

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871242

研究課題名(和文) 活性酸素により活性化するATMキナーゼのシグナル伝達経路の解明

研究課題名(英文) Phospho-signaling pathway dependent on an ATM kinase activated by oxidative stress

研究代表者

橋口 一成 (Hashiguchi, Kazunari)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研究部・特任研究員

研究者番号：80400414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ATMタンパク質はDNA損傷や活性酸素に反応して活性化するリン酸化酵素(キナーゼ)の一つであるとされているが、DNA損傷反応と活性酸素反応でのATM下流シグナルの差異については明らかにされていない。そこでこれらを明らかにするために、まずは抗体を用いたATM特異的な基質の検出を行った。その結果、活性酸素反応時のみに観られるATM基質の検出に成功した。以上の成果から、DNA損傷反応時と活性酸素反応時でのATM活性化経路が異なることが明白となった。今後はリン酸化プロテオーム解析を行うことで、ATMキナーゼが関与するシグナル経路が明らかになることが大いに期待できる。

研究成果の概要(英文)：Although an ATM has been supposed to be a kinase that is activated by DNA damage response, recent work revealed that it is also activated by oxidative stress through distinct regulation. In this study, I attempt to figure out ATM-dependent phospho-signaling pathway in these two activation systems. For detection of substrates phosphorylated by ATM, several anti-phospho ATM substrate antibodies are used in Western blot analyses. After giving two kinds of cellular stresses, wild-type cells show different substrate pattern even if ATM-deficient cells has same, indicating that detected substrates are specific to ATM and different cellular signals give different substrates which are in ATM-dependent pathway. Further analysis, such as phospho-proteome analysis of ATM substrates, will give valuable information in phospho-signaling pathways response to various cellular stresses.

研究分野：分子生物学

キーワード：ATM キナーゼ リン酸化 シグナル伝達 活性酸素 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞内には多くの種類の活性酸素を感知し、それに応答するタンパク質が存在する。このような細胞ストレス応答タンパク質の一部は、リン酸化シグナルカスケードにより下流へのシグナル伝達を行い、ストレス防御タンパク質や細胞死誘導タンパク質などの遺伝子発現を巧妙に制御している。

(2) DNA 損傷の一種である DNA 二本鎖切断に応答して活性化されるリン酸化酵素の一つである ATM キナーゼが、DNA 損傷非依存的に活性酸素によっても活性化することが 2010 年に Guo らによって明らかにされ、その機能が注目を集めている (Guo ら、Science、2010)。

(3) 組換え ATM 精製タンパク質を用いた実験から、過酸化水素 (活性酸素) 処理によって 2991 番目のシステイン残基でジスルフィド結合による共有結合二量体を形成し、構造変換することで活性化することがわかった。ATM 遺伝子は毛細血管拡張性運動失調症の責任遺伝子であり、小脳性の運動失調、皮膚の毛細血管拡張、高頻度の悪性腫瘍発生などの病態が呈されるが、その一因は 400 種にもものぼる変異パターンから及ぼされる ATM 活性化応答の違いが考えられる (Guo ら、Cell Cycle、2010)。

(3) DNA 損傷応答依存的及び活性酸素依存的の両者の活性型 ATM とも、1981 番目のセリン残基が自己リン酸化によりリン酸化するが、単量体もしくは共有結合二量体という構造の違いが、基質ポケットの構造を巧妙に調節している可能性が高い。DNA 損傷応答経路では、p53、Chk2、ヒストン H2AX、Kap1 などがリン酸化を受けることが知られており、シグナル伝達経路についても、多数の先行研究によりその全貌がほぼ明らかにされている。一方、活性酸素応答経路では、ヒストン H2AX や Kap1 のリン酸化は認められないことが示され、少なくともこれらことから DNA 損傷応答経路とは異なるシグナル伝達経路が存在することが示唆されている (Guo ら、Science、2010)。

(4) このように 2 種の活性型 ATM の基質の違いが異なる細胞応答の提示に起因することは明白であるが、基質を含め、活性酸素応答リン酸化 ATM の下流シグナルについてはほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

活性酸素依存的 (DNA 損傷非依存的) に活性化される ATM のシグナル伝達経路をプロテオーム解析により明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 正常型及び活性酸素依存的活性化がで

