

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06826

研究課題名(和文) DNA複製異常とゲノム不安定性におけるY-familyポリメラーゼの作用

研究課題名(英文) The role of Y-family polymerase in aberrant DNA replication and genomic instability

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん遺伝子の活性化が引き起こすDNA複製ストレス(RS)への耐性が腫瘍細胞の増殖に必要な。今回、私たちはがん遺伝子Myc活性化細胞において、RSへの耐性に損傷乗り越えポリメラーゼPol $\delta$ が重要な役割を果たすことを見出した。また、Pol $\delta$ が作用しない時にはMUS81-EME2というDNA切断酵素がRSへの耐性に関与することを見出した。したがって、これら分子の機能を阻害することは新しい治療開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Growth of neoplastic cells relies on their tolerance to oncogene-induced replication stress (RS). Translesion synthesis (TLS) plays a critical role in cellular tolerance to various types of RS by employing specialized polymerases. Here, we report that Pol $\delta$ , a Y-family TLS polymerase, promotes cellular tolerance to Myc-induced RS. Pol $\delta$  was recruited to Myc-induced RS sites, and Pol $\delta$  depletion enhanced the Myc-induced slowing and stalling of replication forks and the subsequent generation of double-strand breaks (DSBs). In the absence of Pol $\delta$ , Myc-induced DSB formation depended on MUS81-EME2 (the S-phase specific endonuclease complex), and concomitant depletion of MUS81-EME2 and Pol $\delta$  enhanced RS and cell death in a synergistic manner. Collectively, these results indicate that Pol $\delta$  alleviates the Myc-induced RS, and highlight the possibility of synthetic sick or lethal interaction between Pol $\delta$  and MUS81-EME2 in cells experiencing Myc-induced RS.

研究分野：DNA損傷応答

キーワード：がん遺伝子 DNA複製 DNA損傷 DNAポリメラーゼ 損傷乗り越えDNA合成

### 1. 研究開始当初の背景

腫瘍細胞において、活性化がん遺伝子は様々な DNA 複製の異常を引き起こす。たとえば、過剰な DNA 複製によるヌクレオチドや複製因子の相対的欠乏や複製と転写の衝突などが原因と考えられる DNA 複製フォーク進行の遅延や停止である。これらは、発がん性複製ストレス(replication stress, RS)と総称されており、ATR 経路の活性化や、RS の結果として生ずる DNA 損傷による ATM-p53 経路の活性化などを通して細胞老化や細胞死を促進し、腫瘍抑制的に作用する。一方、発がん性 RS によって損傷を受けた DNA は修復エラーによってゲノム不安定化の原因となり、腫瘍の悪性化を促進する。したがって、この発がん性 RS に対して応答する仕組みは発がん過程の解明にも、治療標的の発見にも重要な意義を持つ。

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 ポリメラーゼと複製忠実度の低い DNA ポリメラーゼのグループである。損傷乗り越え DNA 合成(TLS)は、複製忠実度の低い DNA ポリメラーゼを用いて RS への耐性に関与する重要な機構である。Y-family ポリメラーゼ (Pol  $\eta$ , Pol  $\theta$ , Pol  $\iota$ , REV1 の 4 種類が哺乳類にはある)は中でも代表的な TLS ポリメラーゼとして知られる。これらは大腸菌や酵母から進化的に保存されている。また、Pol  $\eta$  の先天的欠損は、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(XP-V)の原因となる。しかし、がん遺伝子誘導性 RS に対する TLS の役割はほとんど解明されていない。

私たちはこれまでに、がん細胞における Y-family ポリメラーゼの働きについて研究を行ってきた。その結果、がん細胞で活性化を受け多くのシグナル分子の構造・機能の活性化を助ける分子シャペロン Hsp90 が Pol  $\eta$  や REV1 の安定性や機能を制御することや、腫瘍細胞で複製開始点の過剰な活性化によって起こる DNA の再複製に Y-family ポリメラーゼが関与することを明らかにしてきた。

### 2. 研究の目的

代表的ながん遺伝子のひとつである MYC の活性化は RS を誘導する。この RS への耐性において Y-family ポリメラーゼが果たす機能、その働き仕組み、相互作用する因子を解明することを目的に研究を行った。

### 3. 研究の方法

ヒト細胞株 U2OS において、エストロゲン受容体と MYC 遺伝子の融合蛋白(MYC-ER)を安定的に発現するクローン U2OS/MYC-ER を作成した。この細胞をエストロゲン類似薬 4OHT で処理すると MYC-ER が核に移行し MYC を活性化し、DNA 合成を促進し、RS

