechanism of ATR-ATRIP kinase upon DNA replication stress

研究代表者

石合 正道 (Ishiai, Masamichi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・施設長

研究者番号：90298844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：放射線等により生じるゲノム損傷は生体にとり有害であるため、生体にはその防御機構としてDNA損傷応答(DDR)が存在する。その中心分子はATMとATRキナーゼであるが、本研究ではATRに注目した。ATRはATRIPと複合体を形成し、DNA複製ストレスで活性化され、少なくとも2つの活性化機構が存在する。研究代表者は新たなATR-ATRIPの活性化機構の存在を想定し、2つの異なるDNA損傷薬剤によるATRIPとRPA2の核内フォーカス形成を指標にsiRNAスクリーニングを行い、29個の候補分子を得た。すでに詳細な解析が行われたものを除外し、有望な候補分子についてさらに検討を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA損傷応答は細胞の生存に必須であり、その破綻はがん等の疾患の原因となることが知られている。本研究は、その中でも特に重要なATRに注目し、既存の2つの活性化経路に加えて未知の活性化経路が存在する可能性を検討するものである。従って、本研究課題は、発がん等の疾患の基礎研究としての側面や、これらを標的とした新たな治療薬・新薬の開発につながる基礎的知見を提供する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The DNA damage response is critical for cells to prevent from genotoxic stress such as DNA damage. ATR kinase is one of the central players in this system. ATR makes a complex with ATRIP, activated under DNA replication stress by two independent mechanisms. To identify novel ATR-ATRIP activation pathway, we undertook siRNA screening against mitomycin C and hydroxy urea treated ATRIP-GFP expressing cells by evaluating both ATRIP and RPA2 foci formation efficiency. We obtained 29 candidate genes. We further evaluate these candidates.

研究分野：放射線生物学

キーワード：DNA損傷応答 DNA修復 フォーカス形成 ATRIP ATR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

放射線等により生じるゲノム DNA 損傷は生物にとり有害なため、生体にはその防御機構として DNA 損傷応答 (DDR) が存在する。その中心分子は ATM と ATR キナーゼであるが本研究では ATR に注目した。

DNA 損傷により DDR や DNA 修復因子が DNA 損傷部位に集積し、細胞核内にドット状に観察されることが知られている。これを核内フォーカスと呼ぶ。一般に ATM は放射線照射等により生じる DNA 二本鎖切断 (DSB) により活性化される。一方、ATR は ATRIP と複合体を形成し、DNA 複製フォークの不安定化 (DNA 複製ストレスと呼ぶ) で活性化される。

複製フォークにより生じた一本鎖切断 (SSB) にはまず RPA 複合体が結合する、ATRIP は RPA と相互作用するが、ATR-ATRIP の活性化はこれだけでは十分ではない。我々のこれまでの研究から、ATR-ATRIP の活性化には少なくとも 2 つの経路に依存することが知られている。

1 つは ATRIP-TOPBP1 の相互作用を介した ATR の活性化であり、もう一つは我々が以前見出したファンコニ貧血 (FA) コア複合体に依存した ATR-ATRIP の活性化である。この 2 つの経路は独立であることは確認されていたがそのメカニズムの詳細は不明である (文献 1 - 3 他)。

2. 研究の目的

研究代表者は、ATR-ATRIP の活性化機構が上の 2 つ以外にも存在するのではないかと考え、ATRIP と RPA2 のフォーカス形成を指標に siRNA スクリーニングを行い、核内フォーカス形成に影響を与える候補分子を探索し、検討した。

3. 研究の方法

ATRIP-GFP を安定に発現するヒト肺がん株 A549 細胞を用い、DNA 複製ストレス下での ATR-ATRIP の活性化の検出系を構築した。具体的には、細胞に複製ストレスを与える薬剤処理を行い、ATR-ATRIP の活性化を ATRIP-GFP フォーカスの形成として、複製ストレスにより生じる一本鎖 (ss) DNA の生成を ssDNA に結合して生じる RPA2 フォーカスの形成として検出する系である。この系を用い、siRNA を形質導入し、ATRIP-GFP と RPA2 のそれぞれのフォーカス形成に影響する候補分子を探索した。京都大学放射線生物研究センターの構築した siRNA ライブラリーを使用し、471 個の遺伝子を探索した。細胞固定後、抗 RPA2 抗体と Alexa594 を用いた免疫染色を行い、ATRIP-GFP (緑) と RPA2/Alexa594 (赤) の蛍光強度が 1/4 以下に減少したものを有意とした。有意な候補分子についてさらに検討した。

4. 研究成果

ATRIP-GFP 発現細胞を用いた siRNA ライブラリースクリーニングについては、まずマイトマイシン C (MMC) 24 時間処理の条件で探索を行った (1 次スクリーニング)。候補分子が 77 個と比較的多数であったことと、その原因として MMC24 時間処理では薬剤処理の時間が比較的長時間のため、RPA の活性化が複数の段階で起こっていた可能性が考えられた。このため、ヒドロキシウレア (HU) 2 時間処理という別の薬剤処理で生じる複製ストレス処理下で再検討を行い結果として 29 個の候補分子を得た (2 次スクリーニング)。なお、スクリーニングで RPA 複合体の構成遺伝子 (RPA1, 2) も単離されたが、これらは 29 個の中には含めていない。しかし、RPA1, 2 が単離されたことはこのスクリーニング系が機能していることを示唆していると考えた。

