

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25340030

研究課題名(和文) DNA複製阻害を解除する損傷トレランス機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of DNA-damage-tolerance mechanisms that facilitate restart of stalled DNA replication

研究代表者

茂木 章 (MOTEGI, AKIRA)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80452332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：DNA損傷トレランスへの関与が示唆されているユビキチンリガーゼSHPRHの変異はDNA鎖間架橋損傷(ICLs)の主要な修復経路であるファンconi貧血(FA)経路の中心因子FANCCの変異によるシスプラチン(DNA架橋剤)感受性を大幅に回復させ、SHPRH依存の修復経路はFA経路と拮抗する可能性が示唆された。また、PARP-1はDSB末端のresectionを抑制すること、resectionの中心的ヌクレアーゼCtIPの低発現は乳がんの予後不良、PARP阻害剤の高感受性に相関することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)： In this study, we showed that simultaneous genetic disruption of the ubiquitin ligase SHPRH and FANCC, one of core factors in the Fanconi Anemia (FA) pathway, substantially rescued hypersensitivity towards cisplatin, an inter-strand cross-linking (ICL) agent. This observation suggests that SHPRH-dependent pathway antagonizes to the FA pathway. We also showed that PARP-1 prohibits resection in in vitro extract assay and that low expression of CtIP nuclease in breast cancer correlates with poor prognosis and hypersensitivity towards PARP inhibitors.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA損傷トレランス 複製後修復 組換え修復 ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

鋳型 DNA の様々な損傷は複製を阻害する。複製阻害を解除することはゲノム複製を完了するために必須であり、その仕組みを「損傷トランス機構」という。代表的損傷トランス機構である「損傷乗り越え合成経路 (translesion synthesis pathway; TLS 経路)」は、特殊な DNA ポリメラーゼによって損傷を乗り越えて DNA 合成を行う (図 1, 右上)。また、乗り越え合成が行えない損傷の場合は、DNA 鎖間架橋損傷の主要な修復経路であるファンコニ貧血経路 (Fanconi Anemia pathway; FA 経路) や姉妹染色分体新生鎖を鋳型とした相同組換え依存的修復経路 (Homology-Dependent Repair pathway; HDR 経路) によって複製が再開される (図 1, 左下)。

申請者は複製フォークの逆進行を伴う「鋳型鎖乗り換え経路 (template switch pathway; TS 経路)」が存在する可能性を示唆し、ユビキチンリガーゼ SHPRH がこの経路に関与すること報告した (図 1, 右下)。また、他のグループから TS 経路への関与が強く示唆されるヘリカーゼとして ZRANB3 が報告された (Weston *et al.*, *Genes Dev.*, **26**, 1558-1572, 2012)。しかし、これらの因子による TS 経路の詳細な分子機序や従来の修復経路との役割の違いはなお不明であった。

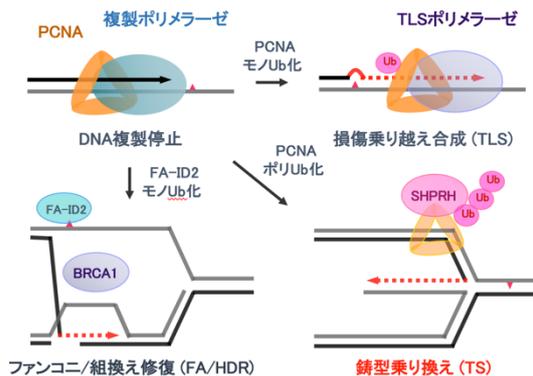


図1 DNA損傷トランスの仕組み

2. 研究の目的

そこで本研究ではニワトリ B 細胞株 DT40 を用いて、TS 経路で働くと考えられるユビキチンリガーゼ SHPRH と TS 経路への関与が強く示唆されるヘリカーゼ ZRANB3 の機能を解析することで TS 経路自体の機能を解明することを主目的とした。さらに SHPRH 及び

ZRANB3 と論理的に競合、重複して機能しうる TLS 経路、FA 経路、HDR 経路など既知経路の中心因子 RAD18, FANCC, RNF8, PARP-1 などとの機能相関を解析することにより、細胞のゲノム維持機構全体における TS 経路の機能の位置付け、TS 経路に直接的にまたは間接的に関与しうる因子の機能解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ユビキチンリガーゼ SHPRH と TLS 経路で中心的に働くユビキチンリガーゼである RAD18 との二重変異株 (SHPRH/RAD18)、及び SHPRH と FA 経路の中心因子 FANCC との二重欠損株 (SHPRH/FANCC) を作製し、表現型の比較解析を行った。

(2) TS 経路に関与する可能性のある新規ヘリカーゼ ZRANB3 の単独変異株を作成し、主要な DNA 損傷剤に対する感受性を解析した。また、SHPRH と ZRANB3 の遺伝的関係を解析するために SHPRH/ZRANB3 二重変異株を作製した。

(3) TLS 経路及び HDR 経路を促進するユビキチンリガーゼ RAD18 と HDR 経路を促進するユビキチンリガーゼ RNF8 の機能相関を検討するために RAD18/RNF8 二重変異株を作成・解析した。

(4) ポリ (ADP-リボシル) 化 (PAR 化) 酵素 PARP-1 は DNA DSB 末端に結合し、DNA に結合するヒストンや PARP-1 自身を PAR 化することで DNA 鎖切断修復を促進すると考えられている。連携研究者である長崎大学大学院・医歯薬総合研究科の益谷美都子博士らは、ヒト及びマウス細胞抽出液に直鎖状 DNA を基質として加えて DNA 末端の変化を観察できる *in vitro* アッセイ系を確立しており、このアッセイ系を用いて PARP-1 の DNA DSB 末端に対する作用を検討した。

(5) 家族性乳がんの原因遺伝子 BRCA1/BRCA2 に欠損のあるがんは PARP 阻害剤に対して感受性が高いことが知られているが、その作用機序はなお不明である。BRCA1/BRCA2 の作用点の一つは DSB 末端の resection を促進することであるので、resection の中心的ヌクレアーゼ CtIP の発現レベルが PARP 阻害剤の腫瘍抑制効果に相関するかをヒトの公開データベース解析及びマウスの xenograft モデルを用いて検討した。

(6) TLS を実行する損傷乗り越え型 DNA ポリメラーゼ η (イータ), ζ (ゼータ), κ (カッパ) の三重変異株を作製した (3TLS 変異株)。また、TLS 経路と TS 経路の関係を検討するために 3TLS 変異株にさらに SHPRH 変異を加えた四重変異株を作成した。

4. 研究成果

(1) SHPRH 変異株の解析

① SHPRH/RAD18 二重変異株の OVA 遺伝子座のターゲット効率を測定した結果 83.3% (44/50) であった。これは RAD18 単独変異株の 35.1% (39/111) に比べ高い (表 1)。また、FANCC 単独変異株の OVA 遺伝子座ターゲット効率は 0% (0/35) で標的組み換えが完全に欠失するのに対して、SHPRH/FANCC 二重変異株は 30.8% (4/13) と回復した (表 1)。これらのことから、SHPRH 依存経路は標的組換えに対して抑制的に働くと考えられる。

表 1. Targeted integration frequencies in wild-type and mutant cells.

Primary genotype	locus	SHPRH ^{+/+}	SHPRH ^{-/-}	References
Wild type	OVA	92.3% (24/26)	90.6% (29/32)	2010 PLoS Genet. Nakamura <i>et al.</i>
RAD18 ^{-/-}	OVA	35.1% (39/111)	83.3% (30/36)	2002 EMBO J. Yamashita <i>et al.</i>
FANCC ^{-/-}	OVA	0% (0/35)	30.8% (4/13)	2005 EMBO J. Hirano <i>et al.</i>

Gene-targeting frequencies were measured by Southern blot analysis of *Ovalbumin* (OVA) locus.

② FANCC 単独変異株と SHPRH/FANCC 二重変異株は DNA 二重鎖切断 (double-strand breaks; DSBs) を起す γ 線に対して同程度の軽微な感受性亢進を示した。それに対して、SHPRH/FANCC 二重変異株は FANCC 単独変異株に比べてシスプラチン (ICL 損傷を誘導する抗がん剤) に対する感受性が大幅に減少した (図 2)。これらのことから SHPRH 依存経路は、 γ 線による DNA 二重鎖切断の修復には関与しないが、シスプラチンに代表される ICL 損傷の損傷トレランスにおいては、FA 経路と拮抗する機能を有すると考えられる。

(2) ZRANB3 単独変異株の作成と解析

ZRANB3 単独変異株を作成した。ZRANB3 変異株は γ 線、シスプラチン、トポイソメラーゼ I 阻害剤カンプトテシン、トポイソメラーゼ II 阻害剤エトポシドに対して有為な感受性増強を認めなかった。ZRANB3 変異株の OVA 遺伝子座のターゲット効率は 93.3% (28/30) と野生株とほぼ同等であった。FANCC 変異による ICL 損傷高感受性を ZRANB3 変異が回復するかを検討するために、ZRANB3/FANCC 二重変異株の作成を試みたが、変異株は得られなかった (0/36)。これらの結果から、ZRANB3

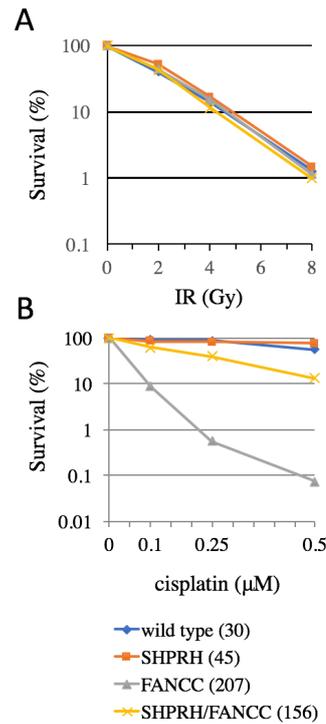


図2 SHPRH/FANCC二重変異株の γ 線及びシスプラチン感受性

ヘリカーゼの欠損は SHPRH と同様に単独欠損では各種 DNA 損傷に対して細胞の生存性に影響が現れず、他の修復経路のバックアップとして機能している可能性が考えられた。

(3) RAD18/RNF8 二重変異株の表現型解析

RNF8 単独変異株は、 γ 線、トポイソメラーゼ I 阻害剤カンプトテシン、トポイソメラーゼ II 阻害剤 ICRF-193、PARP 阻害剤オラパリブに対して、RAD18 単独変異株とほぼ同程度の感受性を示した。また、RAD18/RNF8 二重変異株も、RNF8 単独及び RAD18 単独変異株とほぼ同程度の感受性を示した (図 3)。これらのことは RNF8 と RAD18 は、主要な DNA 損傷に対して同一経路上で機能する可能性を示唆した (文献 3)。

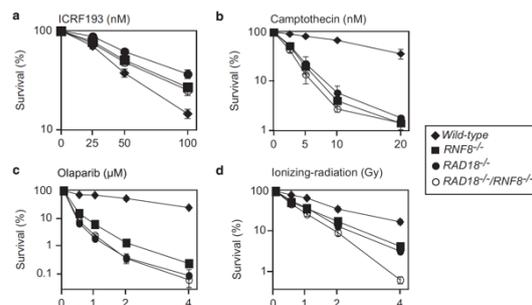


図3 RNF8/RAD18 二重変異株の各種 DNA 損傷に対する感受性

(4) PARP-1 の DSB 末端に対する *in vitro* 作用の解析

マウス野生型及び *PARP-1* 欠損細胞株抽出液に直鎖状 DNA を基質として加えて DNA 末端の経時変化を観察したところ、*PARP-1* 欠損細胞抽出液を作用させた DNA は顕著なプロセッシングを受けることが明らかになった(図 4)。