を誘導できることが報告されている。そこで、主にこの実験系を用いて、Y-family ポリメラーゼの役割を解析した。

### 4. 研究成果

(1) U2OS/MYC-ER を 4OHT で処理する時に、あらかじめ各 Y-family ポリメラーゼに対する siRNA を導入して発現を抑制して細胞増殖や細胞周期に対する効果を解析した。結果は、Pol  $\eta$  siRNA (siPol  $\eta$ ) が 4OHT 処理細胞において最も大きく細胞増殖を抑制し、G2 arrest, アポトーシスを誘導することを示した。

(2) siPol  $\eta$  導入が、MYC 活性化によって誘導される DNA 二重鎖切断(DSB)マーカー H2AX 増加の程度を増強した。また、DSB を直接測定するコメット・アッセイにおいても DSB 数を増加させることが示された。

(3) XP-V 患者由来の Pol  $\eta$  欠損ヒト線維芽細胞とこれに野生型 Pol  $\eta$  を導入した細胞を比較して、MYC-ER の発現が細胞周期と H2AX に与える効果を解析した。Pol  $\eta$  欠損細胞では H2AX の誘導と G2 arrest がより強く観察された。

(4) U2OS/MYC-ER に安定的に GFP- Pol  $\eta$  を発現させた細胞で 4OHT による MYC 活性化を誘導したところ、GFP- Pol  $\eta$  の DNA 複製部位への局在が観察された。また、Pol  $\eta$  を複製部位へ動員する Rad18 によるユビキチン化 PCNA の増加が見られた。さらに、内因性 Pol  $\eta$  も MYC 活性化細胞において DNA 複製フォークスへの動員が観察された。

(5) U2OS/MYC-ER に Pol  $\eta$  のドミナント・ネガティブ変異体(dead-Pol  $\eta$ )と野生型 Pol  $\eta$  を過剰発現し、ER-MYC 活性化の効果を解析した。4OHT 処理細胞において複製部位には dead-Pol  $\eta$  と H2AX が同じ核 foci に集積が観察されたが、野生型 Pol  $\eta$  についてはそのような結果が得られなかった。この結果は Pol  $\eta$  のポリメラーゼ活性が MYC 誘導性 RS の緩和に重要であることを示唆する。

(6) U2OS/MYC-ER において 4OHT による MYC 活性化と siPol  $\eta$  導入が DNA 複製ダイナミクスに与える影響を DNA ファイバー法を用いて解析した。報告されているように、MYC 活性化は複製オリジン活性化を促進にともなう複製フォークの遅延・停止の促進を引き起こした。この時に siPol  $\eta$  導入すると、複製オリジン活性化には影響せず複製フォークの遅延・停止をさらに促進した。これらの結果は、Pol  $\eta$  が MYC による複製フォークの進行障害を緩和することを示唆する。

(7) ヌクレアーゼ MUS81 は M 期において EME1 と複合体を作り、common fragile site の切断に関与する。一方、MUS81 と EME2 との複合体は S 期に作用し、停止した複製フォーク DNA の切断に関与することが近

年明らかになった。そこで、MUS81, EME1, EME2 をそれぞれ siRNA によって抑制し、U2OS/MYC-ER 細胞の siPol 導入後の MYC 活性化による DSB の形成に対する影響を解析した。その結果は、MUS81-EME1 ではなく、S 期特異的ヌクレアーゼ MUS81-EME2 が DSB 形成に関与することを示した。さらに、MYC 活性化細胞において MUS81-EME2 と Pol の発現抑制が、RS の増強と細胞死を相乗的に促進することが明らかとなった。

以上をまとめると、本研究は MYC がん遺伝子の活性化が誘導する RS の緩和に Pol を介する DNA 合成が関与することを明らかにした。また、Pol の作用が欠損する時に MUS81-EME2 による DSB 形成を介する複製フォーク再開がバックアップ機構として作用する可能性が考えられた。これらの知見は、発がん機構とそれを標的とする治療開発に有用な手がかりを提供する。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Oda T, Sekimoto T, Kurashima K, Fujimoto M, Nakai A, Yamashita T. Acute HSF1 depletion induces cellular senescence through the MDM2-p53-p21 pathway in human diploid fibroblasts. 査読有、J Cell Sci (2018) 131: doi:10.1242/jcs.210724

