

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21605

研究課題名(和文) DNA損傷応答・修復反応におけるタンキラーゼの機能

研究課題名(英文) Functional analysis of Tankyrase for DNA damage response and repair

研究代表者

岡本 啓治 (Okamoto, Keiji)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター 分子生物治療研究部・研究員

研究者番号：30533682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：現在がん創薬シーズとして注目されるタンキラーゼは、様々なタンパク質と結合する多機能性タンパク質であるが、その機能の全貌については不明な点が多い。我々は、タンキラーゼがDNA損傷応答・修復反応にどのような役割を果たすのかについて解析を行った。その結果、肺がん細胞株A549細胞においてタンキラーゼ阻害剤処理を行うことでDNA損傷に対する感受性が増強することを見出した。さらに、タンキラーゼはDNA損傷部位に局在することも明らかとなり、タンキラーゼがDNA損傷応答反応構成因子として機能している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Tankyrase which is now focused on the potential target for the anti-cancer drug is known to be a multi-functional protein because of its function with a lot of different binding partners but the whole function in the cell remains to be elusive. I examined the role of Tankyrase for DNA damage response (DDR) and repair pathway. As a result, lung cancer cell line A549 showed hyper sensitivity for DNA damage in the combination with Tankyrase inhibitor. In addition, Tankyrase showed to localize to DNA double strand break sites. These data suggest Tankyrase plays a role for DNA repair as a component of DDR complex.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA損傷応答 DNA修復反応 ポリADPリボシル化

### 1. 研究開始当初の背景

ポリ ADP リボシル化(PAR 化)は NAD を基質として標的タンパク質に ADP リボース鎖を付加する反応であり、細胞増殖や、シグナル伝達、転写制御に重要な翻訳後修飾である。ポリ ADP リボシル化酵素ファミリーの一つタンキラーゼは、N 末側に存在する巨大なアンキリンリピートクラスターを介してテロメア結合タンパク質 TRF1 や Wnt シグナルタンパク質 Axin1 などのタンパク質と結合し、標的タンパク質をポリ ADP リボシル化する。ポリ ADP リボシル化された TRF1 や Axin はユビキチン化された後、ユビキチン-プロテアソーム経路によって分解され、テロメアの伸長や細胞増殖の亢進などの作用を引き起こす (Seimiya H et al., Mol Cell Biol, 2004, Huang SM et al., Nature, 2009)。これらはがんの形質の維持に重要な機能であり、そのため現在タンキラーゼ阻害剤は、がん治療のための分子標的薬として注目を浴びている。このように、タンキラーゼの機能の全貌を解き明かすことはがん研究、創薬研究を進めていく上で重要であるといえる。そこで申請者のグループでは、さらにタンキラーゼの機能の詳細を調べるために、(独)産業技術総合研究所バイオメディシナル情報センターの夏目徹先生、家村俊一郎先生の協力のもと、タンパク質量分析によるタンキラーゼ結合タンパク質の網羅的解析を行った。その結果、Merit40, BRE, BRCC3 という3つのタンパク質を同定した。これらのタンパク質はすべて DNA 修復反応の促進に関わる BRCA1 複合体の構成因子である (Feng L et al., Genes Dev, 2009)が、タンキラーゼが DNA 損傷応答・修復反応に関わるという報告はこれまでなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、タンキラーゼ新規結合タンパク質として DNA 損傷応答複合体タンパク質を同定したことを踏まえ、タンキラーゼが DNA 損傷応答反応及び DNA 修復に関与しているかについての検証を行い、その分子メカニズムの一端を解明することを目的とし研究を行うこととした。

### 3. 研究の方法

本研究を遂行するにあたり、(1) DNA 損傷応答反応におけるタンキラーゼおよびタンキラーゼ - Merit40 相互作用の機能の解析、(2) DNA 修復反応におけるタンキラーゼの機能解析という項目に焦点を当てて研究を行ってきた。以下に各項目における実験方法について簡潔に記述する。

#### (1) DNA 損傷に対するタンキラーゼの機能解析

タンキラーゼ - Merit40 の相互作用解析  
Merit40 変異体を作製し、タンキラーゼと Merit40 の結合がどのように起きているかに

ついて免疫沈降法を用いて検証を行った。

DNA 損傷時のタンキラーゼの挙動について細胞質および核内のタンキラーゼの挙動に変化があるかについて検証するために、放射線照射前後の細胞内タンパク質を細胞分画法で核と細胞質に分離し、ウエスタンブロットでタンキラーゼの細胞内分布に変化があるかを検証した。また、放射線照射後のタンキラーゼの DNA 損傷部位への局在を免疫染色法で検証した。

