

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07009

研究課題名(和文) 抗がん剤カンプトテシンと複製フォーク

研究課題名(英文) CPT (DNA topoisomerase I inhibitor) and DNA replication fork

研究代表者

関 政幸 (SEKI, Masayuki)

東北医科薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70202140

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)：複製開始因子Cdt1が過剰になると複製フォーク進行に関わるMCMの活性を阻害した。フォークを移動できる Tipin の遺伝子破壊株で、低濃度カンプトテシン(DNAトポイソメラーゼ阻害剤)暴露により、DNA二重鎖切断が野生型株に比べ増加し、その帰結としてのチェックポイント異常亢進が明らかになった。一方、早老症ウェルナー症候群遺伝子産物 WRN と相互作用できる WRNIP1 は、UV照射時にTranslesion Synthesis (TLS) に関わる Pol の上流で機能すること、WRNIP1の過剰発現が TLS に関わるPriPolの量を低下させることなどを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Main findings are as follows; (1) Excess DNA replication initiation factor Cdt1 inhibits MCM helicase activity in frog eggs extract. (2) Chicken DT40 TIPIN KO cells shows CTP (DNA topoisomerase I inhibitor) hypersensitivity. Under low dose CPT exposure, DNA double strand breaks are accumulated in TIPIN KO, leading to hyper checkpoint activation. (3) After UV irradiation, UV sensitivity and UV-induced hyper mutation of DT40 Polh single KO cells are almost completely suppressed by WRNIP1 gene knockout, suggesting that WRNIP1 acts upstream of Polh. (4) One of translation polymerases, PriPol is down-regulated by overproduction of WRNIP1. PriPol is the best candidate for error-free translesion polymerase on UV-damaged DNA in the absence of both WRNIP1 and Polh.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：DNA複製 フォーク Tipin WRNIP1 Rad52 DNAトポイソメラーゼI カンプトテシン MCMヘリカーゼ

1. 研究開始当初の背景

DNA 複製フォークの進行に伴う、フォーク前方の torsional stress の解消が、円滑な DNA 複製に必須なことは以前から知られていた。申請者は、*J. Biol. Chem.* 289, 11374-11384, 2014 にて「Tipin (複製フォークの進行を担う MCM ヘリカーゼ複合体と共に移動できるタンパク質)が、MCM のヘリカーゼ活性と DNA トポイソメラーゼ I (TopI) の torsional stress 解消反応を連動させる」可能性を見出していた。

2. 研究の目的

本研究は、DNA 複製フォーク前後で、DNA 複製を滞りなく完遂させるための分子機構の一端を解明しようとするものである。具体的に、以下の 2 つの目標を掲げた。

- (1) ニワトリ DT40 Tipin ノックアウト (KO) 細胞の TopI 阻害剤カンプトテシン (CPT) への高感受性を指標に、フォーク進行と torsional stress の解消のカップリング機構の解明に挑む。
- (2) DNA 複製後修復のうちの translesion synthesis (TLS) に関与する可能性が高い WRNIP1 (Werner interacting protein 1) の機能解析により、WRNIP1 と DNA polymerase (Pol)との機能の連関、さらには DNA 組換え酵素 Rad52 との機能の連関の解明を目指した。

3. 研究の方法

ニワトリ DT40 細胞を用いた遺伝学的解析と、標的タンパク質と複合体を形成する因子との関係を調べることを組合せ、目標の達成を目指した。上記の (1) (2) に対し、具体的には、

- (1) DT40 TopI 条件致死株樹立と性状解析および MCM 複合体 (Tipin とともに複製フォーク上にある) の Cdt1 によるフォーク進行阻害機構の解明
- (2) DT40 WRNIP1/Pol 二重遺伝子破壊株 (DKO) の樹立とその性状解析、WRNIP1/RAD52 二重遺伝子破壊株 (DKO) の樹立とその性状解析を行う。さらに WRNIP1 と TLS に関わることが最近明らかになってきた PriPol との機能の連関について解析する。

4. 研究成果

結果論ではあるが、上記 (1) (2) の当初計画のうち、(1) に関しては TopI 条件致死株樹立の不成功をはじめ、思うように研究を

進展させることはできなかった。しかしながら、Tipin の機能に迫る重要な手掛かりは発見はできた (残念ながら論文発表には至っていない)。一方、計画 (2) のほうは順調に成果をあげることができた。そこで、Tipin に関する発見 2 項目と、MCM ヘリカーゼに関する発見 1 項目、さらに WRNIP1 に関する発見 3 項目の合計 6 項目について、箇条書きにて解説する。また、論文報告できた成果については文献番号を、論文報告できなかったが学会発表した成果には、学会発表番号を付記した。

