

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501257

研究課題名(和文) 前がん状態にみられる細胞老化とゲノム不安定性における複製ストレス応答機構の役割

研究課題名(英文) Roles of replication stress for cellular senescence and genome instability in preneoplastic lesions

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：前癌病変において、発がん遺伝子による複製ストレスとDNA損傷が、細胞老化・死を誘導する一方、ゲノム不安定性を介して発がんを促進する。この過程において、DNAの再複製は主要な役割を果たすが、これに関与するDNAポリメラーゼについては、ほとんど判明していない。私たちは、複製開始制御因子gemininの発現抑制による再複製モデル系において、Pol-etaが動員されることを見いだした。また、Pol-etaの発現抑制はgeminin抑制や発がん遺伝子cyclin Eが誘導する再複製を抑制した。これらの知見は、発がん初期過程におけるゲノム不安定性の仕組みの解明と治療開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In preneoplastic lesions, oncogene-induced replication stress plays a dual role in induction of cell senescence/apoptosis and tumor promotion through increased genomic instability. In these processes, oncogene-induced excessive activation of replication origins and consequent rereplication plays a major role. However, little is known about fork progression during rereplication. When rereplication was induced by depletion of geminin, a regulator of origin activation, Pol-eta was recruited to rereplication sites in human cell lines. Similar observations were obtained in cyclin E-induced rereplication in human tumor cells. Furthermore, Pol-eta knockdown suppressed rereplication induced by either geminin depletion or cyclin E expression. Together, our data suggest that Pol-eta participates in oncogene-induced rereplication. These findings provide important mechanistic insights into genomic instability during tumorigenesis.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：DNA複製 DNA複製ストレス Y-family polymerase cyclin E geminin ゲノム不安定性 前がん病変 発がん

1. 研究開始当初の背景

(1) 前がん病変においては細胞老化とゲノム不安定性が共存して見られる。細胞老化は発がんを抑制する方向に作用するが、一方、ゲノム不安定性は前がん病変の細胞に新たながんドライバー変異の発生をもたらし、悪性を促進する方向に働く。したがって、このプロセスの分子機構を解明することは発がん機序の解明にきわめて重要である。これらの機序において、発がんシグナルによる複製ストレスと、その結果引き起こされる DNA 損傷応答が中心的な役割を果たすと考えられており、その中でも発がん遺伝子による複製開始点の活性化亢進による DNA 再複製はゲノム不安定性の重要な原因である。しかし、再複製に関与する DNA ポリメラーゼについては、これまでにほとんど研究されておらず、判明していない。

(3) ほ乳類の DNA ポリメラーゼは 15 種類あり、大きく二つのグループに分けられる。すなわち、通常の高忠実度な複製を行う DNA ポリメラーゼ (Pol-delta, Pol-epsilon) とそれ以外である。後者は、複製忠実度が低く、損傷部位を乗り越えて DNA 合成することができる DNA ポリメラーゼである。中でも、共通の構造を持つ Y-family ポリメラーゼは、ヒトでは Pol-eta, -iota, -kappa, REV1 の 4 種類が知られており、大腸菌や酵母から進化的に保存されている。Pol-eta の先天性欠損は、皮膚の紫外線感受性と皮膚がんの合併を特徴とする色素性乾皮症バリエーション型の原因となる。Y-family ポリメラーゼは活性中心の構造がルーズなために、損傷乗り越え以外に、通常の高忠実度な複製を行う Pol-delta, Pol-epsilon が複製しにくい構造の DNA の複製に関与する新しい機能が注目されている。

2. 研究の目的

発がんシグナルが誘導する DNA 再複製における Y-family ポリメラーゼの機能と、その基盤となる分子メカニズムの詳細を、特に Pol-eta に焦点を当てて、明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 主に、ヒト骨肉腫細胞株 U2OS において GFP 標識 Pol-eta などの Y-family ポリメラーゼを安定発現するクローンを作成し、これらの細胞で複製制御因子 geminin の siRNA による発現抑制や発がん遺伝子 cyclin E のウイルスベクターによる発現によって DNA 再複製を誘導した。