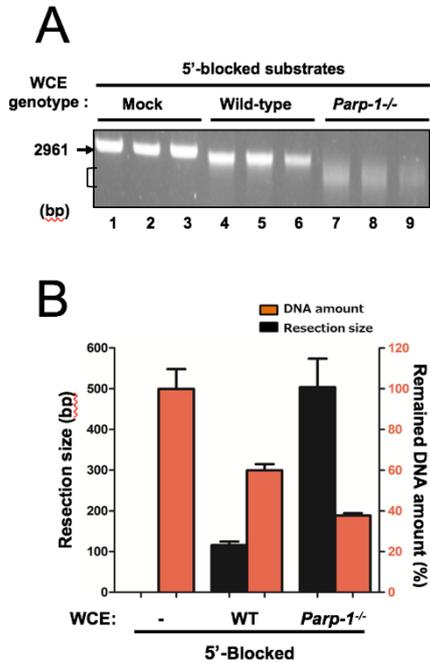


図4 PARP-1は直鎖状DNAのプロセッシングを抑制する。

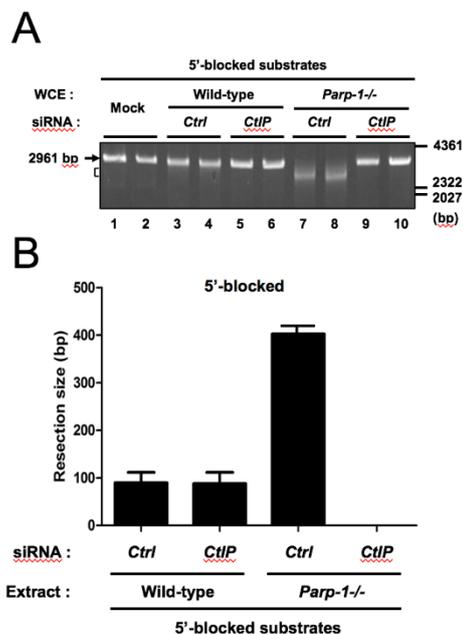


図5 PARP-1欠損による直鎖状DNAのプロセッシングはCtIPヌクレアーゼによるresectionである。

DNA DSBs は CtIP ヌクレアーゼによって resection と呼ばれるプロセッシングを受けることが知られている。この現象が CtIP に依存するか否かを検討するために、同様の実験を siRNA による CtIP の発現抑制の元で行った。その結果、*PARP-1* 欠損細胞における DNA プロセッシングは顕著に抑制された。これらのことから PARP-1 は DNA DSB 末端に結合して DSBs の resection を抑制することが明らかになった(図 5)。

(5) 乳がんにおけるヌクレアーゼ CtIP の発現レベルと生命予後の相関をマイクロアレイデータベースを用いて解析した。その結果、CtIP の発現レベルが低いほど生命予後が低いことが明らかになった(図 6)。

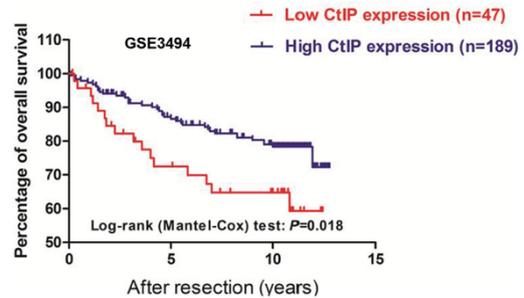


図6 乳がんにおけるCtIPの発現レベルと生命予後との相関

また、CtIP 低発現がんは *BRCA1/BRCA2* 変異がんと同様に PARP 阻害剤がより有効であるか否かを検討するために、野生株及び CtIP 発現抑制 MCF-7 乳がん細胞株をマウスに異種移植し、PARP 阻害剤オラパリブ投与の有無での腫瘍の増大を比較した。

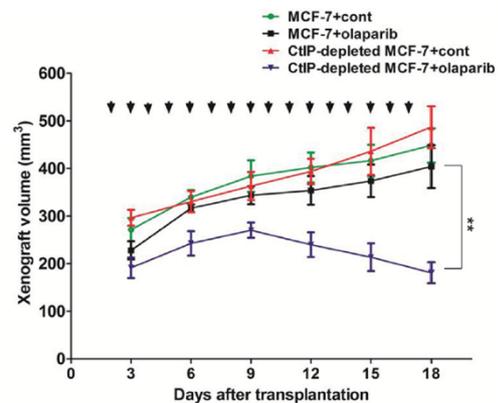


図7 CtIP 低発現がん細胞株は PARP 阻害剤に感受性が高い。

その結果、CtIP 発現抑制株では、オラパリ

ブ投与によって顕著に腫瘍増大が抑制された(図7)。これらのことから、CtIPはBRCA1/BRCA2変異と同様に乳がんのPARP阻害剤の有効性を示すマーカーとして有用である可能性が示唆された。

(6) 3TLS変異株は想定通りγ線やシスプラチンに対して軽微な感受性しか示さなかった。このことは損傷乗り越え経路がDSBsやICLsの修復に必須ではないことを示唆する。また、SHPRH/3TLS四重変異株を作成したが、相対的優先順位を下げたため十分な機能解析には至っていない。

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. Junhui Wang, Qianshan Ding, Hiroaki Fujimori, Akira Motegi, Yoshio Miki, and Mitsuko Masutani
Loss of CtIP disturbs homologous recombination repair and sensitizes breast cancer cells to PARP inhibitors
Oncotarget **7**(7):7701-7714 (2016), 10.18632/oncotarget.6715 査読有
2. Michael Schmid, ... Akira Motegi, ... Huaijun Zhou (全106名中63番目)
Third report on chicken genes and chromosome 2015
Cytogenet. Genome Res. **145**:78-179 (2015), 10.1159/000430927 査読無
3. Shunsuke Kobayashi, Yohei Kasaishi, Shinichiro Nakada, Tokiyo Takagi, Saho Era, Akira Motegi, Roland K. Chiu, Shunichi Takeda, and Kouji Hirota
Rad18 and Rnf8 facilitate homologous recombination by two distinct mechanisms, promoting Rad51 focus formation and suppressing the toxic effect of nonhomologous end-joining
Oncogene **34**:4403-4411 (2015),

10.1038/onc.2014.371 査読有

4. Akira Motegi and Minoru Takata
Multiple genetic manipulations of DT40 cell line
Methods in Mol. Biol. **1114**:25-35 (2014), 10.1007/978-1-62703-761-7_3 査読無

[学会発表] (計3件)

1. Akira Motegi, Junhui Wang, Hiroaki Fujimori, Yoshio Miki, and Mitsuko Masutani
CtIP is a novel biomarker for predicting the sensitivity of breast cancers to PARP inhibitors
The 2nd RBC-CEA Joint Workshop
2016年4月11-12日 京都大学(京都市)
2. Akira Motegi, Junhui Wang, Hiroaki Fujimori, Yoshio Miki, and Mitsuko Masutani
PARP-1 and PARG promote genomic integrity by regulating resection of DNA double-strand breaks
第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会合同大会
2015年12月1-4日 神戸ポートアイランド(神戸市)
3. Junhui Wang, Akira Motegi, Hiroaki Fujimori, Yoshio Miki, and Mitsuko Masutani
PARP-1 and PARG regulate 53BP1 to control DNA end resection
第74回日本癌学会学術総会
2015年10月8-10日 名古屋国際会議場(名古屋市)

[その他]

<https://kyouindb.iimc.kyoto-u.ac.jp/j/mI6jZ>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

茂木 章 (MOTEGI, AKIRA)

京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：80452332

(2)研究分担者 該当なし

(3)連携研究者

益谷美都子 (MASUTANI, MITSUKO)
長崎大学・大学院医歯薬総合研究科・教授
研究者番号：60238904

(4)研究協力者 該当なし