

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07641

研究課題名(和文) ATR-ARP8経路による発がん機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of ATR-related ARP8 phosphorylation in response to replication stress

研究代表者

孫 継英 (Sun, Jiying)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授

研究者番号：80397926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、DNA複製フォーク障害の修復に関わるリン酸化酵素ATRによるINO80複合体の構成因子ARP8のリン酸化の生物学的意義と発がんやがんの増悪に重要な意義がある染色体不安定性などとの関連を検討した。その結果、ATRによるARP8のリン酸化は、複製フォーク障害により停止した複製の再開や細胞死の誘導や複製ストレス後の染色体異常の形成に関与していることを確認した。これらのことから、ATRによるARP8のリン酸化は複製ストレス後にゲノム安定性を維持する役割を担っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、ATMとATRがINO80複合体の構成因子ARP8をリン酸化することを見出し、ATMによるARP8のリン酸化は染色体転座を抑制することを報告した。しかし、DNA複製フォーク障害の修復に関与するリン酸化酵素ATRによるARP8のリン酸化の生物学的意義は不明であった。本研究により、ATRによるARP8のリン酸化がDNA複製フォーク障害を修復する分子機構に関わっていることが解明された。また、ARP8の変異と発がん機構の関連についての証拠も示された。これにより、ARP8リン酸化を標的とした分子標的療法の開発などに繋がることが期待され、がん研究分野への貢献となる。

研究成果の概要(英文)：We have reported that phosphorylation of ARP8, an INO80 complex component, by ATM kinase, represses the 11q23 chromosomal abnormalities in secondary leukemia. In this study, we investigated the biological significance of ARP8 phosphorylation by ATR, a kinase involved in the repair of DNA replication fork stress, and its relationships with the chromosome instabilities associated with carcinogenesis. We found that ARP8 phosphorylation by ATR is related to the recovery of stalled replication fork and the induction of cell death, and the formation of abnormal chromosomes after replication stress. These results suggest that ARP8 phosphorylation by ATR plays a role in maintaining genomic stability after replication stress.

研究分野：分子生物学

キーワード：ARP8 phosphorylation ATR replication stress

## 1. 研究開始当初の背景

放射線や抗がん剤により誘導された DNA 損傷は、その損傷の種類に応じたさまざまな修復機構により修復される。しかし、修復過程でのエラーから突然変異や染色体構造異常などが誘導され遺伝情報が改変されると、がんや白血病など悪性腫瘍の発症や増悪に繋がることが知られている。一方、がん治療の目覚ましい進歩により、がん患者、特に小児がん患者では生存期間が顕著に延長している。このため、二次がんの発症予防は非常に重要な課題である。二次がんを含めた発がんの分子機構の解明には、損傷 DNA を正確に修復するシステムの解明が必須である。しかし、染色体構造異常につながる修復過程でのエラー発生メカニズムについては、未だ不明な点が多い。

転写、複製、修復などの DNA 代謝の調節に係るクロマチン構造の変換を制御する INO80 複合体では、白血病を含む多くのがんにおいて、構成因子の様々な遺伝子変異が確認されており、INO80 複合体の機能と発がん機構との関連が示唆されている。我々は、二次性白血病の疾患特異的染色体異常として知られている 11q23 染色体転座をモデルにして染色体転座の分子機構の解明に取り組み、11q23 染色体転座を阻止するためには、ゲノム損傷シグナル因子 ATM リン酸化酵素が、11q23 に存在する MLL 遺伝子の染色体転座切断点集中領域 (BCR) への相同組換え修復 (HR) 関連因子 RAD51、RPA と INO80 の結合を負に制御することが重要であることを見出した。さらに ATM が INO80 複合体の構成因子 ARP8 をリン酸化することで、INO80 や RAD51 の BCR への結合を負に制御し、染色体転座を抑制することを報告した (図 1)。これらの知見から、ATM による ARP8 のリン酸化は、HR における

INO80 複合体の機能を負に制御することで、正確な修復を担保していることが示された。興味深いことに、ARP8 のリン酸化には、ATM だけでなく DNA 複製フォーク障害の修復に関与するリン酸化酵素 ATR も関わっている。さらに、ATM 阻害剤と ATR 阻害剤では、ARP8 リン酸化の抑制パターンが異なり、11q23 染色体転座の誘導率も異なるため、ATR による ARP8 リン酸化には ATM とは異なる生物学的意義が存在することが示唆された (図 2)。

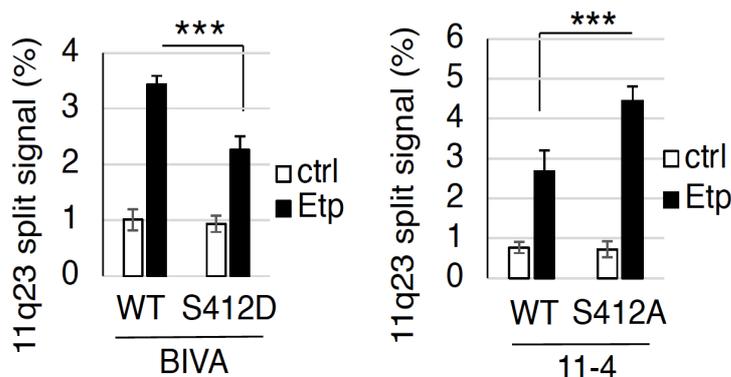


図 1 ARP8 のリン酸化はエトポシド関連の 11q23 染色体転座形成を抑制する

BIVA: ATM 活性欠損細胞、11-4: ATM 活性正常細胞

S412D: ARP8 リン酸化模倣型

S412A: ARP8 リン酸化欠損型

## 2. 研究の目的

染色体 DNA 損傷の修復過程に発生する何らかのエラーによって突然変異や染色体構造異常などが誘導されることにより遺伝情報が改変され、がんや白血病など悪性腫瘍の発症や増悪に繋がることが知られている。しかし、修復過程でのエラーの発生メカニズムあるいはエラーを抑制す

るメカニズムについては、未だ不明な点が多い。本研究では、DNA複製フォーク障害の修復制御におけるATRによるARP8リン酸化の役割を中心に取り組むことで、ARP8と発がん分子機構との関連について解明する。

### 3. 研究の方法

- 1、免疫沈降法を用いて、複製フォーク障害を誘導する薬剤を投与した前後の細胞を用いて複製フォーク障害においてATRによるARP8のリン酸化を確認する。
- 2、蛍光免疫染色法を用いてDNA二本鎖や複製フォーク障害のマーカーである $\gamma$ H2AX fociの定量的解析を行い、複製フォーク障害の誘導及び修復状況の動態を検討する。
- 3、DNAファイバー法を用いて、複製フォーク障害の修復におけるATRによるARP8リン酸化の役割を検討する。
- 4、コロニー形成アッセイ法を用いて、ARP8の野生型及びリン酸化変異型細胞の、複製フォーク障害誘導試薬に対する感受性を検討する。
- 5、FISH法を用いて、染色体異常の解析を行う。

### 4. 研究成果

本研究では生化学的及び細胞生物学的解析法を用いて検討した。まず、複製フォーク障害を誘導する薬剤で複製フォーク障害を誘導した後、ARP8がATRによってリン酸化されたことを確認した。また、ATR阻害剤を予め投与した細胞ではARP8のリン酸化がほぼ抑制された一方、ATMの阻害剤によるARP8のリン酸化の抑制は僅かであった。この結果から、複製フォーク障害に応じて主にATRがARP8をリン酸化することがわかった。そこで、DNAファイバー法を用いて、複製フォーク障害誘導後の修復におけるATRによるARP8リン酸化の意義の検討を行った。複製標識されたファイバーの長さを測定した結果、複製フォーク障害を誘導しない細胞では、野生型ARP8とリン酸化欠損ARP8のDNAファイバーの長さはほぼ同じであるが、複製フォーク障害誘導後では野生型ARP8とリン酸化欠損ARP8細胞の間でDNAファイバーの長さに違いが見られた。この結果から、ATRによるARP8のリン酸化は複製フォークの回復に関与していることが示唆された。さらに、ATRによるARP8のリン酸化の生物学的意義を細胞レベルで検討した。複製フォーク障害に対する感受性や染色体異常の誘導

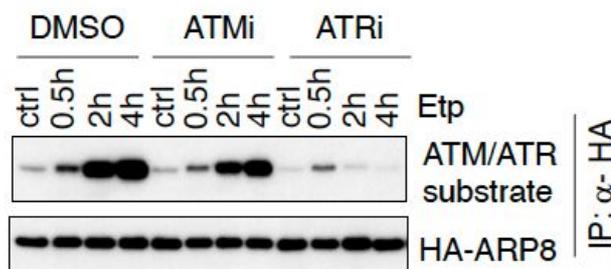


図2 HA-ARP8発現細胞抽出液を用いた免疫沈降法によるARP8のリン酸化の検討

を検討した結果、ARP8リン酸化の有無によって複製フォーク障害の感受性及び染色体異常誘導頻度が異なることがわかった。これらのことから、ATRによるARP8のリン酸化は、複製ストレス後にゲノム安定性を維持する役割を担っていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nobuki Imano , Ikuno Nishibuchi , Emi Kawabata , Yasuha Kinugasa , Lin Shi , Chiemi Sakai , Mari Ishida , Hiroaki Sakane , Tomoyuki Akita , Takafumi Ishida , Tomoki Kimura , Yuji Murakami , Kimio Tanaka , Yasunori Horikoshi , Jiying Sun , Yasushi Nagata , Satoshi Tashiro	4. 巻 195
2. 論文標題 Evaluating Individual Radiosensitivity for the Prediction of Acute Toxicities of Chemoradiotherapy in Esophageal Cancer Patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Radiat Res	6. 最初と最後の頁 244-252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1667/RADE-20-00234.1.	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 Shi L, Sun J, Kinomura A, Fukuto A, Horikoshi Y, Tashiro S.	4. 巻 166
2. 論文標題 Matrin3 promotes homologous recombinational repair by regulation of RAD51.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biochem.	6. 最初と最後の頁 343-351
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvz041	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 孫 継英
2. 発表標題 Prevention of chromosomal translocations by ATM- regulated phosphorylation of INO80 chromatin remodeling complex
3. 学会等名 第63回日本放射線影響学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 孫 継英
2. 発表標題 DNA複製ストレス応答における INO80複合体の役割
3. 学会等名 第5回放射線災害・医科学研究拠点カンファランス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jiying Sun and Satoshi Tashiro
2. 発表標題 The molecular mechanism of ARP8 phosphorylation in preventing 11q23 chromosomal translocations
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 孫 継英、堀越保則、田代聡
2. 発表標題 IN080 chromatin remodeling complex phosphorylation regulated by ATM prevents etoposide-induced chromosomal translocations
3. 学会等名 第63回日本放射線影響学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 孫 継英、堀越保則、田代聡
2. 発表標題 IN080クロマチン複合体のリン酸化が11q23染色体転座の形成を抑制する
3. 学会等名 第38回染色体ワークショップ 第19回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jiying Sun
2. 発表標題 Phosphorylated ARP8, a subunit of IN080 chromatin remodeling complex prevents etoposide-induced chromosomal translocations
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jiying Sun and Satoshi Tashiro
2. 発表標題 Prevention of 11q23 chromosomal translocations by ATM and ATR through the phosphorylation of ARP8.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 孫 継英
2. 発表標題 11q23染色体転座形成の抑制におけるIN080クロマチンリモデリング複合体のリン酸化の関与
3. 学会等名 第44回中国地区放射線影響研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 孫 継英
2. 発表標題 ATMとATRによるARP8のリン酸化が11q23染色体転座の形成を抑制する
3. 学会等名 第4回放射線災害・医科学研究拠点カンファランス
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究 分担 者	田代 聡  (Tashiro Satoshi)  (20243610)	広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授    (15401)	

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