

機関番号：82609

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20570173

研究課題名 (和文) 複製スキャフォールドを構成する AND-1 タンパクによるゲノム安定性維持機構の解明

研究課題名 (英文) Mechanisms of genomic stability maintenance by replication scaffold protein, AND-1

研究代表者

吉沢 直子 (須賀田 直子) (YOSHIZAWA NAKO (SUGATA NAKO))

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主任研究員

研究者番号：30344071

研究成果の概要 (和文)：

ヒト複製スキャフォールドを構成する AND-1 タンパク質は、複製部位に局在し、複製因子 Mcm7 や染色体接着因子コヒーシンと結合すること、DNA 合成やチェックポイント経路の活性化に必要であることがわかった。また、その発現抑制は DNA 損傷や細胞死を誘導すること、DNA 修復の効率を著しく低下することを見いだした。AND-1 は多様な因子と物理的相互作用をもち、その機能は DNA 合成期 (S 期) のゲノム安定性を維持するのに重要であることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Coordinated execution of DNA replication, checkpoint activation and postreplicative chromatid cohesion is intimately related to the replication fork machinery. Human AND-1 is localized at the replication scaffold, and is required for efficient DNA synthesis and its depletion increases DNA damage, delays progression of S phase, leads to cell death in cancer cells. AND-1 is also required for checkpoint activation in replication stress, inhibition of UV-RDS and homologous recombinational repair. This study indicates that AND-1 coordinates multiple cellular events in S phase and G2 phase.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 2009年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2010年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 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：生物科学・分子生物学

キーワード：DNA 複製、複製チェックポイント、複製フォーク、複製ストレス、DNA 修復、ゲノム不安定性、姉妹染色体交換

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究の背景

DNA 複製期 (S 期) に、一時的にゲノム DNA は染色体二重鎖を巻き戻され不安定な構造となり、細胞内外からの傷害を受ける危険に曝される。「複製チェックポイント」はゲノ

ムの複製が阻害された時、または損傷が発生した時、複製フォークを安全に停止し、損傷の修復などを誘導してゲノム安定性を維持するための重要なメカニズムである。真核生物で広く保存されているこの機構の要となるのは、ATR キナーゼとその下流の Chk1 など

のエフェクター分子である (Abraham ら, 2001)。近年、複製フォークと共に移動する「フォーク保護複合体」が、ATR の下流でフォークを安定に停止し、チェックポイントの活性化に関与することが明らかになってきた (加藤ら, 2003)。DNA 複製の立役者は二重鎖を開裂する Mcm ヘリケースや DNA ポリメラーゼを含む巨大な「複製複合体 (複製装置)」であるが、フォーク保護因子がこの複製装置の一部と相互作用することも報告され (Gambus ら, 2006)、フォーク保護複合体がチェックポイント機構と複製因子とを繋ぐ重要なキーファクターであると予測されていた。

(2) 本研究に先行する研究や研究代表者による予備的知見

これまで、研究代表者は、酵母のフォーク保護因子の機能ホモログである、ヒト Tipin, Timelss タンパク質の解析を行い、フォーク保護因子群が協調的に、ATR キナーゼのシグナルを伝達する分子であることを報告した (吉沢ら, 2007)。続いて、研究代表者らは酵母のフォーク構成因子 Ctf4/Mc11 のヒトホモログ AND-1 タンパク質に着目した。当時、ヒト AND-1 は WD リピート構造をもつ機能不明なタンパク質であったが、本研究に先立ち、以下の予備的な知見を得ていた。①AND-1 は恒常的に核に発現し、S 期にクロマチン画分へ移行する。②AND-1 の局在は PCNA の局在 (複製部位) に隣接し、複製の進行に伴い大きく変動する。③複製停止により AND-1 はリン酸化される。④AND-1 の短時間な発現抑制によりチェックポイントが抑制される。⑤AND-1 の発現抑制により細胞死が誘導される。⑥AND-1 は細胞接着因子コヒーシン Smc1 と結合する。

また、本研究開始の直前、Zhu らにより AND-1 が DNA ポリメラーゼ・や Mcm10 と相互作用すると報告された (2007) が、AND-1 の機能はいまだ未知であった。