タンキラーゼ阻害による DNA 損傷応答反応の解析  
タンキラーゼが DNA 損傷応答の制御に関わっているかについて検証するために、細胞をタンキラーゼ阻害剤処理を行い、放射線照射に伴う DNA 損傷応答関連タンパク質の局在を免疫染色で検証した。

#### (2) DNA 修復に対するタンキラーゼの機能解析

タンキラーゼが DNA 修復に対して役割を持っているかについて検証するために、タンキラーゼ阻害剤またはタンキラーゼに対する siRNA で処理を行った細胞に対して、放射線またはプレオマイシン、シスプラチン、アドリアマイシン、カンプトテシン、エトポシドなどの細胞障害性抗がん剤を添加し、未処理の細胞と比較して細胞生存率がどのように変化するかについてコロニーフォーメーションアッセイで細胞コロニー数を測定することで検証した。

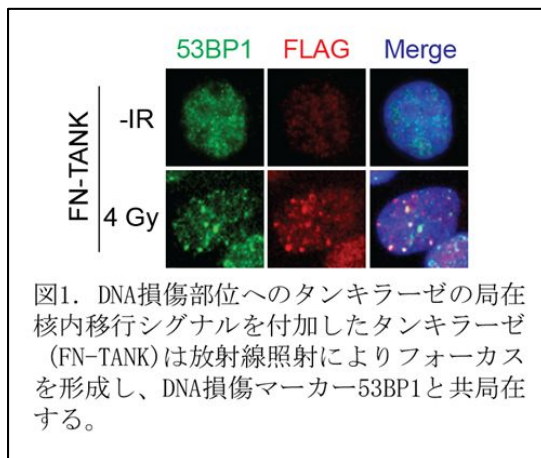
### 4. 研究成果

本研究の成果について、項目ごとに簡潔に記述する。

#### (1) DNA 損傷に対するタンキラーゼの機能解析

タンキラーゼ - Merit40 の相互作用解析  
先行研究のタンパク質量分析の結果得られた Merit40 - BRE - BRCC3 複合体のうち、タンキラーゼと実際に結合しているタンパク質を探索するために、タンキラーゼ結合モチーフの有無を調べたところ、3つのタンパク質のうち Merit40 内にタンキラーゼ結合モチーフが二か所存在することが分かった。そこで、タンキラーゼ - Merit40 の相互作用にこれらの結合モチーフが関わっているかを検証するために、この配列をそれぞれ欠損した Merit40 変異体を作製した。Merit40 変異体発現細胞を樹立し、それぞれの Merit40 変異体とタンキラーゼとの結合について免疫沈降法で検証した結果、28 - 35 番アミノ酸に存在するタンキラーゼ結合モチーフがタンキラーゼとの相互作用に必須であることが明らかとなった。

DNA 損傷時のタンキラーゼの挙動について、タンキラーゼは細胞質と核内両方に局在することが知られている。そこで、放射線照射後の細胞質及び核内のタンキラーゼタンパク質量に変化があるかを検証したが、放射線照射前後で細胞質及び核内のタンキラーゼのタンパク質量に変化はなかった。このことから、DNA 損傷はタンキラーゼの細胞質 核間の移行に影響を与えないことが示唆された。次に、DNA 損傷時の核内タンキラーゼの挙動を見るため、肺がん細胞株 A549 細胞に核内移行シグナル付加タンキラーゼを発現させた細胞株を作製し、放射線照射後のタンキラーゼの局在を DNA 損傷応答マーカーである 53BP1 との二重免疫染色によって検証した。その結果、X 線照射によってタンキラーゼのフォーカス形成が見られ、これらのフォーカスは 53BP1 と非常によく共局在することが確認された。このことから、タンキラーゼは DNA 損傷部位に局在することが明らかとなった。



さらに、Merit40 をノックダウンすることによってタンキラーゼのフォーカス形成が消失したことから、タンキラーゼの DNA 損傷部位への局在は Merit40 依存的であることが示された。

タンキラーゼ阻害による DNA 損傷応答反応の解析 Merit40 は BRCA1 などと複合体を形成し、DNA 損傷部位に局在することで DNA 修復反応の促進に関わっている。タンキラーゼが Merit40 と結合することでこれらのタンパク質の挙動にどのような影響を与えているかについて検証を行った。結果として、A549 細胞をタンキラーゼ阻害剤 G007-LK で処理し、放射線照射を行った時の DNA 損傷応答タンパク質  $\gamma$ H2AX 及び 53BP1 の局在に大きな変化は見られなかった。また、DNA 修復反応の一つ 相同組換え関連タンパク質である RAD51 の挙動についても同様に検証した結果、X 線照射後 12 時間後に RAD51 のフォーカス形成がわずかに低下する傾向は見られたもののその挙動に大きな変化は見られなかった。