候補分子の中で遺伝子ノックアウトやノックダウン細胞を構築し詳細な解析が報告されているもの、あるいは未発表だが研究代表者の所属した研究室等ですでに検討した分子は以降の解析から除外した。これらの中には、RPA を制御することを我々が報告した FANCW/RFW3 (文献 4) が属し、ATR-ATRIP の活性化に寄与する FA 経路分子が複数含まれる (FANCA, FANCD1/BRCA2, FANCW)。

残りの分子については、順次発現プラスミドを構築し、発現細胞での検討を行っている。目的の候補分子は、ATRIP, ATR, RPA の挙動とよく一致することが期待されるが、予測する表現型を示す候補分子に行きついておらず、さらに検討を重ねている。

研究の途中で、カナダの Durocher の研究室から、ヒト不死化正常網膜上皮細胞株 RPE1 細胞を用いて、27 種の DNA 損傷薬剤に対する 31 の Crisper-Cas9 スクリーニングを網羅的に行った研究が報告された (文献 5)。実験に使用した細胞、薬剤の濃度や処理時間等は実験条件は異なるものの、本研究で使用した薬剤である MMC や HU の結果も含まれている。このため、研究代表者が候補分子としている 29 個について、彼らの解析結果を検討したが ATRIP, ATR, RPA と表現型が一致する分子は見いだせなかった。従って、現在までに我々が得ている結果は上の論文データと矛盾しておらず、結果が妥当であることを示唆するものと思われる。