そこで研究代表者はこれらの知見を統合して、AND-1 が、ポリメラーゼ・を含む「複製装置」、Smc1 を含む「コヒーシン複合体」、Mcm10 を含む「複製足場構造」との相互作用を通じて、これらを結びつける「複製スキャフォールド」を形成する役割を果たしているとのモデルを構想した。本研究では AND-1 が複製スキャフォールド構造の形成や維持を介して、DNA 複製やチェックポイント活性などのシグナル伝達においてどのような役割を果たすかを明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

(1) AND-1 タンパク質の細胞周期、複製チェックポイントにおける機能を解明する

①細胞周期の各ステージや複製停止時の

発現量や局在変化を調べる

②AND-1 を RNAi で発現抑制した時の、複製制御因子、フォーク保護因子、チェックポイント因子の修飾や活性化、発現量を調べ、チェックポイントやスキャフォールド複合体形成における機能を明らかにする。

(2) AND-1 タンパク質発現抑制に誘導される細胞死のメカニズムの解析を行う。

(3) ゲノム不安定化に拮抗する AND-1 の未知の機能を明らかにする。

(4) 未知の因子を含めた複製スキャフォールド構成因子の同定を行う。

3. 研究の方法

(1) 細胞増殖と DNA 合成: 本研究においては主に、癌細胞である HeLa、U2OS 細胞を用いた。細胞周期同調は、チミジンによる G1/S 同調を用いた。DNA 合成は BrdU を 30 分間取り込ませたあと除去し、その後 4 時間ごとの細胞を抗 BrdU 抗体で染色した後フローサイトメトリーにかけて解析を行った。

(2) 遺伝子発現の抑制 (RNAi): 標的となる遺伝子の siRNA を作製し、Oligofectamine トランスフェクション試薬を用いて細胞に導入した。発現抑制をイムノブロットで確認した。

(3) 細胞死と DNA 損傷の検出: 細胞を Hoechst33342 で処理し、細胞核の形態を観察して死細胞を数えた。免疫染色により H2AX および Smc1S917 のリン酸化を検出し、染まった細胞を観察し頻度を計測した。

(4) 複製ストレスの処理: 細胞にヒドロキシ尿素 (複製阻害剤: 1 から 5 mM) の添加、または UV 照射 (1 から 5J/m²) を行い、一定時間後 (1 から 6 時間後) に回収した。

(5) イムノブロットおよび免疫沈降: 細胞抽出液を電気泳動し、PVDF 膜に転写して各種抗体を用いて検出した。抗体は抗 Chk1 抗体と S317、S345 のリン酸化抗体、Smc1 と S957 のリン酸化抗体、Chk2、RPA 抗体などを用いた。免疫沈降は、細胞抽出液に抗 AND-1 抗体を加えて結合させ、protein A/G セファロースで沈降させて複合体をイムノブロットにて解析した。抗 AND-1 抗体はウサギで作製した。グルタチオン-S-トランスフェラーゼを融合した AND-1C 末端 (712-1129aa) を抗原とし、精製したタンパク質を免役したウサギ抗血清をアフィニティー精製して用いた。

(6) UV 抵抗性 DNA 合成 (UV-RDS) の検出: 細胞を RNAi で発現抑制した後、UV (5J/m²) を照射して 1 時間後に [³H]チミジンを 1.5 時間取り込ませて細胞を回収した。あらかじめ取り込ませておいた [¹⁴C]チミジンで細胞数

を補正し、コントロールとの比を計算した。

(7) 相同性組換え修復アッセイ：アッセイには Mohindra らが樹立した SW480sn3 細胞を用いた。I-SceI エンドヌクレアーゼ発現ベクターをトランスフェクションにて細胞に導入した。あらかじめゲノムに組み込んだ I-SceI サイトは機能を持たないネオマイシン遺伝子の中にあり、二重鎖切断された制限酵素サイトが遺伝子座内相同組換えまたは不均等姉妹染色分体組換えにより相同組換え修復された時のみネオマイシンが復活し薬剤耐性を獲得する。ネオマイシン存在下でのコロニー形成率を測定し修復効率を調べた。