- (1) Tipin KO 細胞では、低濃度の CPT により DNA 二重鎖切断が、野生型に比べ増加することを検出できた。この知見は、我々の *J. Biol. Chem.* 289, 11374-11384, 2014 にて報告した、低濃度 CPT による Tipin KO 細胞の過剰なチェックポイント亢進を説明できるものであった (文献 1)。
- (2) チェックポイント活性化に関わる複製フォーク因子である Claspin と Tipin との二重変異株 (DKO) を 1 株のみ、樹立できた。このクローンは増殖能が著しく悪く、Tipin KO による細胞内 defect を Claspin がかるうじて支えていることを示唆するものであった。ただ、残念なことに得られた 1 クローンの安定性が悪く、
- (3) Tipin とともに複製フォーク進行を担う MCM ヘリカーゼの制御という観点から、MCM の複製開始のお膳立てに必要な Cdt1 における新規機能を発見した。Cdt1 が過剰になると、これまで未発見であった Cdt1 による複製フォークへの影響を捉えることができた。具体的には、Cdt1 が MCM ヘリカーゼに働きかけて複製フォーク進行を遅延させる活性を持つことを立証した (文献 2)。
- (4) WRNIP1 は WRN (ウェルナー症候群原因遺伝子産物) と相互作用する。WRN が DNA 組換え酵素 Rad52 と複合体形成できることから、WRNIP1 と Rad52 が物理的に相互作用できるか免疫沈降実験を行った。その結果、両者は僅かながらではあるが複合体を形成できた。そこで、さらに WRNIP1 と Rad52 の関係を調べるため、DT40 WRNIP1/RAD52 二重遺伝子破壊株 (DKO) を作製した。様々な DNA 傷害剤・薬剤への感受性テストを行った結果、過酸化水素 H_2O_2 に DKO を暴露した際に、それぞれの一重変異株の H_2O_2 感受性が抑制された。このことは、WRNIP1 および RAD52 の両タンパク質が細胞内に存在しない時、他の酸化ストレス応答が活性化していることを示唆した (文献 3)。

- (5) WRNIP1 は TLS に関わる Pol と物理的に相互作用し、DT40 WRNIP1/Pol DKO 細胞において、Pol 単独破壊株の UV 感受性が WRNIP1 遺伝子破壊で抑制されること、その意義について議論した。Pol 単独破壊株での UV 誘導性の突然変異率上昇が WRNIP1 欠損で抑制されたことから、error-free 型の TLS が DKO 細胞において活性化していることが示唆された (文献 4)。
- (6) 項目 5 で予想された error-free TLS 候補として PriPol が想定された。そこで、WRNIP1 と PriPol が細胞内で相互作用しているか否か、免疫沈降実験にて調べてみた。その結果、両者は複合体形成できた。興味深いことに、WRNIP1 を細胞に過剰発現させると、ProPol のタンパク質量が著しく低下した。その事象が PriPol の転写量の低下に起因するものでないことから、WRNIP1 により ProPol の分解が促進されていることが示唆された。この結果は、項目 5 から予想される候補が、PriPol であることを強く示唆するものとなった (学会発表 2, 6, 7, 8)。

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)

関 政幸、DNA 複製前後で起こる生命現象と Tipin、生化学、87 巻、2015、378-380

Nakazaki Y., Tsuyama T., Seki M., Takahashi M., Enomoto T., Tada S., Biochem. Biophys. Res. Commun., 470, 2016, 405-410
DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.01.028.

Yoshimura A., Haruna Y., Akatani M., Seki M., Enomoto T., Simultaneous depletion of WRNIP1 and RAD52 restores resistance to oxidative stress., Fund. Toxicol. Sci., 7, 2017, 1-7

Yoshimura A., Seki M., Enomoto T., The roles of WRNIP1 in genome maintenance, Cell Cycle, 16, 2017, 515-521
DOI: 10.1080/15384101.2017.1282585.

[学会発表](計 9 件)

関 政幸、普遍的なヒストンが多様な DNA 介在反応を支える、第 38 回日本分子生物学会/第 88 回日本生化学会大会 合同大会、神戸、2015.12 月

吉村 明、及川 瑞穂、関 政幸、榎本 武美、DNA 損傷時に WRNIP1 は PriPol と結合する、第 38 回日本分子生物学会/第 88 回日本生化学会大会 合同大会、神戸、2015.12 月

関 政幸、H2A.Z の機能を支えるカノニカル・ヒストン残基、第 3 回ヒストン・バリエーション研究会、早稲田大学、2016.2 月

吉村 明、及川 瑞穂、関 政幸、榎本 武美、WRNIP1/RAD52 遺伝子破壊株の作製と解析、日本薬学会第 136 年会、横浜、2016.3 月

関 政幸、ヒストン・モチーフの包括的理解、第 89 回日本生化学会大会、仙台、2016.9 月

吉村 明、及川 瑞穂、関 政幸、榎本 武美、WRNIP1 と PriPol の機能的関連の解析、第 89 回日本生化学会大会、仙台、2016.9 月

吉村 明、神保 仁美、長谷川 友里、関 政幸、榎本 武美、WRNIP1 による PriPol の発現調節、日本薬学会第 137 年会、仙台、2017.3 月

吉村 明、榎本 武美、関 政幸、WRNIP1 による PriPol の分解制御、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、神戸、2017.12 月

中林 悠、関 政幸、堀越 正美、細胞の頑強性を生み出すヒストン “Modification Web”、日本薬学会第 138 年会、金沢、2018.3 月

[図書](計 1 件)

関 政幸、多田 周右、榎本 武美、BLM (RECQ2), WRN (RECQ3), RTS (RECQ4)、日本臨床、7 巻、増刊号 6 [家族性腫瘍学]、2015、5 頁

[産業財産権]

なし

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

関 政幸（SEKI, Masayuki）
東北医科薬科大学・薬学部・教授
研究者番号：70202140