(2) これらの細胞とコントロール細胞を比較して、GFP 標識 Y-family ポリメラーゼの複製部位への局在を、蛍光抗体による染色→蛍光顕微鏡による画像の取得→画像解析ソフトを用いた定量解析を行う方法と、細胞からの全抽出物や染色体画分抽出物、PCNA 免

疫沈降物、再複製 DNA の沈降物 (iPOND 法すなわち DNA を EdU で標識し、EDU をクリック法でビオチン化、その後ストレプトアビジンビーズで pull-down する) に含まれる GFP-Pol-eta を immunoblot 法で測定する生化学的な方法によって解析した。

(2) geminin 発現抑制や発がん遺伝子によって誘導される DNA 再複製において、Y-family ポリメラーゼの関与を評価するために、それぞれのポリメラーゼに対する複数の siRNA を用いた発現抑制が、再複製による G2/高倍数体 (DNA 量 $\geq 4N$) の細胞分画の DNA 総量の増加率、DNA fiber 法を用いた複製フォーク進行速度、BrdU などのチミジンアナログの取り込み、に与える影響を測定した。

4. 研究成果

(1) U2OS 細胞において、複製開始点制御蛋白 geminin の発現抑制によって DNA 再複製を誘導するモデル細胞系を作成した。本実験系では G2 期停止に続いて分裂せずに再複製を起こし、高倍数体が発現する。この高倍数体において、DNA 合成部位に一致して、Pol-eta の集積が顕著に見られた。また、他の Y-family ポリメラーゼも程度は低くなるが、DNA 合成部位に動員されることが観察された。これらは、正常の S 期における DNA 複製では見られなかった。

(2) 上記の再複製における Pol-eta をはじめとする Y-family ポリメラーゼの発現抑制の効果を解析すると、いずれも再複製を抑制する効果が見られた。

(3) U2OS において発がん遺伝子 cyclin E の発現は DNA 再複製を誘導し、Pol-eta を DNA 複製部位へ動員した。また、Pol-eta の発現抑制は再複製を阻害した。

(4) 再複製部位への Pol-eta の動員には、複製フォークの遅延→一本鎖 DNA の増加→Rad18 を介する PCNA のモノユビキチン化→ユビキチン化 PCNA と Pol-eta の結合という一連の反応が重要である。

(5) 初代培養ヒト・ケラチノサイトにパピロームウイルスの発がん蛋白 E6/E7 を導入すると高倍数体細胞で DNA 合成を行っている核、すなわち再複製している細胞の約半数で Pol-eta が複製部位に動員されていた。

(5) 以上の結果は、発がん遺伝子が引き起こす DNA 再複製に Y-family ポリメラーゼが関与することを示唆する。また、Y-family ポリメラーゼによる点突然変異の誘発が、腫瘍悪性を促進する可能性がある。最近、がんゲノム解析で、ゲノムの再構成などの近傍で点突然変異の発生が高まっているクラスターが見いだされる頻度が高いことが報告さ

れている。再複製への Y-family ポリメラーゼの関与は、これらのメカニズムを説明する可能性が考えられる。

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5件)

Yabe M, Shimizu T, Morimoto T, Koike T, Takakura H, Tsukamoto H, Muroi K, Oshima K, Asami K, Takata M, Yamashita T, Kato S, Yabe H. Matched sibling donor stem cell transplantation for Fanconi anemia patients with T-cell somatic mosaicism. *Pediatr Transplant*. 査読有 2012;16:340-345 doi:10.1111/j.1399-3046.2012.01669.x

Yamashita T, Oda T, Sekimoto T. : Translesion DNA synthesis and hsp90. *Genes and Environment* 査読無 2012; 34:89-93

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jemsge/34/2/34_GE-2012-0006/_article

Matsushita N, Endo Y, Sato K, Kurumizaka H, Yamashita T, Takata M, Yanagi S. Direct inhibition of TNF-promoter activity by Fanconi anemia protein FANCD2. *PLoS One*. 査読有 2011;6(8):e23324. doi: 10.1371/journal.pone.0023324.

