

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590270

研究課題名（和文）分子シャペロン Hsp90 による DNA 損傷応答機構の制御

研究課題名（英文）Regulation of DNA-damage response pathways by the molecular chaperone Hsp90

研究代表者

小田 司（ODA TSUKASA）

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：10323643

研究成果の概要：分子シャペロン HSP90 が DNA ポリメラーゼ Po1  $\eta$  の制御に関わっているか検討した。その結果、HSP90 は Po1  $\eta$  の安定性や DNA 損傷部位への集積を制御することにより、細胞の紫外線感受性、遺伝子の突然変異の発生に関与することが明らかになった。以上の結果は、HSP90 の発現量や活性に影響を与える様々なストレスや化学物質が、Po1  $\eta$  の制御を介して、遺伝子の突然変異の発生に関与する可能性を示唆する。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：DNA 損傷、複製ストレス、HSP90、損傷乗り越え DNA 合成、遺伝子突然変異

## 1. 研究開始当初の背景

酸化ストレスや紫外線、抗がん剤、あるいは発がん遺伝子の活性化など細胞内外の様々な要因に由来する DNA 損傷は、ゲノム複製障害を引き起こす「複製ストレス」として作用する。複製ストレスの亢進や、あるいはそれに対処する細胞の機能不全は、細胞老化

や細胞死の亢進による臓器機能低下を促進する一方、ゲノム不安定性を引き起こし腫瘍発生の原因ともなる。このことは、複製ストレス応答に密接に相互作用しつつ関与する主要経路である「相同組み換え (HR)」、「FA/BRCA 経路」、「損傷乗り越え DNA 合成 (TLS)」に遺伝的欠損を持つ個体・細胞の表現型から強く支持される。一方、これら経路

の構成蛋白の発現や局在などの制御と環境因子がそれに与える影響は後天的疾患の病態に重要と考えられるが、その解明はまだ始まったばかりである。

熱ショック応答系 (HSR) を形成する分子シャペロン HSP70, HSP90 は、非ストレス状態でも発現しており、細胞の増殖・生存シグナルに関与する受容体、プロテインキナーゼ、転写因子などの安定性、局在、蛋白相互作用などを多面的に制御する。このような機能は腫瘍形成、臓器不全などの病態において重要な役割を果たしている。

このような HSR の機能が一部、複製ストレス応答の制御を介することを示唆する所見は多く報告されている。たとえば、熱ショックは DNA 損傷応答の一部を活性化し、HSP70 欠損マウスにおいてゲノムの不安定性が増加する。また、HSP90 阻害剤は腫瘍の放射線や DNA 損傷性抗がん剤への感受性を高め、逆に温熱療法による HSP 発現の亢進は抗がん剤耐性を引き起こす。これらの観察から、HSR が DNA 損傷応答に様々な面に関与する可能性が示唆されているが、その分子機構や生理的意義は大部分不明である。

我々は、先天性造血障害や家族性乳がんの原因蛋白によって構成されるゲノム安定化機構である FA/BRCA 経路を研究する過程で、HSP90 がその機能を促進する作用を証明した。続いて、HSP90 が Y-family DNA ポリメラーゼ (Y-Pol) のひとつである Polymerase  $\eta$  (Pol  $\eta$ ) と結合し、その安定性や核内局在を制御していることを見いだした。Y-Pol は損傷乗り越え DNA 合成 (Translesion DNA synthesis, TLS) に関与する忠実度の低いポリメラーゼであり、点突然変異を導入しやすい。FA/BRCA

経路と Y-Pol を介する TLS は互いに密接に相互作用しつつ、DNA 損傷などによるゲノム複製の阻害 (複製ストレス) に対する細胞応答に重要な役割を果たしている。

## 2. 研究の目的

Pol  $\eta$  が HSP90 の client 蛋白であること証明し、その制御の分子機構と生物学的意義を明らかにする。さらに、Hsp90 による複製ストレス応答システムの新しい理解をめざす。

## 3. 研究の方法

(1) HSP90 の client 蛋白の条件の一つに HSP90 との物理的な相互作用がある。そこで、両者の結合を免疫沈降法で調べた。

(2) Client 蛋白の多くは、HSP90 により安定化されている。そこで、細胞を HSP90 阻害剤で処理したり、HSP90 RNAi で HSP90 レベルを減少させ、Pol  $\eta$  の発現量が変化するか調べた。

(3) DNA 損傷後に Pol  $\eta$  は、複製阻害部位へ集積し働くと考えられている。HSP90 が Pol  $\eta$  の核内局在を制御するか検討するため、GFP-Pol  $\eta$  を安定に発現させた細胞に HSP90 阻害剤処理や HSP90 RNAi をおこなった後、Pol  $\eta$  の複製阻害部位への集積に影響がどうか蛍光顕微鏡で観察をした。さらに、その分子機構を免疫沈降法や GST pull-down 法で解析した。

(4) Pol  $\eta$  の機能が損なわれた細胞は、紫外線に感受性が高い。HSP90 が Pol  $\eta$  の機能に関与するか調べるため、HSP90 阻害剤処理や HSP90 RNAi をおこなった細胞に紫外線照射をし、細胞生存率を測定した。

(5) Pol  $\eta$  は、紫外線による DNA 損傷部位を正確に乗り越えて複製する機能を持ち、その機能障害は点突然変異の発生を増加させる。そこで、紫外線照射したシャトルベクター DNA をヒト細胞中で複製させた時にレポーター遺伝子 *supF* に生ずる変異率とその性状に及ぼす HSP90 阻害の影響を解析した。