< 引用文献 >

1. Shigechi T, Tomida J, Sato K, Kobayashi M, Eykelenboom JK, Pessina F, Zhang Y,

- Uchia E, Ishiai M, Lowndes NF, Yamamoto K, Kurumizaka H, Maehara Y. and Takata T. (2012) ATR-ATRIP kinase complex triggers activation of the Fanconi Anemia DNA repair pathway, *Cancer Research*, 72 (5) 1149-1156.
- 2 . Tomida J, Itaya A, Shigechi T, Unno J, Uchida E, Ikura M, Masuda Y, Tatsuda S, Adachi J, Kobayashi M, Meetei AR, Maehara Y, Yamamoto K, Kamiya K, Matsuura A, Matsuda T, Ikura T, Ishiai M, Takata M, (2013) A novel interplay between the Fanconi anemia core complex and ATR-ATRIP kinase during DNA cross-link repair. *Nuc. Acids Res.*, 41 (14) 6930-6941.
 - 3 . Saldivar JC, Cortez D, Cimprich KA. (2017) The essential kinase ATR: ensuring faithful duplication of a challenging genome, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 18 (10) 622-636.
 - 4 . Inano S, Sato K, Katsuki Y, Kobayashi W, Tanaka H, Nakajima K, Nakada S, Miyoshi H, Knies K, Takaori-Kondo A, Schindler D, Ishiai M, Kurumizaka H, Takata M. (2017) RFD3-mediated ubiquitination promotes timely removal of both RPA and RAD51 from DNA damage sites to facilitate homologous recombination. *Mol. Cell*, 66 (5) 622-634.
 - 5 . Olivieri M, Cho T, Alvarez-Quilon A, Li K, Schellberg MJ, Zimmermann M, Hustedt N, Rossi SE, Adam S, Melo H, Heijink AM, Sastre-Moreno G, Moatti N, Szilard RK, McEwan A, Ling AK, Serrano-Benitez A, Ubhi T, Feng S, Pawling J, Delgado-Sainz I, Ferguson MW, Dennis JW, Brown GW, Cortes-Ledesma F, Williams RS, Martin A, Xu D, Dorocher D. (2020) A genetic map of the response to DNA damage in human cells. *Cell*, 182 (2) 481-496.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoshioka KI, Kusumoto-Matsuo R, Matsuno Y, Ishiai M.	4. 巻 22
2. 論文標題 Genomic Instability and Cancer Risk Associated with Erroneous DNA Repair.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 12254
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222212254	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Ishiai M.	4. 巻 12
2. 論文標題 Regulation of the Fanconi Anemia DNA Repair Pathway by Phosphorylation and Monoubiquitination	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes (Basel).	6. 最初と最後の頁 1763
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/genes12111763.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tanooka H, Inoue A, Takahashi RU, Tatsumi K, Fujikawa K, Nagao T, Ishiai M, Chiwaki F, Aoyagi K, Sasaki H, Ochiya T.	4. 巻 18
2. 論文標題 Bacterial SOS Genes mucAB/umuDC Promote Mouse Tumors by Activating Oncogenes Nedd9/Aurkb via a miR-145 Sponge	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 1271-1277
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1541-7786.MCR-20-0137. Epub 2020 Jun 8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsui M, Sakasai R, Abe M, Kimura Y, Kajita S, Torii W, Katsuki Y, Ishiai M, Iwabuchi K, Takata M, Nishi R.	4. 巻 9
2. 論文標題 USP42 enhances homologous recombination repair by promoting R-loop resolution with a DNA-RNA helicase DHX9	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncogenesis	6. 最初と最後の頁 60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41389-020-00244-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsukada K, Shimada M, Imamura R, Saikawa K, Ishiai M, Matsumoto Y.	4. 巻 822
2. 論文標題 The FHA domain of PNKP is essential for its recruitment to DNA damage sites and maintenance of genome stability	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mutat Res.	6. 最初と最後の頁 111727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mrfmmm.2020.111727	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanooka Hiroshi, Inoue Ayako, Takahashi Ryou-u, Tatsumi Kouichi, Fujikawa Kazuo, Nagao Tetsuji, Ishiai Masamichi, Chiwaki Fumiko, Aoyagi Kazuhiko, Sasaki Hiroki, Ochiya Takahiro	4. 巻 18
2. 論文標題 Bacterial SOS Genes <i>mucAB/umuDC</i> Promote Mouse Tumors by Activating Oncogenes <i>Nedd9/Aurkb</i> via a miR-145 Sponge	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1271 ~ 1277
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-20-0137	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okamoto Yusuke, Abe Masako, Itaya Akiko, Tomida Junya, Ishiai Masamichi, Takaori-Kondo Akifumi, Taoka Masato, Isobe Toshiaki, Takata Minoru	4. 巻 286
2. 論文標題 FANCD2 protects genome stability by recruiting RNA processing enzymes to resolve R-loops during mild replication stress	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 139 ~ 150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.14700	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imamura Rikiya, Saito Mizuki, Shimada Mikio, Kobayashi Junya, Ishiai Masamichi, Matsumoto Yoshihisa	4. 巻 64
2. 論文標題 APTX acts in DNA double-strand break repair in a manner distinct from XRCC4	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 485 ~ 495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rrad007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 石合 正道	4. 巻 73
2. 論文標題 DNA鎖間架橋の修復	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 115-119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 今村力也、齋藤瑞樹、島田幹男、石合正道、松本義久
2. 発表標題 遺伝性疾患原因遺伝子APT _X のDNA損傷およびDNA複製下での役割
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塚田海馬、今井力也、齊川昂太郎、島田幹男、石合正道、松本義久
2. 発表標題 蛍光ライブセルイメージングを用いたDNA修復酵素PNKPの制御メカニズム解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第63回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nishi R, Matsui M, Sakarai R, Abe M, Kimura Y, Kajita S, Torii W, Ishiai M, Iwabuchi K, Takata M.
2. 発表標題 Homologous recombination repair regulated by nuclear speckle factors
3. 学会等名 International congress of radiation research 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西良太郎、松井美咲、木村祐輔、安倍昌子、逆井良、梶田翔暉、鳥居若菜、石合正道、岩淵邦芳、高田穰
2. 発表標題 Nuclear speckleを介した相同組換え修復制御
3. 学会等名 第78回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西良太郎、松井美咲、逆井良、安倍昌子、木村祐輔、梶田翔暉、鳥居若菜、勝木陽子、石合正道、岩淵邦芳、高田穰
2. 発表標題 DNA二重鎖切断によって誘発されるR-loop解消メカニズムの解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松井美咲、木村祐輔、安倍昌子、梶田翔暉、石合正道、高田穰、西良太郎
2. 発表標題 新規nuclear speckle因子USP42は相同組み換え修復を制御する
3. 学会等名 日本放射線影響学会第61回大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松井美咲、木村祐輔、安倍昌子、梶田翔暉、石合正道、高田穰、西良太郎
2. 発表標題 Nuclear speckleに局在する脱ユビキチン化酵素USP42はDNA二重鎖切断修復を制御する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Rikiya Imamura, Mizuki Saito, Mikio Shimada, Masamichi Ishiai, Yoshihisa Matsumoto
2. 発表標題 Role of genetic disease factor APTX in DNA double strand break repair
3. 学会等名 5th Asian Congress of Radiation Research (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今村力也、齊藤瑞樹、島田幹男、石合正道、松本義久
2. 発表標題 遺伝性疾患原因遺伝子APTXのDNA二本鎖切断修復での役割
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 今村力也、齊藤瑞樹、島田幹男、石合正道、松本義久
2. 発表標題 遺伝性疾患原因遺伝子APTXのDNA複製および複製ストレス下での役割
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塚田海馬、今村力也、齊藤瑞樹、石合正道、島田幹男、松本義久
2. 発表標題 DNA複製中の岡崎フラグメント成熟におけるDNA修復酵素PNKPの役割
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 石合正道、高田稷。大西 武雄 監修、松本 英樹 総編集、甲斐 倫明、宮川清、柿沼志津子、西村恭昌、 近藤隆 編	4. 発行年 2019年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 304
3. 書名 放射線医学の事典	

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://www.ncc.go.jp/jp/ri/division/radioisotope/index.html

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------