

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 4 月 20 日現在

機関番号：17102  
研究種目：挑戦的萌芽研究  
研究期間：2012～2014  
課題番号：24650622  
研究課題名(和文) ATMの新規ゲノム安定性維持機構：染色体非ストレス時における細胞周期因子の制御

研究課題名(英文) Novel function of ATM for genome maintenance: Regulation of cell cycle factors without chromosomal damage

研究代表者  
藤田 雅俊 (Fujita, Masatoshi)  
九州大学・薬学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30270713  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ATMキナーゼは、主にDNA二重鎖切断部位(DSB)で活性化し機能する。本研究において我々は、ATMが染色体非ストレス時(DSB非存在下)のS期において、複製開始制御因子Cdt1の分解を制御していることを明らかにした。今までに得られた知見をまとめると、以下ようになる。ATMによるCdt1分解制御にはキナーゼ活性が必要である。MRN複合体もこの制御に必要であろう。Akt抑制、あるいはSkp2抑制は、ATM抑制と同じくCdt1分解を抑制した。よって、この新たなATM機能は、少なくとも部分的にはATM-Akt-Skp2経路を介していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Ataxia-telangiectasia mutated (ATM) plays crucial roles in DNA damage responses, especially with regard to DNA double-strand breaks (DSBs). Here, we found that ATM is involved in timely degradation of Cdt1, a critical replication licensing factor, during the unperturbed S phase. The novel ATM function for Cdt1 regulation was dependent on its kinase activity and NBS1. Indeed, we found that ATM is moderately phosphorylated at Ser1981 during the S phase. ATM silencing induced partial reduction in levels of Skp2, a component of SCFSkp2 ubiquitin ligase that controls Cdt1 degradation. Furthermore, Skp2 silencing resulted in Cdt1 stabilization like ATM inhibition. In addition, Akt inhibition led to modest stabilization of Cdt1. Therefore, the ATM-Akt-SCFSkp2 pathway may partly contribute to the novel ATM function. Finally, ATM inhibition rendered cells hypersensitive to induction of re-replication, indicating importance for maintenance of genome stability.

研究分野：分子生物学 / 分子腫瘍学

キーワード：ATM Cdt1 SNF2H 細胞周期 クロマチン

1. 研究開始当初の背景

細胞は種々の染色体ストレスに対して応答し、チェックポイント経路を活性化し細胞周期を停止させ、染色体障害の回復を計る。チェックポイント経路の最も上流に位置する key 分子の一つとして ATM キナーゼがあり、その機能不全は高発がん性を伴う毛細血管拡張性小脳失調症 (AT) の原因となる (Lavin, *Nature Rev Mol Cell Biol* 9, 2009)。

ATM は主に DNA 二重鎖切断 (DSB) で機能し、MRN (Mre11/Rad50/NBS1) 複合体と共に DSB を認識し活性化され、下流分子 Chk2 等をリン酸化し機能する。しかし、その活性化制御機構はまだ不明な点も多い。例えば、DSB が存在しなくとも、クロマチン構造変化が ATM 活性化シグナルとなり得ることを示した論文もある (Bakkenist & Kastan, *Nature* 421, 2003)。

一方、新たな ATM 下流経路も最近明らかになりつつある。例えば、低酸素ストレス時に ATM は転写因子 HIF-1 のリン酸化を介して mTOR 代謝経路を抑制する (Cam et al., *Mol Cell* 40, 2010)。ここでは、MRN は必要ない。さらには、ATM が酸化ストレスそのものによって、DNA 損傷とは独立して MRN 非依存性に活性化されるという、報告もなされた (Guo et al., *Science* 330, 2010)。しかし、これらの発展にも関わらず、なお大きな問題が残っている。すなわち、AT 患者細胞は実験条件で使用されるような比較的強い放射線や活性酸素に常に暴露されているとは考えられず、ATM は染色体非ストレス時にも恒常性維持のために何らかの機能を担っている可能性がある。しかしながら、そのような観点からの研究は殆どない。

2. 研究の目的

我々は ATM 抑制細胞において種々の細胞周期制御因子の動態を詳細に調べた。その結果、ATM が染色体非ストレス時の S 期 (Unperturbed S phase) において、染色体複製ライセンス因子 Cdt1 (総説: Fujita, *Cell Div* 1, 2006 および図 1) と Cdk インヒビター p27Kip1 (総説: Nakayama & Nakayama, *Nat Rev Cancer* 6, 2006) という重要な 2 因子の分解抑制を制御しているという興味深い知見を得ていた。

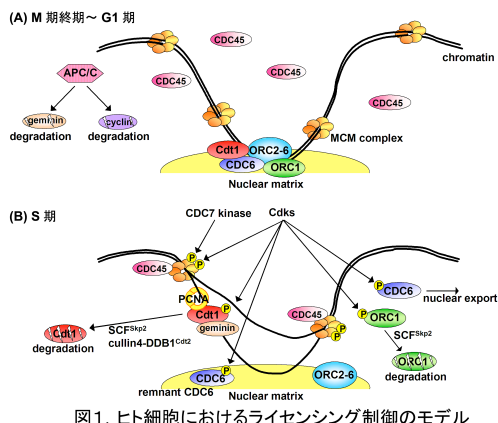


図1. ヒト細胞におけるライセンス制御のモデル

Cdt1 と p27 の正確な分解は染色体恒常性維持のために重要であり、よってこの染色体非ストレス時の ATM の新機能は、染色体恒常性維持のために重要であると考えられる。この新たな ATM 経路の詳細な分子機構の解明、すなわち①どのように外因性 DSB 非存在下の S 期に ATM が活性化されるのか?、②活性化 ATM がどのようなシグナル経路で Cdt1 と p27 の分解制御に関与しているのか? を明らかにすることが本研究の目的である。

3. 研究の方法

大きく①ATM から Cdt1 (及び p27) 分解に至る新シグナル経路の解明、②DSB が存在しない染色体非ストレス時における ATM 活性化の分子機構解明、を目指した。①に関しては、既報告 pathway を考え併せることで説明出来る可能性もあるが、新たな経路を介している可能性もある。上流 (ATM) 側からの検討と、下流 (Cdt1 分解) 側からの検討に大きく分けられる。想定経路の物理的相互作用や遺伝的相互作用を検討していった。②に関しては、多コピー LacO あるいは TetO 配列を安定に保持する培養細胞に、配列特異的結合蛋白質 LacI あるいは TetR に融合させた解析対象蛋白質を発現させる事で、人工的にその領域のクロマチン構造を改変し、該当蛋白質の ATM 活性化制御での役割を解析するというアプローチをとった (以下参照)。

S 期の DSB を伴わない ATM 活性化機構として、複製活性化に伴うクロマチンの構造変換を想定している。これには、ヘテロクロマチンなどの複製困難部位と想定される場所でのフォーク進行停止と、その結果としての内因性 DSB 誘導を含む。そこで、それらを mimic する反応を細胞内の特定の部位に高レベルで惹起し、それを可視的に解析することを試みた。すなわち、多コピー LacO あるいは TetO 配列を安定に保持する培養細胞に、配列特異的結合蛋白質 LacI あるいは TetR に融合させた解析対象蛋白質 (複製開始制御因子 CDC6、Cdt1; 申請者が発見した Cdt1 結合性クロマチンリモデラー SNF2H; 複製フォークにおけるヒストン除去性シャペロン FACT; ヘテロクロマチン構成タンパク質 HP1 等) を発現させる事で、人工的にその領域のクロマチン構造を改変し、該当蛋白質の ATM 活性化制御での役割を解析するという、新しいアプローチを試みた (図 2)。

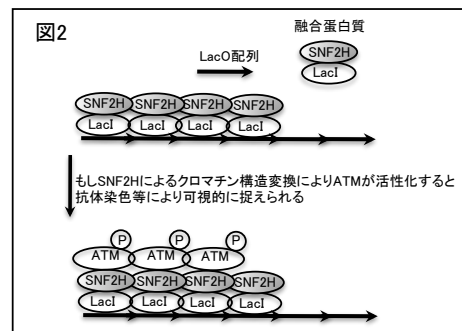


図2

#### 4. 研究成果

ATM キナーゼは、主に DNA 二重鎖切断部位 (DSB) で活性化し機能する。本研究において我々は、ATM が染色体非ストレス時 (DSB 非存在下) の S 期において、複製開始制御因子 Cdt1 の分解を制御していることを明らかにした。今までに得られた知見をまとめると、以下ようになる。①shRNA により ATM が抑制された細胞および AT 患者由来 ATM 欠損細胞においては、S 期における Cdt1 の適切な分解が阻害される。②この ATM による Cdt1 分解制御には ATM キナーゼ活性が必要である。③NBS1 抑制も Cdt1 分解を阻害するので、MRN 複合体もこの制御に必要であろう。また、④DSB 非存在下の S 期において、ATM が一定程度活性化されることを見いだした。すなわち、そのように活性化した ATM が Cdt1 分解を制御していると考えられる。

では、活性化 ATM はどのように Cdt1 分解を制御しているのでしょうか？これについて、以下の知見を得た。①ATM の抑制は、Cdt1 を分解制御しているユビキチンリガーゼの構成因子である Skp2 量を部分的に抑制した。②また、ATM の抑制は、部分的に Akt キナーゼの活性化を抑制した。③Akt 抑制、あるいは Skp2 抑制は、ATM 抑制と同じく Cdt1 分解を抑制した。④以前から、Akt キナーゼが Skp 機能を制御していることが報告されている。以上を総合すると、この新たな ATM 機能は、少なくとも部分的には ATM-Akt-Skp2 経路を介していると考えられる (図 3)。

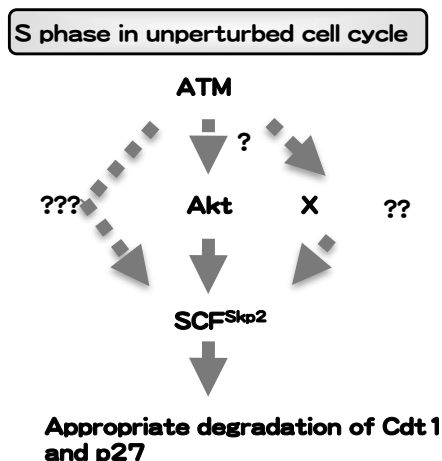


図3

この ATM による Cdt1 分解促進の生物学的意義を調べたところ、以下のことがわかった。まず、AT 患者由来 ATM 欠損細胞では、再複製の誘導を示す 4N 以上の DNA 含量を持つ細胞集団の割合が増加しており、これは ATM 遺伝子の再導入により是正されることが明らかとなった。加えて、CDC6 を過剰発現させたとき、コントロール細胞と比較して、shRNA により ATM が抑制さ

れた細胞では再複製誘導が増強されることが示された。以上の結果は、今回明らかとなった ATM の新規機能が、ゲノム安定性保持のために重要な役割を演じていることを示唆している。言い換えれば、以上の研究成果は、AT の病態 (ゲノム不安定性や易発がん性) の新規分子機構解明やその治療法開発に重要な示唆を与えることが期待される。

一方、DSB 非存在下の S 期における ATM 活性化機構については不明な点が多い。これにアプローチする一方法として、人工的染色体構造改変による ATM 活性化系の構築を試みた。まず、多コピー LacO 配列を保持するヒト HT1080 細胞を樹立し、併せて LacI 融合 Cdt1、SNF2H、CDC6 等の発現ベクターを構築し、解析を開始した。しかし、HT1080 細胞では LacO 配列が不安定であることがわかり、新たにラット Rat1 細胞を用いて LacO 配列安定保持細胞を樹立した。樹立細胞を用いて解析を進めた所、LacI-Cdt1 の LacO への集積により、クロマチンリモデラー SNF2H がリクルートされることが示唆された。併せて、既に樹立されていたヒト U2OS-LacO 細胞を入手し、平行して解析を行った。残念ながら現在までのところ、LacI-Cdt1 や LacI-SNF2H による ATM の活性化は観察されていない。また、U2OS 細胞ではそもそも LacI-Cdt1 による SNF2H のリクルートが観察されなかった。すなわち、この系では結果が細胞内環境に大きく影響されている可能性がある。このように現時点ではこの系を用いて ATM 活性化機構に関し明確な結果は得られていない。しかしながら、研究室で行っている他のクロマチン研究を含め、LacO-LacI システムを用いた人工的染色体構造改変実験系の確立は今後の研究に向けて大きな武器となっており、有用な実験系が確立できたと考えている。

#### 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 Iwahori, S., Kohmon, D., Kobayashi, J., Tani, Y., Yugawa, T., Komatsu, K., Kiyono, T., Sugimoto, N., and \*Fujita, M. (2014) ATM regulates Cdt1 stability during the unperturbed S phase to prevent re-replication. *Cell Cycle* 13, 471-481. (Selected for "News & Views") 査読あり doi: 10.4161/cc.27274

② Yugawa, T., Nishino, K., Ohno, S., Nakahara, T., Fujita, M., Goshima, N., Umezawa, A., and \*Kiyono, T. (2013) Non-canonical Notch signaling limits self-renewal of human epithelial and iPSC cells through ROCK activation. *Mol. Cell. Biol.* 33, 4434-4447. 査読あり

doi: 10.1128/MCB.00577-13

③ Nishimoto, N., Watanabe, M., Watanabe, S., Sugimoto, N., Yugawa, T., Ikura, T., Koiwai, O., Kiyono, T., and \***Fujita, M.** (2012) Heterocomplex formation by Arp4 and b-actin is involved in the integrity of the Brg1 chromatin remodeling complex. *J. Cell Sci.* 125, 3870-3882. (Selected for “ In This Issue” and “Cover Page” ) 査読あり  
doi: 10.1242/jcs.104349

④ Narisawa-Saito, M., Inagawa, Y., Yoshimatsu, Y., Haga, K., Tanaka, K., Egawa, N., Ohno, S., Ichikawa, H., Yugawa, T., **Fujita, M.** and \*Kiyono, T. (2012) A critical role of MYC for transformation of human cells by HPV16 E6E7 and oncogenic HRAS. *Carcinogenesis* 33, 910-917. 査読あり  
doi: 10.1093/carcin/bgs104

[学会発表] (計 2件)

① 榎谷 光熙, 吉田 和真, 向門 大介, 杉本 のぞみ, 藤田 雅俊. LacO-LacI システムを用いた複製開始制御因子 Cdt1 によるクロマチン構造制御機構の解析. 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014.11.26. パシフィコ横浜

② 向門 大介, 榎谷 光熙, 吉田 和真, 杉本 のぞみ, 藤田 雅俊. Analysis of the biological relevance of pre-RC formation at telomeres through the interaction between ORC and TRF2. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013.12.03. 神戸ポートアイランド

[その他]

ホームページ:

<http://tansaku.phar.kyushu-u.ac.jp/saito/top.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤田 雅俊 (FUJITA MASATOSHI)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号: 30270713