#### 4. 研究成果

(1) GFP-Pol  $\eta$  を安定に発現する HEK293T、HeLa 細胞を作製し、免疫沈降法をおこなったところ、HSP90 は Pol  $\eta$  と特異的に結合し、これらの結合は HSP90 阻害剤 17-AAG で抑制された。また、内在性の Pol  $\eta$  も HSP90 と特異的に結合していた。さらに rabbit reticulocyte lysates で合成した Pol  $\eta$  も lysates 中の HSP90 と結合した。次に細胞分画後、免疫沈降を行ったところ、HSP90 は細胞質中の Pol  $\eta$  と結合していることが明らかになった。

(2) 17-AAG 処理により、HeLa 細胞では、Pol  $\eta$  のポリユビキチン化とプロテアソームによる分解が亢進した。HSP90 RNAi でも Pol  $\eta$  の発現レベルが減少し、HSP90 が Pol  $\eta$  の安定性に重要な働きをしていることが分かった。

(3) HeLa, HEK293T 細胞において、紫外線で生じた複製阻害部位への GFP-Pol  $\eta$  の集積が 17-AAG により抑制された。HeLa 細胞では Pol  $\eta$  の分解がその原因だと考えられるが、HSP90 阻害による Pol  $\eta$  分解が弱い HEK293 細胞では、他の要因が考えられた。Pol  $\eta$  の複製阻害部位への集積にはモノユビキチン化された複製因子 PCNA との結合が重要である。そこで、両者の結合に HSP90 が関与

するか免疫沈降法、GST pull-down 法で検討した。その結果、HSP90 阻害は、Pol  $\eta$  とユビキチン化 PCNA との結合を in vivo, in vitro で抑制することを見いだした。

(4) 17-AAG 処理は、HeLa および HEK293T 細胞の紫外線に対する感受性を亢進させた。shRNA で Pol  $\eta$  の発現を抑制させた HEK293T 細胞はコントロールの細胞よりも高い紫外線感受性を示したが、17-AAG による亢進は見られなかった。この結果は、HSP90 が細胞の紫外線感受性に関与しており、それは Pol  $\eta$  依存的事であることを示唆する。

(5) *SupF* シャトルベクター法を用いて、紫外線誘発突然変異率を解析したところ、17-AAG 処理された細胞では、点突然変異率の増加がみられた。shRNA で Pol  $\eta$  の発現を抑制させた HEK293T 細胞はコントロールの細胞よりも高い突然変異率を示したが、17-AAG による亢進は見られなかった。この結果は、HSP90 が紫外線誘発突然変異の発生に Pol  $\eta$  を介して関与することを示唆する。

今回、我々は Pol  $\eta$  が Hsp90 のクライアント蛋白であり、その安定性や機能に Hsp90 が重要な役割を果たしていることを明らかにした。Hsp90 の発現量や活性に影響を与える様々なストレスや化学物質は、Pol  $\eta$  を介して、遺伝子の突然変異の発生に関与する可能性がある。

#### 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)

- ① 山下 孝之、小田 司、関本 隆志 (3 人中、2 番目) Fanconi 貧血-ゲノム損傷ストレスと造血幹細胞の老化. 二本臨

床 66 卷、477-482、2008、査読無

研究者番号：10166671

- ② Yamashita T, Oda T, Sekimoto T. (3人中、2番目) Hsp90 and the Fanconi anemia pathway: a molecular link between protein quality control and the DNA damage response. Cell Cycle. 15: 2232-2235, 2007, 査読有
- ③ Seki S, Oda T, Yamashita T. (他9人、7番目) A requirement of FancL and FancD2 monoubiquitination in DNA repair. Gene to Cells. 12:299-310, 2007, 査読有
- ④ Oda T, Hayano T, Yamashita T. (他2人、1番目) Hsp90 regulates the Fanconi anemia DNA damage response pathway. Blood. 109:5016-5026, 2007, 査読有

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：

[学会発表] (計4件)

- ① 関本 隆志、分子シャペロン HSP90 は Polymerase- $\eta$  (Pol- $\eta$ ) の複製フォーカスへの集積と損傷乗越え DNA 合成 (TLS) を促進する 第 31 回日本分子生物学会 2008 年 12 月 12 日 神戸
- ② 小田 司、Heat shock protein (Hsp) 90 による複製ストレス応答系の制御 第 4 回麒麟塾(血液若手研究者シンポジウム) 2008 年 7 月 19 日 東京
- ③ 関本 隆志、分子シャペロン Hsp90 は translesion DNA synthesis (TLS) に関する DNA polymerase-eta (Pol-h) の Replication focus (RF) への動員に必要である 第 30 回日本分子生物学会 2007 年 12 月 14 日 横浜
- ④ 小田 司、分子シャペロン Hsp90 は UV 照射を受けた細胞において DNA ポリメラーゼ eta (Polh) の複製フォーカスへの動員を促進する 第 66 回日本癌学会学術総会 2007 年 10 月 5 日 横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小田 司 (ODA TSUKASA)  
群馬大学・生体調節研究所・助教  
研究者番号：10323643

### (2) 研究分担者

山下 孝之 (YAMASHITA TAKAYUKI)  
群馬大学・生体調節研究所・教授