きない変異型 ATM 発現ヒト細胞株の構築を行う。またドミナント・ネガティブとして FLAG 融合変異型 ATM タンパク質を高発現するヒト細胞株の樹立を行う。

(2) ATM によってリン酸化される基質のモチーフに対する抗体を用いて、リン酸化基質の検出を行う。

(3) これらの細胞株を用いて超高感度質量分析装置を用いた全タンパク質・リン酸化・細胞内局在に対するショットガンプロテオーム解析、及び活性酸素依存的な活性型 ATM 相互作用タンパク質の同定を行う。

(4) これらプロテオミクスから得られる情報から候補因子を選定し、個別の機能解析実験を行った上で、既知の活性酸素応答シグナル経路との統合パスイ解析を行い、活性酸素依存的 ATM 活性化経路のマッピングを行う。

4. 研究成果

(1) 本研究において必要な FLAG タグ融合 ATM タンパク質過剰発現細胞株の樹立を行った。その結果、本研究で用いた発現系では、FLAG 融合 ATM タンパク質の発現量は内在性 ATM タンパク質のそれよりも非常に低く、過剰発現株の樹立に至らなかった。その理由として、ATM タンパク質の分子量が 350 kDa と非常に大きいこと、ATM タンパク質の不安定性などが挙げられる。この点に関しては、さらに多くの試行で過剰発現株の単離を行う、もしくは他の強力な発現プロモーターの利用を考える必要がある。

(2) 従来のプロテオーム解析技術を改良すべく、飛躍的に高感度に全プロテオーム及びリン酸化プロテオーム解析を実現可能としたサンプル調製法を確立した。具体的には高 pH 緩衝液を用いた逆相クロマトグラフィーによるトリプシン消化物の分画法の開発である。従来の手法であると、数十 mg のトリプシン消化物が必要であり、これを強陽イオン交換体 (SCX) カラムで 30 画分程度に分画した後、各々の分画をさらに個別に脱塩処理する必要があった。しかし本法では必要なトリプシン消化物が 1/10 程度に抑えられ、且つカラムクロマトグラフィー後に個々の分画を凍結乾燥するだけで脱塩処理を行う必要が無い。これらことからサンプルのロスと操作の簡略化が実現可能となった。またタンパク質やリン酸化部位の同定数においても、約 24 時間の質量測定において、全プロテオーム解析では 7,000 タンパク質以上、リン酸化プロテオーム解析では 25,000 リン酸化部位の同定に成功している。

(3) shRNA を恒常的に発現する ATM タンパク質発現抑制株を用いた結果、約 70% の ATM タンパク質の発現抑制が確認できた。しかし内

在性 ATM タンパク質を完全に排除したことなくならず、少量発現されている ATM タンパク質による基質リン酸化の影響が観られたため、遺伝子破壊株の作成が必須となった。

(4) そこで遺伝子破壊細胞株樹立のために、CRISPR 技術の中でも最もオフ・ターゲット効果が低い FokI スクレアーゼを用いた CRISPR-RFN 法を採択し、ヒト培養細胞株 U-2 OS から ATM 欠損細胞株の単離に成功した。本法で作成した ATM 遺伝子欠損細胞株を用いた結果、期待された通り、遺伝子発現抑制株よりもさらに明確な以下に示す結果 (図 1) が得られた。

(4) ATM キナーゼの基質のリン酸化の検出は、ATM リン酸化モチーフに対する二種のモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット解析により行った (Actin はローディングコントロールである)。DNA 損傷応答を誘発する処理である 0.01 mg/mL ブレオマイシン処理では、ATM (phos-ATM S1981、自己リン酸化)、Chk2 (phos-Chk2 T68、ATM 基質) 及び H2AX (γ H2AX、DNA 二本鎖切断マーカー) のリン酸化が、活性酸素応答を誘発する 0.25 mM 過酸化水素処理では ATM 及び Chk2 のみのリン酸化が期待された通りに観られた。

