

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07250

研究課題名(和文)複製ストレスチェックポイント制御に関わるRBファミリーの新規分子機能

研究課題名(英文)RB family functions in regulation of replication stress checkpoint

研究代表者

内田 千晴 (UCHIDA, CHIHARU)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・准教授

研究者番号：60223567

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)：細胞はDNA複製障害によって生じるストレス(複製ストレス)に応答し、異常な染色体DNAを持ったまま分裂しないよう細胞増殖を一時停止させるチェック機能を備えている。本研究期間において我々は、がん抑制遺伝子産物RBファミリーの機能を抑制すると、複製ストレスへの応答反応が低下すること、DNA複製障害の原因を除去しても細胞機能の回復が遅延することを見出した。すなわちRBファミリーは、複製ストレス応答・チェックポイントの正常な活性化とその後の適切な細胞機能において重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RBは細胞老化・がん抑制に機能する。多くのがんでRBファミリーの変異や欠失が確認されており、RBファミリーの機能喪失はがん化の大きな要因とされている。複製ストレスも老化やがん化に関与することが注目されていることから、本研究成果は細胞老化・悪性化制御の研究へ発展する可能性もあり、基礎医学における普遍的な問題解明と、将来的な臨床医学への貢献の双方において重要な意義を持つことが期待される。

研究成果の概要(英文)：High levels of DNA damage or inhibition of DNA replication by some drugs interferes with DNA replication and hamper its progression, which causes "replication stress". Replication stress triggers cell cycle arrest to prevent cell division with abnormal genome DNA due to uncompleted DNA replication. In this study, we found that inhibition of RB family, one of the important tumor suppressor gene products, led to reduction in cell response against replication stress, and even delayed recovery from the replication stress. Our experimental data suggested that RB family might play an important role in activation of proper molecular signaling in cells in response to the replication stress.

研究分野：細胞周期制御 がん抑制

キーワード：複製ストレス RB ファミリー

## 1. 研究開始当初の背景

DNA 複製阻害を受けた時、阻害解消まで細胞周期を一時停止させる複製チェックポイントは、生体のゲノム恒常性維持において重要なシステムである。がん抑制遺伝子産物として知られる RB ファミリータンパク質 (pRB、p107RBL1、p130RB2) は、細胞周期進行抑制の要として、また、転写因子、DNA 複製制御因子、M 期制御因子やクロマチンリモデリング因子との相互作用を介して、ゲノム恒常性維持に対する積極的な関わりを持つ。

本研究代表者らは、pRB のユビキチン-プロテアソーム系による分解亢進が細胞周期抑制に破綻を招き、がん化の要因となること、正常な M 期進行に必要であることなど、細胞周期制御と染色体安定性維持における pRB の重要性を示してきた。先行研究では、複製開始の制御因子との相互作用などから、pRB の DNA 複製への関与が示されている。しかしながら、RB ファミリーの DNA 複製に対する分子メカニズムが明らかとなったのは一部であり、特に DNA 複製阻害を受けた際の複製ストレス応答、複製チェックポイント機能における役割については明確に示されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、「DNA 複製ストレスチェックポイント制御に関わる RB ファミリーの新規分子機能」の解明を目指した。申請者らは、準備研究期間で得た RB ファミリーと DNA 複製ストレス応答因子の相互作用等の結果から、「RB ファミリーは DNA 複製ストレス応答に関与し、ゲノム恒常性の維持に機能する」と考え、これを検証し、RB ファミリーによる複製ストレスチェックポイント制御の分子機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

DNA 複製ストレス応答における p130RB2 の機能とその制御メカニズムを明らかにするため、下の項目について検証を実施した。p130RB2、複製ストレス関連因子のノックダウン (KD) 細胞、またはそれらの過剰発現細胞へ複製ストレスを与え、p130RB やその他因子の有無における複製ストレス応答の変化を比較した。さらに、p130RB2 非結合型の複製ストレス関連因子の発現との比較を行った。

1. p130RB2 による複製ストレス関連因子の活性・機能の制御：活性化マーカー分子の発現変動、細胞内局在の変化の検証)
2. 複製ストレスチェックポイントにおける p130RB2 の機能：(ATR・ATM 経路活性化の継時的比較)
3. 複製阻害の解消とゲノム恒常性における p130RB2 の役割：(複製ストレス解消-細胞周期再開、細胞生死への影響)

## 4. 研究成果

U20S 細胞内 RB ファミリーの特定分子をノックダウンすると、Hydroxyurea 処理による DNA 複製ストレスを与えた条件において、複製ストレス初期に活性化されるべき応答因子のリン酸化レベルが減少、すなわち活性化が抑制されることが再現性をもって示された。また、このノックダウンにより活性化が抑制される応答因子を複数見出し、RB ファミリーとの細胞内共局在、結合を明らかにした。更にこのノックダウンは、複製ストレス負荷除去後も 1 本鎖 DNA 解消、および細胞増殖の回復を遅延させた。これらの実験結果から、RB ファミリ

ーは複製ストレス応答因子活性化とその後の適切な細胞応答において重要な役割を果たすと推測している。

これらの成果について、第 42 回日本分子生物学会年会（2019 年）でポスター発表を行った。また、DNA 損傷応答に関わる核内因子の新たな機能の解析に参画し、共著者としての論文が国際誌に掲載された。がん抑制遺伝子産物である RB ファミリーと関連し、細胞増殖制御とがん化に關与する生理活性因子 TGF $\beta$ による細胞内応答の解析研究にも携わり、共著論文が発表された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Uchida Chiharu	4. 巻 2016
2. 論文標題 Roles of pRB in the Regulation of Nucleosome and Chromatin Structures	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 BioMed Research International	6. 最初と最後の頁 1~11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2016/5959721	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Uchida Chiharu, Kitagawa Masatoshi	4. 巻 16
2. 論文標題 RING-, HECT-, and RBR-type E3 Ubiquitin Ligases: Involvement in Human Cancer	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Current Cancer Drug Targets	6. 最初と最後の頁 157~174
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2174/1568009616666151112122801	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Niida Hiroyuki, Matsunuma Ryoichi, Horiguchi Ryo, Uchida Chiharu, Nakazawa Yuka, Motegi Akira, Nishimoto Koji, Sakai Satoshi, Ohhata Tatsuya, Kitagawa Kyoko, Moriwaki Shinichi, Nishitani Hideo, Ui Ayako, Ogi Tomoo, Kitagawa Masatoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Phosphorylated HB01 at UV irradiated sites is essential for nucleotide excision repair	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 16102
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/ncomms16102	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Sakai Satoshi, Ohhata Tatsuya, Kitagawa Kyoko, Uchida Chiharu, Aoshima Takuya, Niida Hiroyuki, Suzuki Tetsuro, Inoue Yasumichi, Miyazawa Keiji, Kitagawa Masatoshi	4. 巻 79
2. 論文標題 Long Noncoding RNA ELIT-1 Acts as a Smad3 Cofactor to Facilitate TGF /Smad Signaling and Promote Epithelial-Mesenchymal Transition	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Research	6. 最初と最後の頁 2821~2838
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/0008-5472.CAN-18-3210	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内田千晴、丹伊田 浩行、北川雅敏
2. 発表標題 p130RB2は DNA複製ストレスにおける ATR活性化に正に関わる
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

浜松医科大学光先端医学教育研究センター・先進機器共用推進部・先進機器研究推進室 <a href="http://www.equip.hama-med.ac.jp/LPAR/LPAR.html">http://www.equip.hama-med.ac.jp/LPAR/LPAR.html</a>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	北川 雅敏  (Kitagawa Masatoshi)  (50294971)	浜松医科大学・医学部・教授   (13802)	
連携研究者	丹伊田 浩行  (Niida Hiroyuki)  (20336671)	浜松医科大学・医学部・准教授   (13802)	
連携研究者	太田 勲  (Ohta Isao)  (20464133)	浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・技術専門員   (13802)	