

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 8 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830085

研究課題名(和文)新規ミスマッチ依存アポトーシス制御因子の同定による発がん抑制機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of tumor suppression mechanism through identification of novel proteins involved in mismatch repair-dependent apoptosis

研究代表者

藤兼 亮輔 (Fujikane, Ryosuke)

福岡歯科大学・口腔歯学部・講師

研究者番号：20581713

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)：アルキル化剤に起因するO6メチルグアニン(O6meG)はDNA複製においてCと同程度の割合でTと対合してO6meG/T誤対合を形成する。この誤対合はミスマッチ修復(MMR)因子により認識され、チェックポイントの活性化とアポトーシスによって細胞ごと取り除かれるが、詳細な分子機構には不明な点が多い。本研究ではアポトーシス誘導過程の詳細を明らかにするため、MMR複合体と協調して働く因子を精製し、新規因子の同定を試みた。その結果、新規アポトーシス因子として3つの遺伝子を同定することに成功した。この結果は発がん抑制のメカニズムや新規抗がん剤の開発のヒントになると考えられる。

研究成果の概要(英文)：O6-methylguanine (O6meG) can form O6meG/T mispair during DNA replication. The mismatch repair (MMR) complex recognizes this mispair and activates cell cycle checkpoint followed by apoptosis induction. The precise molecular mechanism of this apoptotic pathway is still unclear. In order to unveil molecular mechanism of the apoptotic pathway, we tried to purify proteins which can function or associate with MMR complex. We successfully identified three MMR-associated proteins as new apoptosis-related factors. Analyses of these factors will shed light on understanding of molecular mechanism of tumor suppression and developing new anti-cancer drugs.

研究分野：分子生物学

キーワード：ミスマッチ修復 アポトーシス アルキル化剤

1. 研究開始当初の背景

ミスマッチ修復(MMR)機構はDNA複製の際にDNAポリメラーゼによって誤って取り込まれた塩基を取り除く機構である。それと同時に、誤塩基対合からのアポトーシス誘導も重要な機能の一つである。そのため、MMR遺伝子はがん抑制遺伝子であり、MMR欠損の患者はそのほとんどが60歳までに大腸がんに、また、他のがんにも高い頻度で罹患する。したがって、家族性大腸がんの原因遺伝子となる。このようにMMR機構は変異の蓄積と異常細胞の除去を担い、発がん抑制において重要な役割を果たしている。

DNAアルキル化損傷のうち、O⁶メチルグアニン(O⁶meG)はシトシンと同程度の割合でチミンと対合するため変異原性が高い。このようなO⁶meG/T誤対合はミスマッチ修復複合体によって認識されチェックポイント活性化に伴う細胞周期の停止とそれに続くアポトーシスが引き起こされる。このためO⁶meGは細胞毒性が高く増殖する細胞を効率良く殺す。この原理を利用してアルキル化剤は広く抗がん剤として利用されている。とりわけ神経膠芽腫の患者に対してはアルキル化剤temozolomideが化学療法の主軸となっており、脳腫瘍の効果的な治療と再発防止の観点からこのアポトーシス経路の理解は重要である。アルキル化剤によって誘導されるMMR依存のアポトーシスの経路はS期のDNA複製に依存しており、チェックポイント活性化、アポトーシス誘導は2度のS期を経て起こる。しかしながら、このアポトーシス発動が、なぜDNA複製に依存するのか、どのようにしてアポトーシス経路を活性化されるのかその詳細な分子機構には不明な点が多い。

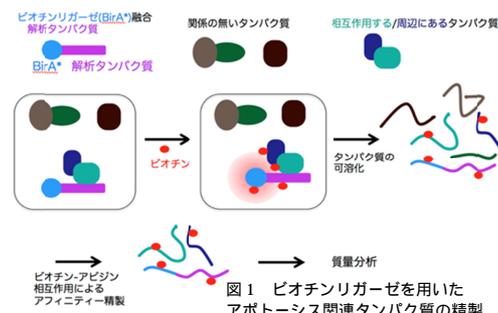
2. 研究の目的

アルキル化剤によって誘導されるMMR依存のアポトーシス発動の分子機構を明らか

にすることは、生物が備えた発がん抑制の機構を理解することと共に脳腫瘍の治療や再発防止の観点からも非常に重要である。本研究ではアポトーシス発動の初期過程に注目し、O⁶meG/T誤対合に形成されるMMR複合体と相互作用、もしくは近傍で働くタンパク質を網羅的に同定することで、MMR複合体から始まるアポトーシス誘導過程の分子機構を明らかにし、細胞がどのようにしてアポトーシスを誘導するのか、なぜ、O⁶meG/T誤対合を修復せずにアポトーシスを積極的に選択するのかを明らかにする。この研究によって同定される新規アポトーシス関連因子はがん抑制遺伝子となる可能性があり、また、新規因子をターゲットとした新たな抗がん剤の開発につながる可能性を秘めている。

3. 研究の方法

MMRタンパク質と相互作用するタンパク質と近傍で働くタンパク質の同定にはRouxらの方法(J Cell Biol (2012) Vol. 196, p801)を応用して行った(図1)。



大腸菌ビオチンリガーゼBirAのR118G変異体は周辺に存在するタンパク質のリジン残基に非特異的にビオチンを付加する。このBirA変異体とO⁶-mG/T誤対合と結合するMMR因子の融合タンパク質を細胞内で発現させると、MMR因子と一過的にでも相互作用したタンパク質、さらに、近傍で働いているタンパク質はMMR因子に融合したBirAによってビオチン化される。ビオチン化されたタンパク質は、可溶化された多くのタンパク質の中からビオチンとストレプトアビジ

ンの強力な相互作用を利用して特異的に精製することができる。この精製したビオチン化タンパク質を質量分析に供することで、O⁶-mG/T 誤対合の上に形成されるタンパク質複合体と、さらに、直接相互作用せずに周辺で働く関連タンパク質複合体も同定できる。細胞をアルキル化処理したものとしていないもの、もしくは O⁶-mG/T 誤対合をもつ DNA を導入したものとしていないものから上記の方法でタンパク質を精製、質量分析して比較し、O⁶-mG/T 誤対合から始まるアポトーシスに関わる因子を同定した。

同定した新規因子の解析には siRNA を用いた遺伝子ノックダウン条件下で、アルキル化剤 MNU に対する感受性をコロニー形成能の測定によって評価した。

4. 研究成果

(1) BirA 融合 MMR タンパク質発現細胞株の作製

MMR 因子である MSH2、MSH6、MLH1、PMS2 のそれぞれ N 末端または C 末端に BirA を融合したタンパク質の発現ベクターを作製し、ヒト子宮頸がん細胞 HeLa MR で発現させた。分子の挙動を解析した結果、MSH2 と MSH6 の BirA 融合タンパク質は細胞内局在に異常があるために研究に用いることができなかったが、MLH1 に融合したもの(BirA-MLH1)はアルキル化剤に反応して核内に移行し、O⁶-mG/T 誤対合に結合していると示唆された。BirA-MLH1 と内在性の野生型 MLH1 との競合を避けるため、HeLa MR 株の MLH1 遺伝子を CRISPR/Cas9 法を用いてノックアウトし、MLH1 ノックアウト株で BirA-MLH1 を安定に発現する細胞株を作製

した(図2)。

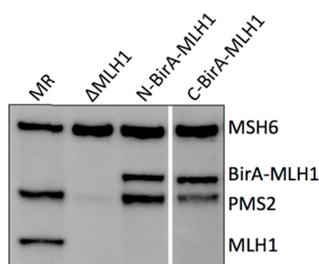


図2 BirA 融合 MLH1 発現株の作製例 特異的抗体を用いたウエスタンブロットにて MMR 因子の発現を調べた。

MLH1 ノックアウト株で発現した BirA-MLH1 はアルキル化損傷に反応して核内に移行し、DNA 損傷チェックポイントを活性化することができた(図3)。

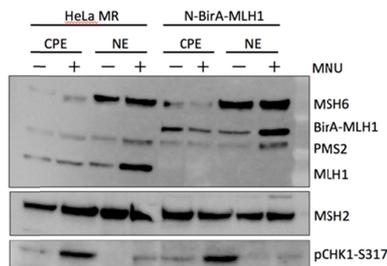


図3 MLH1 ノックアウト株で発現した BirA 融合 MLH1 の核移行と DNA 損傷応答をアルキル化剤処理後の細胞分画とウエスタンブロット法にて解析した。

MLH1 ノックアウト細胞における BirA-MLH1 発現は MLH1 の機能を相補したことから BirA-MLH1 は細胞内で機能的な複合体を形成しアポトーシスを誘導する能力があることが示された(図4)。

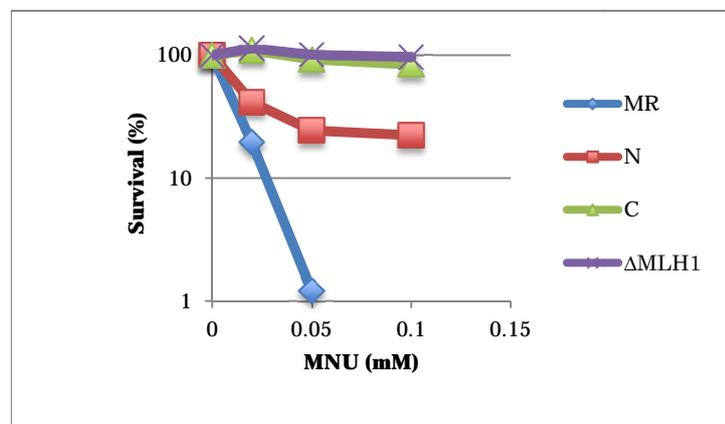


図4 BirA 融合 MLH1 発現株のアルキル化剤感受性テスト BirA-MLH1 発現は MLH1 ノックアウト細胞のアポトーシス誘導能を回復した。

(2) BioID 法による新規アポトーシス関連因子の精製及び質量分析による同定

上記で作製した BirA-MLH1 発現株をアルキル化処理し、ビオチン存在下で 24 時間または 48 時間培養して MMR 複合体とその周辺因子のビオチン標識を行った。細胞回収後、核を単離してタンパク質を可溶化、ストレプトアビジン磁気ビーズを用いてビオチン化タンパク質の精製を行った。飽和ビオチン/SDS 溶液で溶出したタンパク質は SDS-PAGE に供して分離し、銀染色にてタンパク質の可視化を行った。その結果、BirA-MLH1 発現とアル

キル化損傷に依存したタンパク質を多数観察することに成功した(図5)。

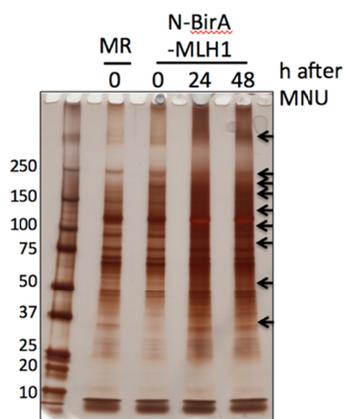


図5 MLH1をベイトとしたBioID法による新規アポトーシス関連因子の精製アルキル化剤(MNU)処理後24、48hのサンプルで損傷特異的なバンド(矢印)が検出され、これらは質量分析で同定された。

これらのタンパク質はLC-MS/MS分析によって解析した。その結果、数十種類に及ぶ候補タンパク質を同定した。

(3) 新規アポトーシス関連因子の解析

質量分析によって同定したタンパク質をコードする遺伝子を幾つか選択し、siRNAを用いて遺伝子ノックダウンを行いその表現型を解析した(図6)。

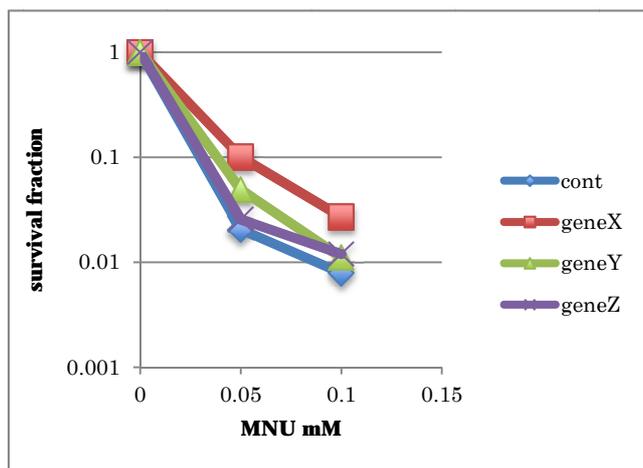


図6 新規アポトーシス関連因子遺伝子ノックダウン株のアルキル化剤感受性テスト geneX~Z のノックダウンによりアポトーシスが抑制され、アルキル化剤に対して耐性を示した。

幾つかの候補遺伝子でアポトーシス誘導の抑制が観察され、これらの遺伝子がアルキル化損傷に応答したアポトーシス誘導に関与することが示された。

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 1件)

Fujikane, R, Komori, K, Sekiguchi, M, Hidaka, M. Function of high-mobility group A proteins in the DNA damage signaling for the induction of apoptosis. Sci Rep 2016;6(0):31714.

[学会発表](計 3件)

藤兼亮輔, 関口睦夫, 日高真純. O6メチルグアニンにより引き起こされるミスマッチ修復依存のアポトーシス誘導に関わる新規因子の同定. 1P-0638 第38回日本分子生物学会年会, 平成27年12月1日-4日(神戸国際会議場)

藤兼亮輔, 武石幸容, 関口睦夫, 日高真純. ミスマッチ修復タンパク質依存のアポトーシス誘導におけるHMGAファミリータンパク質の機能. P-1013 第75回日本癌学会学術総会, 平成28年10月6日-8日.(横浜)

藤兼亮輔, 関口睦夫, 日高真純. アルキル化剤によって引き起こされるアポトーシスに関わる新規因子の同定と解析. P-347 第23回日本歯科医学会総会, 平成28年10月21日-23日.(福岡)

[その他]

ホームページ等

<http://www.fdcnet.ac.jp/col/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤兼 亮輔 (FUJIKANE, Ryosuke)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号: 20581713