

機関番号：37114

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570007

研究課題名（和文） 新規アポトーシス誘導因子の単離とその分子機能解析

研究課題名（英文） Isolation and characterization of a new apoptosis-inducing factor

研究代表者

日高 真純 (HIDAKA MASUMI)

福岡歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：80238310

研究成果の概要（和文）：DNAのアルキル化損傷の一つである $O^6$ -メチルグアニンは突然変異を誘起するが、高等生物はこの損傷を持つ細胞にアポトーシスを誘導することでゲノムの安定性を維持している。その分子機構を明らかにするために、我々はジーントラップ法を用いて、アルキル化剤MNUに対し高感受性を示す *Mgmt*<sup>-/-</sup>細胞からMNU耐性を獲得した変異細胞株を分離し、その解析より新規アポトーシス誘導遺伝子 *Mapo1* を同定した。*Mapo1* 欠損変異株は、アルキル化剤処理後もアポトーシス誘導の指標であるミトコンドリアの膜透過性の亢進やカスパーゼ3活性の上昇は見られなかった。また、免疫沈降実験によりMAPO1は細胞内においてFLCNとAMPKと複合体を形成していることが明らかになった。それらの遺伝子に対するsiRNAを導入し遺伝子発現を抑制したところ、いずれの遺伝子のノックダウン細胞においても、sub-G<sub>1</sub> DNA量をもつ細胞の割合が有意に低下した。これらの結果は、MAPO1-FLCN-AMPK複合体が $O^6$ -メチルグアニンにより誘導されるアポトーシス経路で重要な機能を果たしていることを強く示唆している。

研究成果の概要（英文）： $O^6$ -Methylguanine ( $O^6$ -mG), produced in DNA by the action of simple alkylating agents, induces base mispairing during DNA replication and is thus responsible for the induction of mutations as well as tumors. To prevent such an outcome, organisms possess a mechanism to eliminate cells carrying  $O^6$ -mG by inducing apoptosis in a mismatch repair protein-dependent manner. To understand the molecular mechanism of  $O^6$ -mG-induced apoptosis, we carried out retrovirus-mediated gene-trap mutagenesis, followed by the selection of MNU-resistant clones from MNU-sensitive *Mgmt*<sup>-/-</sup> cells. One of the mutants has an insertional mutation in a novel gene, designated *Mapo1*, and was unable to induce mitochondrial membrane depolarization and caspase-3 activation, hallmarks for the induction of apoptosis, after treatment with MNU. The flag-tagged MAPO1 protein expressed in cells was revealed to be associated with FLCN and AMPK. By the introduction of siRNAs specific for these genes, the production of sub-G<sub>1</sub> population of cells following MNU treatment was severely suppressed, suggesting the important role of MAPO1-containing protein complex in the induction of apoptosis triggered by  $O^6$ -mG.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：DNA損傷、アルキル化剤、アポトーシス、遺伝子トラップ法、突然変異、発がん抑制、分子遺伝学、ミスマッチ修復タンパク質

### 1. 研究開始当初の背景

生体内での代謝反応やアルキル化剤などの化学物質によってDNA上の塩基は様々なアルキル化修飾を受ける。その中のひとつ  $O^6$ -メチルグアニン ( $O^6$ -meG) はDNA複製を阻害しない小さな傷で、修復されなければ複製に際してシトシン以外にチミンと対合するために、2回のDNA複製反応を経ることによりG:CからA:Tへの突然変異を引き起こす。このような突然変異を抑制するために、生物は大腸菌からヒトに至るまで高度に保存されたDNA修復酵素  $O^6$ -メチルグアニンメチルトランスフェラーゼ (MGMT) を有している。この酵素は  $O^6$ -meG のメチル基を酵素自身のシステイン残基に転移することにより  $O^6$ -meG を元のグアニンに修復する。この修復酵素を欠損した *Mgmt* ノックアウトマウスはアルキル化剤の致死作用に対して高感受性を示し、高濃度のアルキル化剤投与により死亡する。このマウスを解剖して組織を調べると、骨髄や腸管上皮などの特に増殖の盛んな組織が著しい損傷を受けており、この組織損傷はDNA中に  $O^6$ -meG を持つ細胞で引き起こされるアポトーシスに起因しており、そのアポトーシス誘導にはミスマッチ修復 (MMR) タンパク質が不可欠であることが明らかになった。さらに、MMR タンパク質を欠損してアポトーシスを誘導することが出来なくなったマウスではアルキル化剤投与後に多くのがんを生じたことから、このアポトーシスが、変異原性の  $O^6$ -meG をDNA上にもつ細胞を排除することにより、発がん抑制において重要な役割を果たしていることが明らかになった。そこでこのアポトーシス機構の解明は、生物学的、そして医学的にも重要であると考えられる。

### 2. 研究の目的

アポトーシスは、DNAに傷を持つ細胞を排除するうえで重要な役割を果たしている。ここで着目している  $O^6$ -meG はDNA複製を阻害しない小さな傷で、そのまま複製されると突然変異を誘起することが明らかになっており、そのような傷をもつ細胞を排除するアポトーシスの生物学的意義は大きい。申請者は、MMR タンパク質が Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) との相互作用を介して細胞周期のDNA合成期に  $O^6$ -meG とチミンの誤対合を速やかに認識し、その複合体がアポトーシスを誘導する機構を明らかにした (Hidaka et al., Nucl. Acids Res., 33,

5703-5712, 2005)。本研究では、遺伝学的手法を用いてアポトーシス誘導能に欠損を生じたマウス由来の突然変異細胞株を分離し、まず新規アポトーシス因子を同定することを目的とする。さらにその解析により、アポトーシス誘導の機構を分子レベルで明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

$O^6$ -meG を特異的に修復する酵素 MGMT を欠損する細胞は、アルキル化剤 MNU に対して高い感受性を示す。ところが、MMR タンパク質のようにアポトーシス誘導で機能するタンパク質を同時に欠損した細胞は、もはやアポトーシスを誘導できなくなりアルキル化剤に対して抵抗性を獲得する。そこで申請者は、この表現系をアポトーシス誘導欠損細胞のスクリーニング法に利用して、薬剤耐性遺伝子をもつレトロウイルスベクターを用いた遺伝子トラップ法により遺伝子挿入破壊株ライブラリーを構築し、その中からアルキル化剤に抵抗性を示す変異細胞株の分離を行う。これらの細胞株はアポトーシス誘導遺伝子が破壊されている可能性が高く、破壊された遺伝子は薬剤耐性遺伝子のDNA配列情報を手がかりとしたPCR法にて容易に同定できる。同定した遺伝子のアポトーシス誘導における機能は、変異株をアルキル化剤にて処理した際の突然変異頻度、ミトコンドリア膜の透過性等の解析により調べる。

### 4. 研究成果

(1) 薬剤耐性遺伝子をもつレトロウイルスベクターを用いた遺伝子トラップ法により遺伝子破壊株ライブラリーを構築し、その中からアルキル化剤 MNU に抵抗性を示す突然変異細胞株を分離した。その中の1つ KH101 株は、MNU に対する抵抗性を示すものの、MMS、ACNU、エトポシド、紫外線照射には感受性のままであった。

(2) MNU 処理された KH101 細胞株では、CHK1 のリン酸化などのDNA損傷シグナルの活性化は観察されたが、アポトーシス誘導の指標となるミトコンドリア膜の透過性の亢進やカスパーゼ3の活性化は見られなかった。そしてこの時、突然変異頻度がコントロール細胞に比べて優位に上昇していた。

(3) KH101 株における破壊遺伝子を同定し、その遺伝子を Map1 ( $O^6$ -methylguanine-induced apoptosis 1) と名付けた。データベースを検索したところ、

Mapo1 遺伝子は線虫からヒトまで種を超えて広く保存されていることがわかった。

(4) 免疫沈降法により、MAPO1 は、細胞内のエネルギーレベルに応答する AMPK とがん抑制遺伝子のひとつである FLCN と相互作用することを明らかにした。

(5) siRNA を用いた遺伝子ノックダウン法により、Mapo1、AMPK、FLCN の全ての遺伝子が O6-meG によって引き起こされるアポトーシス誘導において機能することを明らかにした。

(6) MNU 処理によるアポトーシス誘導時に、AMPK が MAPO1 と FLCN 依存的に活性化されることを明らかにした。

#### 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2件)

- (1) Komori K, Takagi Y, Sanada M, Lim T-H, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Sekiguchi M, Hidaka M: A novel protein, MAPO1, that functions in apoptosis triggered by O<sup>6</sup>-methylguanine mispair in DNA. *Oncogene*, 2009; 28, 1142-1150 (査読有り)
- (2) Takagi Y, Hidaka M, Sanada M, Yoshida H, Sekiguchi M. Different initial steps of apoptosis induced by two types of antineoplastic drugs. *Biochem. Pharmacol.* 2008; 76, 303-311 (査読有り)

[学会発表] (計10件)

- (1) Hidaka M, Sekiguchi M. Genome Integrity Preserved by Induction of Apoptosis from DNA Damage. The 57th NIBB Conference on Dynamic Genome. 2010. October 16, Okazaki, Japan
- (2) 日高真純、高木康光、林徳豪、中津可道、續輝久、佐野しおり、坂上竜資、関口睦夫。哺乳類細胞のゲノム安定性と細胞死。第82回大会日本遺伝学会、2010年9月20日
- (3) Hidaka M, Komori K, Takagi Y, Sanada M, Lim T-H, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Sekiguchi M. MAPO1 plays a role in the induction of apoptosis to preserve genome integrity from environmental stress. 第32回日本分子生物学会年会、2009年12月10日
- (4) Lim T-H, Hidaka M, Nakatsu Y, Sekiguchi M, Tsuzuki T. Characterization of Mapo1-defective mutant that is unable to induce apoptosis triggered by alkylated DNA

damage. 第32回日本分子生物学会年会、2009年12月10日

- (5) Sanada M, Takagi Y, Sekiguchi M, Hidaka M. A genetical approach to identify new genes related to apoptosis induced by alkylated DNA damage. 第68回日本癌学会学術総会、2009年10月1日
- (6) 日高真純、高木康光、真田正幸、Lim Teik-How, 中津可道、續輝久、関口睦夫。アルキル化損傷誘導アポトーシス経路で機能する MAPO1 タンパク質複合体。第81回大会日本遺伝学会、2009年9月16日
- (7) Hidaka M, Komori K, Takagi Y, Sanada M, Lim T-H, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Sekiguchi M. A new member of genes, Mapo1, involve in O<sup>6</sup>-methylguanine-induced apoptosis. The 3rd ASM Conference on DNA Repair and Mutagenesis. 2009. June 1, Whistler, BC, Canada
- (8) Hidaka M, Komori K, Takagi Y, Sanada M, Lim T-H, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Sekiguchi M. Identification of a novel apoptosis-inducing gene, Mapo1, using a method of retrovirus-mediated gene-trap mutagenesis. The 6th 3R Symposium. 2008. October 27-30. Tsumagoi, Japan
- (9) 日高真純、小森加代子、高木康光、真田正幸、Teik-How Lim, 中津可道、續輝久、関口睦夫。アルキル化損傷で誘導されるアポトーシス経路で機能する新規遺伝子 Mapo1. 第80回日本遺伝学会、2008年09月3-5日
- (10) Hidaka M, Sanada M, Takagi Y, Lim T-H, Nakatsu Y, Tsuzuki T, Sekiguchi M. Distinct pathways of apoptosis induced by alkylated DNA damage., , The International Ataxia-Telangiectasia Workshop 2008, 2008. April 22-26. Ohtsu, Japan

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

日高 真純 (HIDAKA MASUMI)  
福岡歯科大学・歯学部・教授  
研究者番号：80238310

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

中津 可道 (NAKATSU YOSHIMICHI)  
九州大学・医学（系）研究院・准教授  
研究者番号：00207820