

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20510053

研究課題名（和文）RAD18によるDNAポリメラーゼXファミリー制御の分子メカニズム

研究課題名（英文）Genetic interaction between Rad18 and checkpoint factors

研究代表者

立石 智（TATEISHI SATOSHI）

熊本大学・発生医学研究所・講師

研究者番号：00227109

研究成果の概要（和文）：Rad18 遺伝子を欠損するマウスは、加齢に伴い精巣の生殖細胞が枯渇し、生殖能力が減少した。細胞周期制御遺伝子である Chk2 と Rad18 を欠損するマウスから得られた初代培養細胞は、増殖速度が遅く細胞老化がみられることがわかった。この細胞では、細胞周期の進行のブレーキとなる p16, p21 および p53 タンパクが高く発現していた。また 1 本鎖 DNA に結合することが知られている RPA タンパクが核内に多くみられたことから、ATR 経路を介して細胞周期の進行が抑制され、細胞老化がおこると推論した。

研究成果の概要（英文）：Rad18 is required for long-term maintenance of spermatogenesis in mouse testes. We prepared fibroblasts from Chk2-Rad18 double knockout mice. The cells grew very slowly and exhibited cellular senescence. The Cdk inhibitors such as p16, p21 and p53 proteins were highly expressed in the cells. Many RPA protein foci were observed in the nuclei of the cells, thus we inferred that loss of Chk2 and Rad18 resulted in activation of ATR pathway and expression of Cdk inhibitors leading to low cellular growth and senescence.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：Rad18 Chk2 チェックポイント 細胞老化

1. 研究開始当初の背景 Rad18 遺伝子を欠損するマウスは、加齢に伴い精巣の生殖細胞が枯渇し、生殖能力が減少した。このため、Rad18 による損傷乗越え複製の制御は、幹細胞を長期的に維持するのに必要であり、Rad18 を欠損する幹細胞では細胞老化がおこる可能性があることが示唆された。

2. 研究の目的 生殖幹細胞の細胞老化を検出することは、技術的に困難であるため、複製フォークの安定性維持に関与することが知られている Chk2 遺伝子および Rad18 遺伝子を同時に欠損させて、その細胞の特徴を調べる。細胞老化がみられた場合には、その誘導機構の分子的基盤を明らかにする。

3. 研究の方法 Chk2 欠損マウスと Rad18 欠損マウスを掛け合わせて、Chk2・Rad18 2 重欠損マウスを作成する。そのマウスから繊維芽細胞を調製する。野生型細胞(WT)、Rad18 欠損細胞(Rad18<sup>-/-</sup>)、Chk2 欠損細胞(Chk2<sup>-/-</sup>)、Chk2・Rad18 欠損細胞(Chk2<sup>-/-</sup>Rad18<sup>-/-</sup>)の性質の解析は、以下のように行った。

- (1) 細胞増殖速度の測定: 通常酸素分圧である 20% または低酸素インキュベーターを用いて 3% 酸素分圧で培養を行う。細胞を複数の培養皿に播種し、培養を開始する。24 時間ごとに培養皿から細胞を剥離させた後に、細胞数を血球計算盤を用いて測定した。
- (2) 細胞老化の測定は、Senescence-associated B-galactosidase 染色により行った。
- (3) 複製フォークの進行速度の解析は、細胞を IdU で最初に蛍光標識した後に、CldU を用いて標識する。ゲノム DNA をカバーガラスの上に塗布した後に、蛍光顕微鏡を用いて写真を撮り、蛍光標識された DNA の長さを測定する。
- (4) 細胞核内 RPA 量の定量は、細胞を抗 RPA 抗体を用いて染色した後に、蛍光顕微鏡を用いて定量した。
- (5) ウェスタン解析は、定法により行った。

4. 研究成果 Rad18 Chk2 二重欠損マウスを作製した。このマウスは、ほぼ正常に誕生し発育した。この二重欠損マウスから胚性繊維芽細胞を樹立した。この細胞の増殖速度がきわめて遅く(図 1)、細胞老化をおこすことがわかった(図 2)。

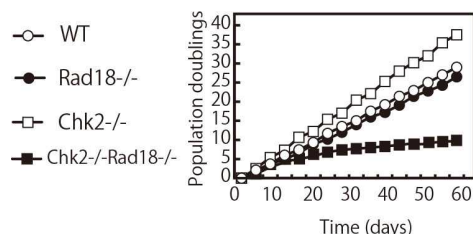


図 1. Chk2<sup>-/-</sup>Rad18<sup>-/-</sup>細胞では、増殖速度がきわめて遅い。

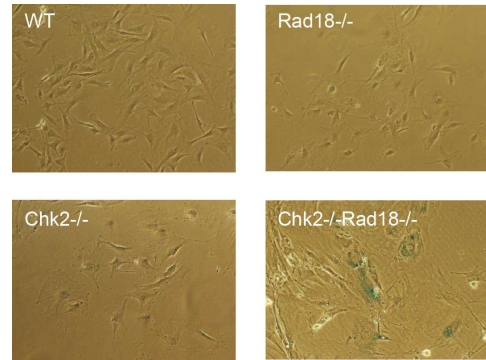


図 2. 各種のマウス細胞を培養後に Senescence-associated B-galactosidase 染色を行い、細胞老化を評価した。

複製ストレスとは、DNA 複製が突然停止する現象であり、細胞老化を引き起こす原因であると提唱されている。DNA の 1 分子解析(DNA coming, DNA fiber analysis)により、複製フォークの進行速度を測定した(図 3)。この結果、Rad18 欠損マウス初代細胞では野生型細胞に比べて複製フォークの進行速度が約 24% 遅くなっていた(図 4)。これに対して Rad18 Chk2 二重欠損細胞では、複製フォークの進行速度が野生型細胞と同程度まで回復していた。また Chk2<sup>-/-</sup>Rad18<sup>-/-</sup>細胞では、1 本鎖 DNA 領域に結合することが知られている RPA タンパクが核内で強く集積していた(図 5)。



図 3. 1 分子解析により、複製フォークの進行を蛍光分子により可視化した。

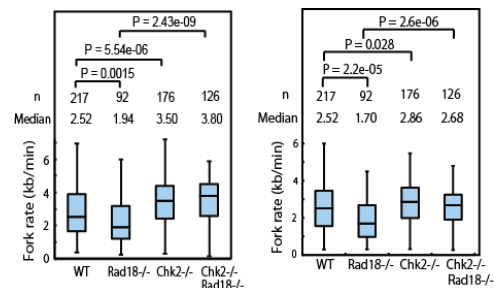


図 4. 1 分子解析により、各種の細胞での複製フォーク速度を定量した。

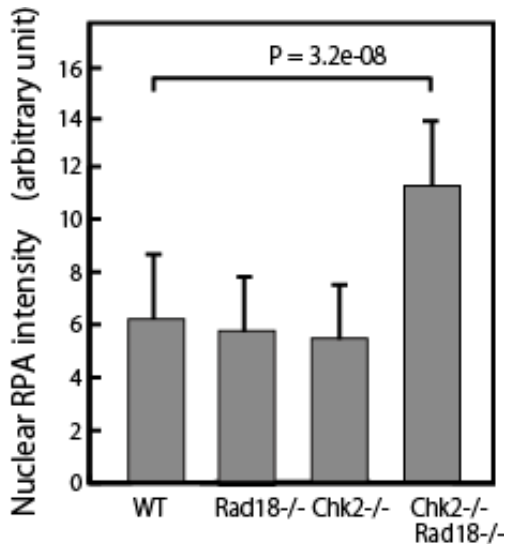


図 5. 各種の細胞での RPA タンパク量を定量し、グラフとして表した。

また、この細胞では、p53 および p21 および老化マーカーである p16 タンパクが強く発現していた(図 6)。Chk2<sup>-/-</sup>Rad18<sup>-/-</sup>細胞では、複製ストレスが増加し、RPA タンパクで覆われた 1 本鎖 DNA 領域が露出したため、細胞老化に必要なシグナル誘導がおこったと結論した。複数の遺伝子を欠損することにより細胞老化が誘導される現象を発見したので、これを「合成老化」(synthetic senescence)と名付けた。このため、Rad18 の機能を阻害することにより、Chk2 などのがん抑制遺伝子の異常による細胞増殖の亢進および発癌を抑制できることが示唆された(図 7)。

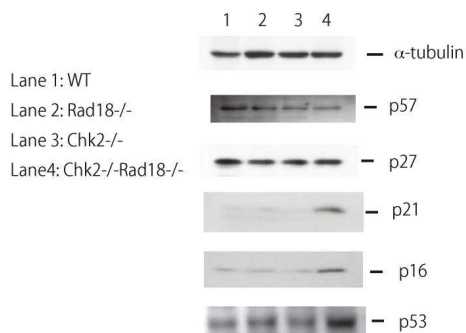


図 6. Chk2<sup>-/-</sup>Rad18<sup>-/-</sup>細胞では、p53 および

p21 および老化マーカーである p16 タンパクが強く発現していた。

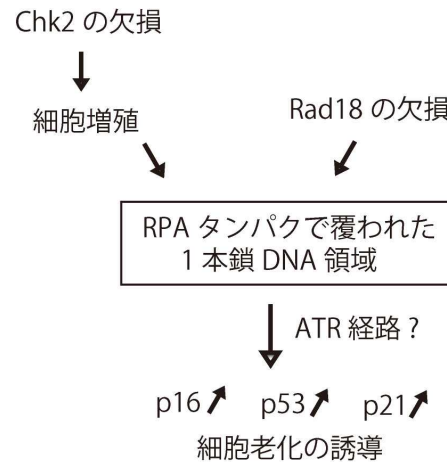


図 7. Chk2 および Rad18 遺伝子の欠損による細胞老化の誘導モデル

## 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 5 件)

- ① Hashimoto, K., Cho, Y., Yang, I., Akagi, J., Ohashi, E., Tateishi, S., Wind, N., Hanaoka, F., Ohmori, H., Moriya, M. The vital role of pol ζ and REV1 in mutagenic, but not correct, DNA synthesis across benzo[·]pyrene-dG and the recruitment of pol ζ by REV1 to a replication-stalled site. J. Biol. Chem. In press、査読有
- ② Nakazawa, Y., Sasaki, K., Mitsutake, N., Matsuse, M., Shimada, M., Ohyama, K., Ito, K., Masuyama, R., Kudo, T., Utani, A., Takenaka, K., Miki, Y., Nardo, T., Stefanini, M., Takahashi, Y., Yamashita, S., Tateishi, S., Lehmann, A., Yoshiura, K., Ogi, T. Exome sequencing identifies KIAA1530 as the causal gene for UV sensitive syndrome complementation group A (UVsS-A).

- Nat. genet. In press、査読有
- ③ Tateishi, S. A novel Rad18 ubiquitin ligase-mediated pathway for repair of camptothecin-induced DNA damage. **Cell Cycle** 10, 2057-2058 (2011) (News & Views)、査読有
- ④ Yanagihara, H., Kobayashi, J., Tateishi, S., Kato, A., Matsuura, S., Tauchi, H., Yamada, K., Takezawa, J., Sugasawa, K., Masutani, C., Hanaoka, F., Weemaes, C. M., Mori, T., Komatsu, K. NBS1 recruits RAD18 via a RAD6-like domain and regulates Pol  $\gamma$ -dependent translesion DNA synthesis. **Mol. Cell** 43, 788-797 (2011)、査読有
- ⑤ Hendel, A., Krijger, P. H., Diamant, N., Goren, Z., Langerak, P., Kim, J., Reibner, T., Lee, K. Y., Geacintov, N. E., Carell, T., Myung, K., Tateishi, S., D' Andrea, A., Jacobs, H., Livneh, Z. PCNA ubiquitination is important, but not essential for translesion DNA synthesis in mammalian cells. **PLoS Genet.** (9) e1002262. (2011)、査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① Tateishi, S., Watanabe, K., Sun, J., Iwabuchi, K., Yomogida, K. Rad18 is required for double-stranded break repair and long-term spermatogenesis. 第 34 回日本分子生物学会年会 ワークショップ Molecular mechanism of replication fork recovery pathways, 横浜市 パシフィコ横浜 2011 年 12 月 13-16 日
- ② Tateishi, S. Loss of *Rad18* alleles suppresses tumorigenesis in *p53*-null mice via cellular senescence. Gordon conference DNA Damage Mutation & Cancer, Ventura, U.S.A. 2012 March 25-30

[その他]  
ホームページ等

[http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/cell\\_genetics/index.html](http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/cell_genetics/index.html)

[http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/en/divisions/Cell\\_Genetics/index.html](http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/en/divisions/Cell_Genetics/index.html)

<http://www.cockayneresearchcare.jp/idea/journal5.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

立石 智 (TATEISHI SATOSHI)  
熊本大学・発生医学研究所・講師  
研究者番号：00227109