(8) 姉妹染色体交換 (SCE) アッセイ：RNAi でフォーク因子タンパク質の発現を抑制し、BrdU を 2 細胞周期取り込ませたのちコルセミドで 2 時間処理し、M 期染色体をスライドガラスに固定する。1M Na₂HPO₄ で 80° C、10 分間処理したあと、ギムザ染色を行い、SCE を顕微鏡で観察して頻度を計測した。

4. 研究成果

(1) AND-1 の細胞増殖・DNA 複製における機能：AND-1 の機能解析を行う目的で RNAi により発現を抑制した。ヒト癌細胞 (HeLa および U2OS) においては、AND-1 発現抑制後 48-72 時間後に激しく細胞死が誘導され増殖が抑制された (図 1)。これは以前報告した Cdc7 発現抑制時の結果と同程度であった (吉沢ら, 2005)。このとき、DNA 損傷のマーカであるヒストン H2AX のリン酸化 (γH2AX) が増加し、また、DNA 損傷時に特徴的な Smc1 のリン酸化も観察されることから DNA の損傷が誘導されていると考えられる。

DNA 複製と細胞周期への影響を見るため、細胞に核酸のアナログであるブロモデオキシウリジン (BrdU) で一時的に標識したところ、AND-1 を発現抑制した細胞ではコントロールの 50% に BrdU の取り込みが低下した。また、その後の S 期の進行も遅れた。以上のこ

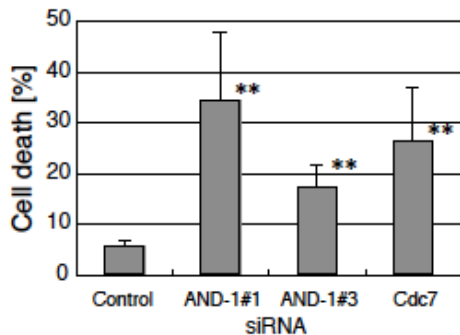


図 1. AND-1 発現抑制 77 時間後の細胞死

とから、AND-1 は効率の良い DNA 複製と S 期の進行に必要なことがわかった。

AND-1 の核内局在を、自作した抗 AND-1 抗体を用いて調べたところ、特に S 期後期においては複製部位に位置することが知られる RPA のごく近傍にあった (図 2)。また、前複製複合体因子 Mcm7 が AND-1 を結合する子とも見いだした。以上のことから、AND-1 は複製部位に局在し、DNA 複製が正常に行われるのに必要な因子であることがわかった。

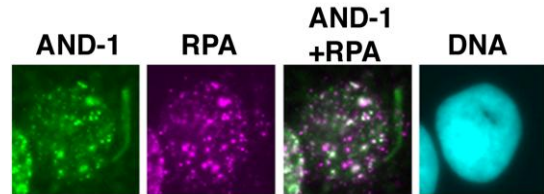
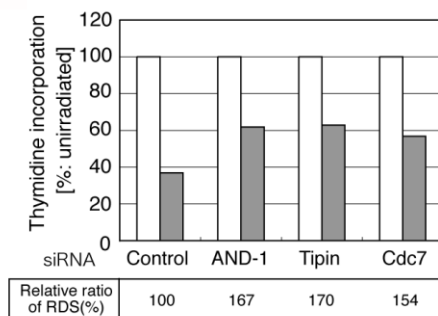


図 2. AND-1 の核内局在 (S 期後期)

(2) AND-1 の複製チェックポイントにおける機能：複製チェックポイントがはたらくと、Chk1 は ATR によりリン酸化されて活性化し、Chk1Ser317 および Ser345 のリン酸化が起こる。AND-1 が発現抑制したところ、ヒドロキシ尿素や紫外線照射後でも、Chk1 が十分リン酸化されず、活性化が抑制された。また、通常、チェックポイントが正常であれば低レベルの UV 照射後でも DNA 合成の抑制が起こるが、AND-1 を発現抑制するとその抑制が弱く、DNA 合成 (UV 抵抗性 DNA 合成) が 67% 更新していることが観察された (図 3)。このことは AND-1 が無いと DNA 合成を安定に停止することができず、さらに重大な損傷や異常な複製を引き起こす可能性を示唆している。これらのことから AND-1 は、以前報告したフォーク因子 Timeless, Tipin や、Cdc7 キナーゼと同様、複製チェックポイントに必要なことがわかった。



複製停止により AND-1 は ATR および Cdc7

図 3. AND-1 発現抑制による紫外線抵抗性 DNA 合成誘導

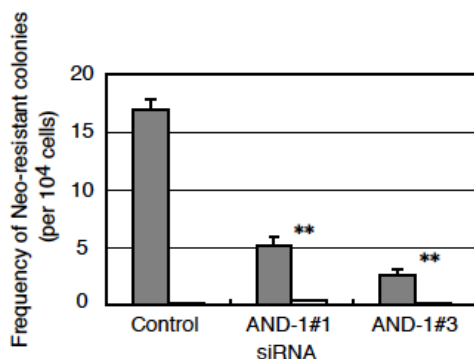
に依存的にリン酸化されることも明らかにした。ヒト HeLaS3 細胞では複製停止時に AND-1 タンパク質の 319-351aa および

391-429aa の領域がリン酸化されることを質量分析により同定した。これらの部位は種を超えて保存されている WD 反復モチーフの下流で酸性アミノ酸に富む領域であり、この部位のリン酸化の生理学的な意義の解明は今後の課題である。

(3) AND-1 の姉妹染色体接着と相同組換え修復における機能：複製チェックポイントの活性化の抑制は複製フォーク因子の RNAi による発現抑制に伴う、共通する現象である。しかしフォーク因子 Timeless がなくても細胞の生存にはあまり影響ないのに対し AND-1 が無いと細胞死が誘導されることから、AND-1 は複製ストレス応答において、チェックポイントの活性化という初期の段階だけでなくその後の経路にも必要であると予想した。まず、酵母ホモログ Ctf4/Mc11 の解析で指摘されている姉妹染色体接着の維持機能について調べたところ、ヒト癌細胞では、AND-1 が無いと姉妹染色体接着が部分的に弱まることを見いだした。予備的な知見により

図 4. AND-1 発現抑制による相同組換え修復能の低下

AND-1 は染色体接着に必要なコヒーシン分子 Smc1, Smc3, Rad21 と結合することを見いだしており、AND-1 がコヒーシン複合体と協調的に姉妹染色体接着に関与しているがある。次に DNA 損傷修復における AND-1 の機能を解析した。DNA 二重鎖切断は放射線や複製阻害により誘導される重篤な DNA 損傷であるが、これを修復する「エラーフリーな経路」である相同組換え修復における AND-1 の機能を調べた。エンドヌクレアーゼによる人工的な DNA 二重鎖切断に誘導されるネオマイシン遺伝子回復修復を利用したアッセイ法 (Johnson ら, 1999; Mohindra ら, 2002) を利



用し解析を行ったところ、AND-1 の発現抑制は相同組換え修復の効率を著しく阻害することが明らかになった (図 4)。コヒーシンは相同組換え修復に必須な因子であるが、注目すべきことに、今回用いたアッセイ系においてはコヒーシン複合体タンパク質は AND-1 と逆の結果を示すことが報告されている

(Potts ら, 2006)。すなわち、AND-1 はコヒーシンタンパク質とは別経路で相同組換え修復に関与することがこの実験により示唆された。

(4) AND-1 の姉妹染色体交換における機能：AND-1 の相同組換え修復の一つの重要なステップである、姉妹染色体交換 (SCE) 反応における AND-1 の機能を調べた。癌細胞では外的な DNA 損傷誘導や複製阻害など処理をしなくても低い一定の割合で、自然に SCE 反応が起こることが知られている (図 5、矢印は SCE の起こった染色体上の位置)。HeLa 細胞では 1 細胞当たり 3.9 回の頻度で SCE が観察されたが、AND-1 を発現抑制すると 2.2 回 (siRNA#3) または 2.7 回 (siRNA#4) に減少した (図 6)。興味深いことに、フォーク因子 Timeless の発現抑制においては、SCE の頻度が著しく亢進することを見いだしており (Urtishak ら, 2009, および吉沢ら, 未発表)、AND-1 とは逆の効果であった。このことは、フォーク因子群は弱い複製ストレス存在下では、ゲノム構造の維持や構造変換において異なる作用を持つ可能性を示す。

図 5. HeLa 細胞の姉妹染色体交換の例

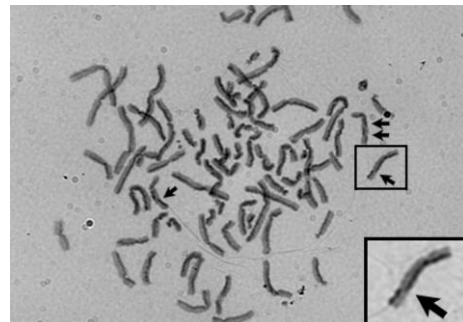
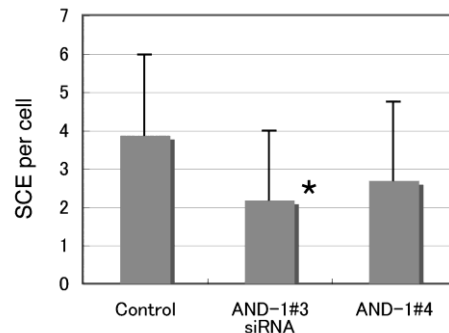


図 6. AND-1 発現抑制による姉妹染色体交換頻度の低下

(5) 得られた成果の国内外における位置づ



けとインパクト

本研究でテーマに取り上げているゲノム安定性維持とは、特に多細胞生物においては生命の恒常性維持に必要な、高度に保存されたメカニズムである。最近では、その破綻が、がんや神経疾患、先天発育不全など多くの疾

患を引き起こすと考えられている。中でも、複製ストレスはゲノム安定性を脅かす最たる原因の一つであり、複製チェックポイント機構はこれに拮抗する重要な機能をもつ。本研究は、先立つ研究(基盤研究(C)18570169)、2006-2007年)の成果から、ゲノム不安定性の回避においてフォーク安定化因子が重要な役割を果たすと確信して始まったものであるが、当時まだ機能が不明であったフォーク因子 AND-1 に着目して未知の機能を明らかにすることができた。その結果、AND-1 が DNA 複製や複製チェックポイントの活性化に必要である、といったある程度予想された機能だけでなく、複製ストレス後の DNA 修復や姉妹染色体交換に必要である、といった、別のゲノム動態制御においても重要な機能を持つことを発見した。本研究を皮切りに、AND-1 を含むフォーク複合体の機能解析 (Errico ら, 2009; Jun-Sub ら, 2009; Wawrousek ら, 2010) や、AND-1 の生化学的解析 (Vladimir ら, 2010) など多くの報告が後に続き、現在も世界的に活発に研究が行われている。また、本研究の成果は、複製開始やクロマチン構造変換、チェックポイントなど、より広範な分野の最新の知見をまとめた世界的に権威ある総説誌 (5. 雑誌論文 1 参照) に執筆する機会を得て、本研究を歴史的な発見の一端として世界に発表することができたのも幸運であった。

(6) 今後の展望

研究開始時には、AND-1 は他のフォーク因子 Timeless, Tipin, Claspin などと共通する機能をもつと予想していた。しかし、本研究により、細胞の生存への要求性がフォーク因子により異なること、また、DNA 組換え修復に必要なステップである姉妹染色体交換において AND-1 は必要であるが Timeless はこれに関与しない、という新しい事実が明らかになった。この事実は、フォーク因子が一つの固定した複合体でなく、複製ストレスという状況に応じて臨機応変な応答をする、シグナル伝達の要として機能する可能性を示唆する。現在のところ、その制御機構は不明であるが、初歩的な知見として複合体に構成因子の異なるサブコンプレックスが存在することを見いだしている。既に着手している複製スキャフォールドタンパク質 (AND-1 および Timeless) の複合体精製とその質量分析といったプロテオミクスなどの手法を用いて、複合体の詳細な解析を行う予定である。また、細胞死誘導においてはフォーク因子が間で機能が異なることを示唆する知見を得ており、個体としてのゲノム安定性維持機構とも言える細胞死・細胞老化において、個々のフォーク因子がもつ役割を解明することも期待される。今後、続く研究(基盤研究(C)23570247, 2011-2013年)においては、これ

らの基礎的な知見を統合し、ゲノム不安定性に起因する、がんや神経疾患などの病態のメカニズムの解明を目指したい。

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. Hisao Masai, Seiji Matsumoto, Zhiying You, Naoko Yoshizawa-Sugata, and Masako Oda. (2010) Eukaryotic DNA Replication: where, when and how? *Annual Review of Biochemistry*, 査読有、79, p89-130

2. Naoko Yoshizawa-Sugata and Hisao Masai. (2009) Roles of human AND-1 in chromosome transactions in S phase. *J. Biol. Chem.*, 査読有、284 (31), p20718-20728

[学会発表] (計 8 件)

1. Naoko Yoshizawa-Sugata and Hisao Masai: "Roles of human replisome component AND-1 and Tim in S phase chromosome transaction". 7th 3R Symposium 2010.10.28, Toyama conference center, Toyama (ポスター発表)

2. Hisao Masai, Seiji Matsumoto, Motoshi Hayano, Yutaka Kanoh, Satoshi Yamazaki, Satomi Kudo, Naoko Kakusho, Rino Fukatsu, Naoko Yoshizawa, Ai, Ishii: "Regulation of origin firing program and checkpoint by Cdc7, Mrc1 and Rif1". 7th 3R Symposium 2010.10.29, Toyama conference center, Toyama (口頭発表)

3. Naoko Yoshizawa and Hisao Masai: "Human AND-1 is required for efficient DNA replication, checkpoint activation and homologous recombinational repair". 第32回日本分子生物学会年会 2009.12.9-12, パシフィコ横浜 (口頭・ポスター発表)

4. Hisao Masai, Satoshi Yamazaki, Motoshi Hayano, Yutaka Kanoh, Seiji Matsumoto, Naoko Kakusho, Ai, Ishii, Michie Shimmoto, Masako Oda, Naoko Yoshizawa, Sayuri Itoh, Satomi Kudo: "Regulation of replication program and maintenance of genetic integrity". 第33回日本分子生物学会 (BMB2010) 2010.12.10, 神戸ポートアイランド (口頭発表)

5. Naoko Yoshizawa-Sugata and Hisao Masai: "Human AND-1 is required for efficient DNA replication, checkpoint

activation and homologous recombinational repair” . 6th 3R Symposium 2008.10.27-10.30, Tsumagoi, Shizuoka (ポスター発表)

6. Hisao Masai, Motoshi Hayano, Seiji Matsumoto, Yutaka Kanoh, Michie Shimmoto, Mika Yokoyama, Taku Tanaka, Naoko Kakusho, Naoko Yoshizawa, You Zhiying, Sayuri Ito, Chika Taniyama and Ai Ishii “Regulation of replication fork in maintenance of genomic integrity” 6th 3R Symposium 2008.10.27-30, Tsumagoi, Shizuoka (招待講演)

7. Naoko Yoshizawa-Sugata and Hisao Masai : “Human AND-1 is required for efficient DNA replication, checkpoint activation and homologous recombination repair.” EMBO Conference on Replication and Segregation of Chromosomes, 2008.6.16-6.20, Geilo, Norway (ポスター発表)

8. Hisao Masai, Motoshi Hayano, Seiji Matsumoto, Yutaka Kanoh, Mika Yokoyama, Michio Shimmoto, Naoko Kakusho, Naoko Yoshizawa, and Taku Tanaka “Regulation of replication fork integrity during S phase.” 第 31 回日本分子生物学会 (BMB2008), 2008.12.9-12, 神戸ポートアイランド (シンポジウム口頭発表)

[その他]

ホームページ

<http://rinshoken.igakuken.or.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉沢 直子 (須賀田 直子)

(YOSHIZAWA NAOKO (SUGATA NAOKO))

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床

医学総合研究所・主任研究員

研究者番号：30344071

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし