

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07284

研究課題名(和文) がん化を促進させる「DNAチェックポイント適応」の分子機構の解明

研究課題名(英文) Toward understanding of molecular mechanism underlies adaptive DNA checkpoint system that promotes tumorigenesis

研究代表者

古谷 寛治 (Kanji, Furuya)

京都大学・生命科学研究科・講師

研究者番号：90455204

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)：がん細胞では、ゲノムDNA 損傷ストレスに曝され、DNA損傷が未修復にも関わらず、細胞増殖をし続けることで、がん細胞は変異を蓄積しながら、様々な環境に適応し、増殖する。本研究課題では、この仕組みとしてポロ様キナーゼ1(PLK1)がゲノムDNA損傷の感知システムを不活化すると同時に細胞増殖を促進する二重の働きを持つことでゲノム損傷ストレス下での増殖を促進することを見出し、報告した。さらに、このPLK1の機能がオートファジー機構と協調して発動することをごん情報データベースと分子生物学的手法を併用することで見出した。この様にゲノムDNA損傷ストレス下でのがん増殖の新規な仕組みを提唱できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの性質である、ゲノム不安定性やゲノムDNA損傷ストレス下での異常増殖は、がんの化学療法や放射線治療におけるがん抵抗性の仕組みとして捉えられており、本研究課題ではその具体的な仕組みを明らかにした。また、その仕組みであるチェックポイント適応の中心因子として働くPLK1キナーゼの作用点として染色体複製速度の増進と細胞増殖の二つの作用点を持つことがわかったことは大きな進歩と言える。さらにがん情報データベースを利用した解析により、チェックポイント適応を引き起こしやすい細胞内環境の同定が可能であることを提唱した。以上の結果は、情報学的及び分子生物学的手法のコンビネーションの有用性も示している。

研究成果の概要(英文)：When cancer cells are exposed to genomic DNA damage stress, they continue to proliferate despite unrepaired DNA damage, which allows them to adapt to various environments and proliferate while accumulating mutations. In this research project, we found that polo-like kinase 1 (PLK1) has a dual function of inactivating the genomic DNA damage sensing system and promoting cell proliferation as a mechanism to promote proliferation under genomic damage stress. Furthermore, we found that the function of PLK1 is coordinated with autophagy mechanism by using both cancer information database and molecular biological methods. Thus, we have proposed a novel mechanism of cancer growth under genomic DNA damage stress.

研究分野：ゲノムDNA損傷応答

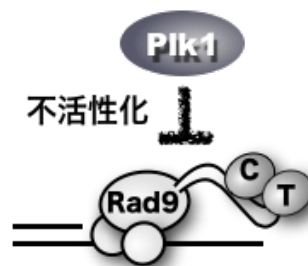
キーワード：オートファジー PLK1 細胞増殖 DNA複製 DNA損傷 チェックポイント

1. 研究開始当初の背景

細胞には、放射線や酸化ストレスなどに起因するゲノム DNA 損傷を常に受けている。とりわけ増殖中の細胞はゲノム DNA が損傷を受けた際には細胞周期進行を一旦停止させ、停止している間に DNA 損傷の修復を行う仕組みを備えている。この細胞周期停止機構をチェックポイント機構と呼ぶ。

しかしながら、ある状況下では、ゲノム DNA 損傷の修復が完全になされないままチェックポイント機構による細胞周期停止が解除され、細胞周期が進行し、細胞分裂が再開する。これを「チェックポイント適応」と呼ぶ。チェックポイント適応は未修復の DNA 損傷を残したまま染色体分配を促すため、がん化を促進する仕組みとして知られている。

申請者は、DNA チェックポイント機構における DNA 損傷感知タンパク質 RAD9 のリン酸化フィードバック制御に関わる因子群のスクリーニングの過程で、チェックポイント適応を引き起こすことが知られていたリン酸化酵素 PLK1 を同定していた。また、生化学的手法により、PLK1 が RAD9 に直接結合し、リン酸化することをすでに示していた。PLK1 はいくつかの生物においてチェックポイント適応を引き起こすことが報告されているとともに、種々のがんにおいて高発現すること、放射線治療時の予後不良と強い相関があることが知られていた。PLK1 はしかしながら、チェックポイント適応におけるリン酸化の基質とその具体的な促進メカニズムはわかっていなかったことから、本申請課題では、作業仮説として、PLK1 がゲノム DNA 損傷ストレスの感知機構としての RAD9 の働きを不活性化させることで、チェックポイント適応を促進すると考え、その具体的な分子機構と周辺の制御機構を明らかにしうる研究課題として申請を行なった。



2. 研究の目的

具体的には、チェックポイント機構の発動とチェックポイント適応とのバランスがどのようにして決められるのか、また、PLK1 を始めとして、ほかにどのような因子がチェックポイント適応に関わるかを理解することを目的とした。これにより、がん治療戦略を考える上で重要な知見が得られることが期待された。

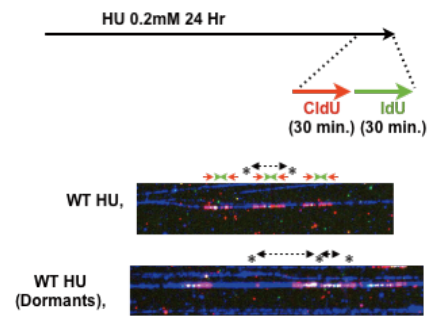
我々は、すでに、PLK1 と相互作用できない RAD9 の変異を同定していたこと、また、その変異を導入した細胞では、ゲノム DNA 損傷ストレス下での DNA 複製の進行が早くなることをすでに示していた。DNA 複製の進行が早くなることが、細胞のゲノム DNA 損傷ストレス下での異常増殖につながることを示唆されたが、具体的に DNA 複製のどの段階（複製開始起点の発火頻度、あるいは複製 DNA フォークの進行速度）で早くなっているかがわかっていなかった。この様にチェックポイント適応の作用点を理解することを一つの目的とした。

同時に、チェックポイント機構の発動による細胞増殖停止か、チェックポイント適応を細胞が選択するかに関わるリン酸化ネットワークを理解することも一つの目的であり、そのため、生化学あるいは遺伝学的な手法に加え、バイオインフォマティクスの手法も用いることを提案した。申請者はがん情報データベースから RAD9 と PLK1 が肝臓や神経系のがんで頻繁に高発現していることを見出ししていた。チェックポイント適応機構と発がんとの関わりは、RAD9 と PLK1 の高発現を許容させる細胞内環境を構築すると因子の同定を行うことで理解が深まる

と考えた。こういったチェックポイント適応に関与する新規因子の探索を、相関解析を主体とした情報学的アプローチも駆使することで模索した。

3. 研究の方法

まず、チェックポイント適応の作用点を見出すために複製 DNA のコーミングアッセイ により、一分子レベルでの複製 DNA 解析を行なった。この手法においては、ゲノム DNA 損傷ストレス (ヒドロキシウレア:HU) 存在下で二つの異なる蛍光ラベルした DNA を順次細胞にパルス



DNA 複製の進行速度と発火した DNA 複製起点間の距離の測定が可能となる。チェックポイント適応を引き起こす細胞株 (U2OS 株) と PLK1 と結合できない RAD9 を高発現させたチェックポイント適応を起こせない細胞株間で比較することで、PLK1 キナーゼのチェックポイント適応における作用点の探索を行なった。また、同時に蛍光ラベルした DNA の取り込み速度も測ることで、チェックポイント適応の程度の計測も行ない、それにより定量的な解析を試みた。

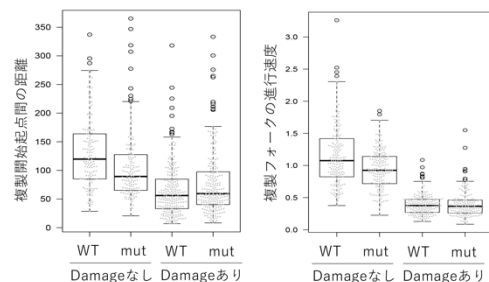
チェックポイント適応の制御因子の獲得のアプローチとしてはがん情報データベースを端緒に PLK1 と RAD9 の高発現と相関して上昇する因子を探索し、それらの因子の妥当性を分子生物学的手法にて検証するという手法をとった。新規因子の探索には遺伝学あるいは生化学的手法が従来取られてきたが、従来のアプローチでは、使用した実験系のバイアスがかかることがあり、実際の細胞活動における機能とは異なるものとして同定されることがある。そこで、本申請課題では、がん情報データベースをがん細胞の生体情報カタログとして捉え、取得した因子の検証手法として分子生物学的な手法を行うことにした。

4. 研究成果

まず、複製 DNA の一分子解析 (DNA コーミングアッセイ) に関しては、チェックポイント適応が起こらない細胞、すなわち、PLK1 が結合できない、また、PLK1 によるリン酸化をうけない RAD9 を発現する細胞では、通常の細胞増殖時にすでに個々の複製フォークの進行速度が低下しているのが観察された。したがって、一つの結論としては、PLK1 を介したチェックポイント適応の仕組みの一つとして、DNA 複製フォークの進行を促すことが示唆された。しかしながら、通常の細胞増殖時の染色体全体の複製の速さはチェックポイント適応を引き起こせる細胞とほとんど変わらなかった。これは、複製フォークの進行速度が低下した代わりに DNA 複製開始起点の発火頻度を上げることで染色体全体の複製速度を補完していることに因ることを実験的に示すことができた。

一方、ゲノム DNA 損傷ストレスをうけた際には、興味深いことに、個々の複製フォークの進行速度はチェックポイント適応を引き起こせる細胞とそうでない細胞でほとんど同じであることが明らかとなった。

その一方で、複製開始起点間の距離はチェックポイント適応が起こらない細胞では僅かながらに距離が長くなっており、このことから、複製開始起点の発火頻度が落ちていることが一つの仕組みとして明らかとなった。しかしながら、一連の結果が示唆しているのは、複製フォークの進行速度の調節と複製開始起点の発火頻度の調節は共に相互に関連しているこ



とであった。これはお互いのプロセスがフィードバックにより補完的に働くことを示している。そのバランスが染色体複製の速度を早める方向に向かうのがチェックポイント適応であると考えられた。こういった解析には今後、分子生物学的な手法のみならず、数理解析アプローチも含めた解析を行う必要があると思われる。それにより、実際にチェックポイント適応の調節の仕組みの理解が進むと結論した。

以上の研究内容は 2017 年末に、**eLIFE** 誌にチェックポイント適応の新たなメカニズムとして出版することができた。この報告自体のインパクトとしては、主に **PLK1** のチェックポイント適応の標的を初めてあきらかにしたこと、また、**PLK1** がチェックポイント適応を促す際に、細胞増殖キナーゼである **CDK** が **RAD9** をリン酸化して初めて機能することを生化学、細胞生物学的な手法を用いることで示したことである。このことは、がん増殖にとって、増殖促進はゲノム DNA 損傷の感知能力を低下させることと同義であることを示していた。がん特有のこの戦略こそが、がんがゲノム DNA 損傷ストレス下で変異を蓄積しながら適応する増殖戦略として考えられることを提唱できた。

我々は同時にがん情報データベースを利用することで、**PLK1** と **RAD9** を高発現するがん細胞株を抽出した。このがんを **PLK1** に依存した DNA チェックポイント適応を可能としたがんとして位置づけ、発現遺伝子の相関解析からそのチェックポイント適応を促す細胞環境を作り出す因子としてオートファジー機構を同定した。実際にデータベースから得たこの情報はオートファジーの阻害剤を使うことで、分子生物学的に検証できた。一連の結果は、情報データベースの検証実験としての分子生物学的な手法の有用性を示しており、今後の意外性のある新規因子の探索に情報学的な手法が有効であることを示していると考え、現在投稿準備を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 [Kanji Furuya, Masae Ikura, Tsuyoshi Ikura]	4. 巻 165
2. 論文標題 Epigenetic interplays between DNA demethylation and histone methylation for protecting oncogenesis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 297-299
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvy124	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 -

1. 著者名 Nozaki Shingo, Furuya Kanji, Niki Hironori	4. 巻 18
2. 論文標題 The Ras1-Cdc42 pathway is involved in hyphal development of Schizosaccharomyces japonicus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 FEMS Yeast Research	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/femsyr/foy031	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 -

1. 著者名 Wakida Takeshi, Ikura Masae, Kuriya Kenji, Ito Shinji, Shiroya Yoshiharu, Habu Toshiyuki, Kawamoto Takuo, Okumura Katsuzumi, Ikura Tsuyoshi, Furuya Kanji	4. 巻 6
2. 論文標題 The CDK-PLK1 axis targets the DNA damage checkpoint sensor protein RAD9 to promote cell proliferation and tolerance to genotoxic stress	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1-26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.29953	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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 4件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 古谷寛治、井倉正枝、井倉毅
2. 発表標題 データベース解析から紐解くがん細胞のゲノムDNA損傷ストレス抵抗性獲得戦略
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古谷寛治、井倉正枝、井倉毅
2. 発表標題 オートファジー機構によるがんシグナル経路の調節
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古谷寛治、井倉正枝、井倉毅
2. 発表標題 ロジスティックモデルの更新：老化研究における新たな視点
3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井倉毅、古谷寛治、白木琢磨、井倉正枝
2. 発表標題 細胞の生き残り戦略：ゲノムストレス応答蛋白質間相互作用の揺らぎ
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋優喜、古谷寛治、井倉正枝、井倉毅
2. 発表標題 ロジスティックモデルの更新に伴う老化研究の新たな視点
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古谷 寛治
2. 発表標題 オートファジー機構から見たがん細胞のゲノムDNA損傷ストレス抵抗性獲得戦略」
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古谷寛治
2. 発表標題 オートファジー機構から見たがん細胞のゲノムDNA損傷ストレス抵抗性獲得戦略
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古谷 寛治
2. 発表標題 がん増殖における DNA チェックポイント因子 RAD9 と PLK1 キナーゼの相互連携の意義
3. 学会等名 第19回生命科学研究所シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古谷 寛治
2. 発表標題 ゲノム損傷ストレス下での細胞増殖を保障するCDK-PLK1経路によるDNA損傷シグナリングの調節
3. 学会等名 日本放射線影響学会第60回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古谷 寛治
2. 発表標題 CDK-PLK1 axis targets DNA checkpoint sensor protein RAD9, promoting tolerance to genotoxic stress and cell proliferation
3. 学会等名 33rd International Symposium of Radiation Biology Center, Kyoto University (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古谷 寛治
2. 発表標題 ゲノム損傷ストレス下での細胞増殖を保障する CDK-PLK1 経路による DNA 損傷シグナリングの調節
3. 学会等名 第35回 染色体ワークショップ・第16回 核ダイナミクス研究会 合同研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古谷 寛治
2. 発表標題 ゲノム損傷ストレス下での細胞増殖を保障するCDK-PLK1経路によるDNA損傷シグナリングの調節
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) ポスター発表
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古谷 寛治
2. 発表標題 ゲノムDNA損傷応答機構の制御とがんシグナリング
3. 学会等名 神戸大学バイオシグナル総合センター・第6回バイオシグナル研究会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

古谷研究室/Publication
<http://house.rbc.kyoto-u.ac.jp/mutagenesis2/publication2>
京都大学大学院生命科学研究科・附属放射線生物研究センター・ホームページ（一般の方へ）
<http://www.rbc.kyoto-u.ac.jp/research>
京都大学研究成果ホームページ（二刀流のがん増殖戦略）
http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2017/171219_1.html

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------