## (2) DNA 修復に対するタンキラーゼの機能解析

タンキラーゼが DNA 損傷部位に局在するという結果を受け、実際にタンキラーゼが DNA 修復に関わっているかについて検証を行った。まず A549 細胞に X 線を照射し、二本鎖切断を誘導した時の細胞生存率がタンキラーゼ阻害剤処理によってどのように変化するかについて検証を行った。その結果、未処理の細胞において X 線量依存的な細胞生存率の低下が見られたが、タンキラーゼ阻害剤 G007-LK で処理することによって X 線に対する感受性が有意に増加した。また、G007-LK 以外の複数のタンキラーゼ阻害剤においても同様の感受性の増大が見られた。さらに、このタンキラーゼ処理による X 線感受性増大の程度は、タンキラーゼと同様の PARP ファミリータンパク質で、DNA 修復に関わることがすでに知られている PARP1 に対する阻害剤 Olaparib と同程度かそれ以上の感受性の増大であることも確認できた。

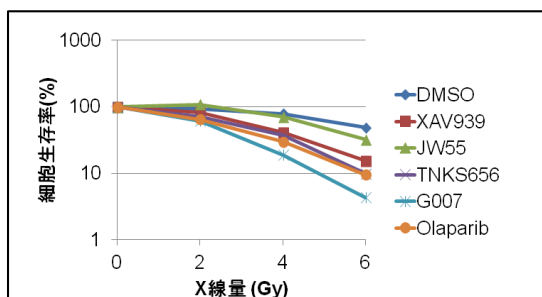


図2. タンキラーゼ阻害剤による X 線感受性の増大。A549 細胞をタンキラーゼ阻害剤 (XAV939, JW55, TNKS656, G007-LK) で処理し X 線を照射すると、PARP1 阻害剤 Olaparib と同程度の X 線感受性増大を示した。

同様の結果がタンキラーゼに対する siRNA を用いた検討でも得られ、タンキラーゼをノックダウンすることで X 線感受性の増大が認められた。これらの結果から、タンキラーゼは DNA 修復に関わっていることを強く示唆される。そこで次に、X 線以外の手段で DNA 損傷応答を誘導した時に同様の感受性の増大を引き起こすのかについて検討を行った。異なる作用機序で DNA 損傷を引き起こす細胞障害性抗がん剤ブレオマイシン、アドリアマイシン、カンプトテシン、シスプラチン、エトポシドを、それぞれタンキラーゼ阻害剤 XAV939 と併用して処理を行ったところ、X 線の時と同様に単剤に比べて併用による感受性の増大が認められた。

以上の結果より、タンキラーゼは Merit40 を介して DNA 損傷部位に局在することによって DNA 修復反応の促進に関与していることが強く示唆された。また、タンキラーゼ阻害剤と細胞障害性抗がん剤とを併用することによって、単剤よりも非常に強い細胞増殖抑制効

果が得られた。このことから、タンキラーゼ阻害剤はこれまで単剤で分子標的薬として有効であるといわれていたが、それ以外に抗がん剤との併用剤として応用できる可能性が示唆された。今後は、より詳細なメカニズム解析を行っていくとともに、併用剤としてのタンキラーゼ阻害剤の可能性について追及し、新しい治療法の確立に向けて研究を進めていきたい。

#### 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)

( 1 ) Hasegawa D, Okabe S, Okamoto K, Nakano I, Shin-ya K, Seimiya H. G-quadruplex ligand-induced DNA damage response coupled with telomere dysfunction and replication stress in glioma stem cells. 査読あり Biochem Biophys Res Commun. 2016 Feb 26;471(1):75-81. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.01.176. Epub 2016 Feb 1.

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

( 1 ) 岡本啓治、大石智一、黒岩美佳、家村俊一郎、夏目徹、清宮啓之 「タンキラーゼによるインターフェロン制御」第 38 回日本分子生物学会、2015 年 12 月 1 - 4 日、神戸ポートピアランド(兵庫県神戸市)

( 2 ) 岡本啓治、大石智一、黒岩美佳、家村俊一郎、夏目徹、清宮啓之 「タンキラーゼによる相同組換え制御」、第 39 回日本分子生物学会、2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔その他〕

[http://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/department/molecular\\_biotherapy/index.html](http://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/department/molecular_biotherapy/index.html)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

岡本 啓治 (Okamoto Keiji) 公益財団法人  
がん研究会・がん化学療法センター分子生物  
治療研究部・博士研究員  
研究者番号：30533682

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )