

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591109

研究課題名（和文）複製ストレス応答の新しい制御機構の解明から、造血疾患の病態解明と治療開発への展開

研究課題名（英文）New understanding and therapeutics of hematopoietic diseases- from a viewpoint of regulatory mechanisms of replicative stress

研究代表者

山下 孝之（YAMASHITA TAKAYUKI）

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：10166671

研究成果の概要（和文）：ファンconi貧血（FA）は遺伝的に多くのグループに分類される先天性造血不全症候群である。最近、多数のFA遺伝子産物が分子経路を形成し、他の分子機構と相互作用しつつDNA損傷因子による複製ストレスに対する防御作用を発揮することが明らかになってきた。「損傷乗越えDNA合成」を行うPol-etaやREV1などのDNAポリメラーゼは、FA遺伝子産物と相互作用して複製ストレスに対応する。しかし、これらポリメラーゼ蛋白の制御機構はほとんど判明していなかった。今回、私たちは分子シャペロンHsp90がこれらポリメラーゼの安定性や蛋白相互作用を制御することによって、複製ストレス応答に影響することを見出した。この知見は、造血疾患の新たな治療開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Fanconi anemia (FA) is genetically heterogeneous inherited bone marrow failure syndrome, characterized by cellular sensitivity to DNA crosslinkers and susceptibility to various types of malignant tumors including acute myeloid leukemia. Increasing evidence indicates that FA proteins protect against “replicative stress” induced by various genotoxic agents, cooperating with other machineries. Translesion DNA synthesis is one of such cellular protective mechanisms, using specialized DNA polymerases including Pol-eta and REV1. However, regulatory mechanism of these polymerases was largely unknown. We identified the molecular chaperone Hsp90 as an essential regulator of these polymerases. The present findings may lead to development of new therapy of hematopoietic diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：DNA複製、損傷乗越えDNA合成、Yファミリー・ポリメラーゼ、Hsp90

1. 研究開始当初の背景

ファンconi貧血（Fanconi anemia, FA）は、

遺伝的に多くのグループに分類される先天性骨髄不全症候群である。その遺伝子産物群

は、特に DNA 架橋剤による DNA 複製の障害、すなわち「複製ストレス」に対する細胞防御機構において重要な役割を果たす分子ネットワークを形成すると考えられている。見方を変えれば、複製ストレス応答に関与する多くの遺伝子の先天的欠損が造血不全という共通した症状を発現すると考えられる。したがって、このような分子ネットワークの制御が環境要因などによって後天的異常を来し、その結果として造血障害を発症する可能性は十分に考えられる。したがって、このような機構の解明が新しい治療法の開発につながる可能性が期待できる。すなわち、FA 分子経路を中心とした複製ストレス応答機構の解明は後天的造血不全症候群の病態解明や治療開発に有用であると考えられる。

最近、DNA 架橋剤の修復において、FA 分子ネットワークと共同して、損傷乗越え DNA 合成機構が働くことを示す知見が増加して来た。この機構には、Y ファミリーポリメラーゼ (Y-Pol) をはじめとする、新しいクラスの DNA ポリメラーゼが関与する。Y-Pol が複製阻害部位に動員されるメカニズムとして、局所で Rad6/Rad18 ユビキチン化酵素複合体による PCNA のモノユビキチン化が引き起こされ、Y-Pol が有する PCNA 結合部位とユビキチン結合部位を介してモノユビキチン化 PCNA (Ub-PCNA) に結合することが明らかになってきた。しかし、Y-Pol 蛋白自体の制御機構については、酵母などにおいて報告があるものの、ほ乳動物においては、ほとんど判明していなかった。一方、私たちは分子シャペロン Hsp90 が FA 蛋白のひとつである FANCA の安定性と細胞内局在の制御することによって、FA 分子ネットワークの働きを制御することを見出していた。そこで、本研究においては、Hsp90 が Y-Pol の制御に関与するのではないかという点に関心を持って、その可能性を検討した。今回の研究において、Pol-eta と REV1 という真核生物を通して保存されている Y-Pol の働きが Hsp90 によって制御することを明らかにした。

2. 研究の目的

代表的な Y-Pol である Pol-eta, REV1 の制御機構に Hsp90 が関与する可能性を明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) Pol-eta, REV1 と Hsp90 の結合については、GFP-Pol-eta や GFP-REV1 を発現させた培養細胞において、これらの蛋白と Hsp90 の共沈を解析した。また、内因性ポリメラーゼ蛋白と Hsp90 の共沈を解析した。さらに、*in vitro* で Pol-eta, REV1 を合成し、合成系の抽出液に含まれる Hsp90 の結合を解析した。Pol-eta, REV1 と Hsp90 の結合領域を解析す

るために、種々の deletion mutant 蛋白を HEK293T 細胞に発現させ、共沈を解析した。(2) Hsp90 阻害剤である 17-AAG が Pol-eta, REV1 の発現レベル、蛋白の安定性、それに対するプロテアソーム阻害剤の影響を、293T, OUMS など種々のヒト細胞株を用いて、Western blot によって解析した。

(3) また、GFP 標識 Pol-eta, REV1 を発現させた細胞を UV 照射すると核内で DNA 損傷部位に集積してフォカス形成を行うので、これに対する 17-AAG の効果を解析した。

(4) Pol-eta, REV1 と Ub-PCNA の相互作用を解析するために、細胞をクロスリンク処理後、クロマチン分画を可溶化し、Ub-PCNA とこれら Y-Pol との共沈を解析した。細胞内局在、機能に Hsp90 阻害剤が与える影響を解析した。また、GST-PCNA, GST-Ub による pull-down 法で、細胞抽出液中の Pol-eta, REV1 との *in vitro* 結合を解析した。

(5) 細胞生存率は MTT 法で測定した。

(6) UV 誘導性突然変異は supF 遺伝子をレポーターとして測定した。具体的には、supF を含むシャトルベクターに UV 損傷を与え、ヒト細胞内で複製させた後に回収した。これを、正常 supF 遺伝子によって LacZ の発現を回復する大腸菌株に導入し、LacZ 発現コロニーの比率を測定した。LacZ 発現の見られないコロニーからは、プラスミドを回収して supF の塩基配列を確認した。

4. 研究成果

(1) Hsp90 による Pol-eta の制御

Hsp90 は *in vivo* および *in vitro* において Pol-eta に特異的に結合した。次に、いくつかのヒト細胞において、17-AAG は Pol-eta の発現レベルを減少させ、これはユビキチン・プロテアソームに依存する蛋白分解によるものであった。

一方、Pol-eta の減少があまり見られない細胞においても、UV 照射による GFP-Pol-eta のフォーカス形成が著明に抑制されることを見出した。この分子機構として、Hsp90 が Pol-eta の構造に影響し、Ub-PCNA との結合を制御する可能性が考えられた。この可能性を検討するために、まずクロマチン分画における Pol-eta と Ub-PCNA の結合に 17-AAG が与える影響を解析した。UV 照射によって Ub-PCNA が増加し、これと共沈する Pol-eta 量が増加したが、17-AAG はこれを抑制した。また、GST pull-down 法で Pol-eta と *in vitro* における PCNA および Ub との結合を解析したところ、17-AAG 処理を受けた細胞から抽出した Pol-eta は、いずれの結合も減少した。これらの結果は、Hsp90 が Pol-eta の Ub および PCNA 結合領域が機能的に活性化させることを示唆する。

最後に、Hsp90 が Pol-eta を介する UV 損傷

部位の損傷乗越え合成に与える影響を解析した。Pol-etaはUVによって生ずるピリミジン二量体の対側に正しい塩基を挿入し、細胞のDNA損傷耐性を亢進させるとともに、UVによる変異率を抑制する。細胞を17-AAGで処理したところ、UVによる細胞毒性を促進し、これはPol-eta RNAiと非相加的作用を示した。したがって、この17-AAGの効果はPol-etaを介するものであることが示唆された。また、17-AAGはUVによる変異率を増加させ、この作用もPol-eta RNAiと非相加的であることから、Pol-eta依存性であることが示唆された。

以上をまとめると、Hsp90はPol-etaに特異的に結合し、安定性を高めるだけでなく、Ub-PCNAとの結合を促進することによって、フォーカス形成を促進し、損傷乗越え合成を制御すると考えられる。

(2) Hsp90によるREV1の制御

Hsp90はREV1に結合し、多くの細胞タイプで17-AAG処理によってプロテアソーム依存性の分解を引き起こした。REV1はPol-etaと結合するが、上記の結果は、Pol-etaと結合しないREV1変異体でも見られ、また、Pol-etaを欠損する細胞でも見られた。このことは、Hsp90がREV1に直接的に作用することを強く示唆する。

また、Pol-etaの場合と同様に、17-AAGがREV1の分解を伴わずに、UV照射によるフォーカス形成を抑制する細胞が数種見つかった。そこで、これらの代表として293T細胞を解析したところ、やはりクロマチンにおけるUb-PCNAとの結合にHsp90の作用が必要であることが示された。しかし、GST pull-down法によるin vitro結合の解析結果は、Pol-etaの場合とは異なり、Hsp90がREV1とPCNAの結合には影響するが、Ubとの結合には影響しなかった。

REV1はUVによる変異発生に重要な役割を果たすことが知られている。そこで、17-AAGがREV1蛋白に与える影響の機能的評価を行った。上述のように、17-AAGはPol-etaに影響してUV誘導性変異に影響する。そこで、この効果を除くためにPol-eta欠損細胞に、UV照射したsupFを含むシャトルベクターを導入し、supF変異率に17-AAGが与える影響を解析したところ、予想に合致して17-AAGが変異率を抑制した。また、この細胞でREV1 siRNAによって蛋白発現を抑制すると、やはり変異率が抑制された。さらに、17-AAGの効果とREV1 siRNAの効果は非相加的であったので、17-AAGの効果はREV1の制御を介して発揮されることが示唆された。

以上より、Hsp90はREV1の構造や安定性も制御し、REV1による突然変異の導入に影響することが明らかになった。

今回の私たちの結果は、Hsp90がY-Polの

制御を介して複製ストレス応答に重要な役割を果たす可能性を明らかにした。私たちは、これまでにFA蛋白のFANCAがHsp90によって制御を受けることも報告している。Hsp90の活性の制御機構は十分明らかではないが、Hsp90は蛋白損傷ストレスに反応する熱ショック応答系の中で重要な役割をしている。今後、熱ショック応答系と複製ストレス応答系の関係が明らかになり、造血疾患の新たな視点からの病態解明や治療開発につながることを期待できる。

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2件)

①Sekimoto T, Oda T, Yamashita T. et al. The Molecular Chaperone Hsp90 Regulates Accumulation of DNA Polymerase η at Replication Stalling Sites in UV-irradiated Cells. *Mol Cell* 37:79-89, 2010 (査読有り)

②Paiboonsukwong K, Yamashita T et al. Correction of mutant Fanconi anemia gene by homologous recombination in human hematopoietic cells using adeno-associated virus vector. *J. Gene Med.* 11: 1012-1019. 2009 (査読有り)

[学会発表] (計6件)

①山下孝之: 「がんシャペロン」Hsp90はDNAポリメラーゼ η による損傷乗り越えDNA合成を促進する. 第69回日本癌学会学術総会 (2010年9月22日、大阪)招待講演

②Oda T, Sekimoto T, Yamashita T. Acute depletion of Heat shock factor (HSF) 1 activates tumor-suppressive cell senescence program. 第69回日本癌学会学術総会 (2010年9月22日、大阪)

③Mayca Pozo Franklin, 小田司, 関本隆志, 山下孝之ら: 分子シャペロンHsp90はY-family DNAポリメラーゼREV1のDNA損傷による核内フォーカス形成を促進する. 第32回日本分子生物学会年会 (2009年12月10日、横浜)

④小田司, 関本隆志, 山下孝之ら: 熱ショック応答転写因子Heat shock factor 1の発現抑制はhTERT不死化ヒト細胞においてp53-p21を介する細胞老化を引き起こす. 第32回日本分子生物学会年会 (2009年12月9日、横浜)

⑤ 関本隆志、小田 司、山下孝之ら：分子シャペロン HSP90 は Polymerase- η (Pol- η) 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年会 (2008 年 12 月 11 日、神戸)

⑥ 山下孝之、小田 司、関本隆志: Fanconi 貧血の分子病態 - 最近の進歩. 第 70 回日本血液学会総会 (2008 年 10 月 11 日、京都) (招待講演)

[図書] (計 1 件)

① 山下孝之 Fanconi 貧血の分子病態 Annual Review 血液 2011 (分担執筆) p60-64

[その他]

ホームページ

<http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/lab/molgen/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 孝之 (YAMASHITA TAKAYUKI)
群馬大学・生体調節研究所・教授
研究者番号：1 0 1 6 6 6 7 1

(2) 研究分担者

小田 司 (ODA TSUKASA)
群馬大学・生体調節研究所・助教
研究者番号：1 0 3 2 3 6 4 3

関本 隆志 (SEKIMOTO TAKAYUKI)
群馬大学・生体調節研究所・助教
研究者番号：2 0 4 3 6 3 2 2