Sasaki M, Kawahara K, Nishio M, Mimori K, Kogo R, Hamada K, Itoh B, Wang J, Komatsu Y, Yang YR, Hikasa H, Horie Y, Yamashita T, Kamijo T, Zhang Y, Zhu Y, Prives C, Nakano T, Mak TW, Sasaki T, Maehama T, Mori M, Suzuki A.: Regulation of the MDM2-P53 pathway and tumor growth by PICT1 via nucleolar RPL11. *Nat Med* 査読有 2011;17: 944-951 doi: 10.1038/nm.2392.

Pozo FM, Oda T, Sekimoto T, Murakumo Y, Masutani C, Hanaoka F, Yamashita T.: Molecular chaperone Hsp90 regulates REV1-mediated mutagenesis. *Mol Cell Biol* 査読有 2011; 31: 3396-3409

[学会発表](計12件)

山下孝之: DNA polymerase-eta promotes DNA rereplication. International symposium on xeroderma pigmentosum and related disorders (平成26年3月5-7日、神戸)

小田司、関本隆志、山下孝之: DHRS2は熱ショック転写因子 HSF1 抑制で誘導される細胞老化に関与する可能性がある第36回日本分子生物学会年会(平成25年12月3日-12月6日、神戸)

小田司、関本隆志、山下孝之: DHRS2は熱ショック転写因子 HSF1 抑制で誘導される細胞老化に関与する可能性がある第36回日本分子生物学会年会(平成25年12月3日-12月6日、神戸)

関本隆志、小田司、花岡文雄、山下孝之: Polymerase-etaは発がん遺伝子が誘導するDNA再複製に関与する第36回日本分子生物学会年会(平成25年12月3-6日、神戸)

関本隆志、小田司、益谷央豪、花岡文雄、山下孝之: Y-family DNAポリメラーゼは、発がんシグナルが誘導するDNA再複製に関与する第72回日本癌学会学術総会(平成25年10月3-5日、横浜)

関本隆志、小田司、益谷央豪、花岡文雄、山下孝之: Y-family DNAポリメラーゼは、発がんシグナルが誘導するDNA再複製に関与する第35回日本分子生物学会年会(平成24年12月11-14日、福岡)

小田司、関本隆志、山下孝之: 熱ショック応答転写因子 Heat shock factor 1 (HSF1)の抑制によるp53依存性細胞老化にはDHRS2の発現誘導が重要である第35回日本分子生物学会年会(平成24年12月11-14日、福岡)

関本隆志、小田司、益谷央豪、花岡文雄、山下孝之: Polymerase-eta is involved in oncogene-induced DNA re-replication and DNA damage responses. 第71回日本癌学会学術総会(平成24年9月19-21日、札幌)

小田司、関本隆志、山下孝之: 熱ショック応答転写因子 Heat shock factor 1 (HSF1)の転写活性の抑制はp53-p21経路を介した細胞老化を誘導する第34回日本分子生物学会年会(平成23年12月11-16日、横浜)

関本隆志、小田司、益谷央豪、花岡文雄、山下孝之: Y-family DNAポリメラーゼによる損傷乗り越えDNA合成は、cyclin E過剰発現によるDNA複製ストレス応答に関与する第34回日本分子生物学会年会(平成23年12月11-16日、横浜)

マイカ ポゾ、フランクリン、小田司、関本隆志、村雲芳樹、益谷央豪、花岡文雄、山下孝之: 分子シャペロン Hsp90はREV1による突然変異の誘発を制御する。第70回日本癌学会学術総会(平成23年10月3-5日、名古屋)

小田司、関本隆志、山下孝之: 熱ショック転写因子 HSF1の急性欠乏は複数の腫瘍抑制経路を介して細胞老化プログラムを活性化する。第70回日本癌学会学術総会(平成22年10月3-5日、名古屋)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

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：10166671

(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：10323643

(3) 研究分担者

関本 隆志 (SEKIMOTO, Takayuki)
群馬大学・生体調節研究所・助教
研究者番号：20436322