Kurashima K, Sekimoto T, Oda T, Kawabata T, Hanaoka F, Yamashita T. Pol $\eta$ , a Y-family translesion synthesis polymerase, promotes cellular tolerance of Myc-induced replication stress. 査読有、J Cell Sci (2018) : doi: 10.1242/jcs.212183

〔学会発表〕(計 14 件)

倉島公憲、関本隆志、小田司、花岡文雄、山下孝之 Pol $\eta$ , a member of Y-family DNA polymerases, prevents generation of DNA double strand breaks induced by c-myc expression. 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 (名古屋)

小田司、関本隆志、倉島公憲、山下孝之 Acute inhibition of heat shock factor 1 (HSF1) induces cellular senescence through cell type-dependent mechanism. 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 (名古屋)

小田司、関本隆志、倉島公憲、山下孝之 Heat shock factor 1 (HSF1) 抑制は DNA 損傷および蛋白変性ストレスと独立して細胞老化を誘導する。第 38 回日本分子生物学会 2015 年 12 月 (神戸)

倉島公憲、関本隆志、小田司、川端剛、花岡文雄、山下孝之 (2015) Y-family 損傷乗り越え DNA ポリメラーゼ(Y-Pol)の一員 Pol は MYC がん遺伝子の誘導する複製ストレスを軽減する。第 38 回日本分子生物学会 2015 年 12 月 (神戸)

倉島公憲、関本隆志、小田司、花岡文雄、山下孝之 Pol $\eta$ , a Y-family translesion synthesis (TLS) polymerase, mitigates c-Myc induced replication stress. 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 (横浜)

小田司、関本隆志、倉島公憲、山下孝之 HSF1 depletion induces cellular senescence independently of proteotoxic stress. 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 (横浜)

倉島公憲、関本隆志、小田司、花岡文雄、山下孝之 Y-family ポリメラーゼ Pol とエンドヌクレアーゼ Mus81-Eme2 複合体は段階的に協調して c-MYC がん遺伝子誘導性複製ストレスを抑制する。第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 12 月 (横浜)

小田司、関本隆志、倉島公憲、山下孝之 (2016) 熱ショック応答転写因子 Heat shock factor 1 (HSF1) の発現抑制による細胞老化は MDM2 阻害蛋白 Dehydrogenase/reductase 2 (DHRS2) に制御されている可能性がある。第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 12 月 (横浜)

小田司、関本隆志、倉島公憲、中村瑠里、松田美弥子、大園真澄、山下孝之 MDM2 阻害因子 Dehydrogenase/reductase 2 (DHRS2) の細胞老化における役割 第 40 回日本分子生物学会年会 2017 年 12 月 (神戸)

倉島公憲、関本隆志、小田司、花岡文雄、山下孝之 (2017) Synthetic lethal interaction between Pol $\eta$  and MUS81-EME2 in cellular response to Myc-induced replication stress (RS). 第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年 9 月 (横浜)

◎小田司、関本隆志、倉島公憲、山下孝之 (2017) HSF1 depletion induces senescence through DHRS2-MDM2-p53 pathway in immortalized human fibroblasts (iHDFs). 第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年 9 月 (横浜)

◎倉島公憲、関本隆志、小田司、花岡文雄、山下孝之 (2016) Pol $\eta$ , a Y-family translesion synthesis (TLS) polymerase, mitigates c-Myc induced replication stress. 第 75 回日本癌学会学術総会 (名古屋)

◎関本隆志、倉島公憲、小田司、川端剛、松田美弥子、中村瑠里、大園真澄、花岡文雄、山下孝之 Y-family ポリメラーゼ Pol $\eta$  は Mus81/EME2 ヌクレアーゼ複合体と協同してがん遺伝子 c-Myc による replication stress (RS) を緩和する 第 40 回日本分子生物学会年会 2017 年 12 月 (神戸)

◎中村瑠里、小田司、関本隆志、松田美弥子、大園真澄、半田寛、笠松哲光、斎藤貴之、村上博和、山下孝之 DNA 架橋剤メルファランは多発性骨髄腫細胞株において主要組織適合抗原クラス II (MHC II) の転写活性化因子 CIITA の発現を促進する 第 40 回日本分子生物学会年会 2017 年 12 月 (神戸)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔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

なし

### (3)連携研究者

小田 司 (ODA, Tsukasa)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：10323643

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