(5) これらの条件下で、ATM 基質リン酸化の検出を、二種のモチーフ抗体 (S*Q モチーフ及び S*/T*QG モチーフ) を用いたウエスタンブロット解析により行った。これまでに知られている ATM 基質のリン酸化部位は、SQ もしくは TQ モチーフの S もしくは T がリン酸化されることが知られている。過酸化水素処理ではブレオマイシン処理と比較して、有意に少ない ATM 基質のリン酸化が検出され、さらに過酸化水素処理時のみに観られる ATM 基質 (図 1 中の赤矢印で示されたバンド) の検出に成功した。またこれらの ATM 基質のリン酸化は、遺伝子破壊細胞株を用いることで ATM 特異的なものであることが確認された。

(5) 以上の成果から、DNA 損傷応答時と活性酸素応答時での ATM 活性化経路が異なることが明白となった。今後は、本研究で樹立した遺伝子破壊株を用いたリン酸化プロテオーム解析を通して、各リン酸化部位の質的・量的変動を網羅的に解析すること、さらに全プロテオーム解析により、遺伝子発現変動を網羅的に観ることで、ATM キナーゼが関与するシグナル経路が明らかになりうる。また本法は、他のシグナル経路解明の基盤技術となることが大きく期待でき、個々のシグナル経路の解析結果をクロストークさせ統計学的解析を行うことで、複雑な細胞内ストレス応答機構やリン酸化シグナルカスケードの全体像が体系的に明らかになっていくことが期待できる。

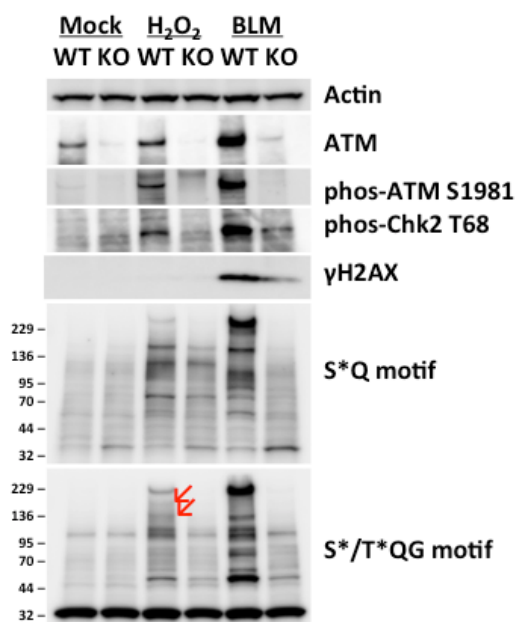


図 1. ウエスタンブロット解析。ヒト培養細胞 U-2 OS の野生株 (WT) 及び ATM 遺伝子破壊株 (KO) の全細胞抽出液を泳動、転写した後、各抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。Mock は未処理、H2O2 は過酸化水素処理、BLM はブレオマイシン処理を施した細胞の抽出液である。Actin はローディングコントロール。ATM は遺伝子破壊株でバンドが消失していることがわかる。phos-ATM と phos-Chk2 はストレス依存的にリン酸化されていることがわかる。 γ H2AX はブレオマイシン処理のみでシグナルが検出されている。二種の ATM 基質のリン酸化モチーフに対する抗体では、分子量から同一のものも同定されているが、片方の抗体のみで検出されているものもある。赤矢印は遺伝子破壊株で観られず、且つ過酸化水素処理でのみ観られるシグナルであり、これらが活性酸素特異的な ATM による基質のリン酸化と言える。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 1 件)

橋口一成、村岡賢、足立淳、佐藤三佐子、久家貴寿、渡部亮介、白水崇、橋本裕希、長野麻衣子、岸田真里菜、朝長毅: Quantitative Phosphoproteome Analysis of Cultured Stomach Cancer Cell Lines Aimed at Development of Biomarkers for Prediction of Drug Efficacy (薬効評価のためのバイオマーカー探索技術基盤の確立を目指した胃癌培養細胞株の定量的リン酸化プロテオーム解析): 第 12 回国際ヒトプロテオーム学会: 2013 年 9 月 14-18 日 (横浜)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋口 一成 (HASHIGUCHI, Kazunari)

独立行政法人医薬基盤研究所・創薬基盤研
究部・特任研究員

研究者番号：80400414