

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K07614

研究課題名（和文）複製ストレス応答における癌抑制因子の新機能と染色体不安定化の抑制機構の解明

研究課題名（英文）The tumor suppressor p130RB2 functions in replication stress response and suppression of chromosome instability

研究代表者

内田 千晴（UCHIDA, Chiharu）

浜松医科大学・光医学総合研究所・准教授

研究者番号：60223567

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：細胞の増殖は適切なDNA複製と分裂のメカニズムによってコントロールされている。細胞内外の障害によってDNA複製が異常な停止状態に陥ると、正しいDNA複製が完了しないまま細胞分裂が進まないよう複製ストレス応答という反応が起き、細胞の増殖は一時停止する。本研究において我々は、がん抑制因子p130RB2がATRというリン酸化酵素の活性化に働き、複製ストレス応答経路に積極的に関与していることを見出した。p130RB2が機能しない細胞では、染色体の異常が引き起こされ、細胞が正常に生存できないことがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん抑制因子RBファミリーの一つであるp130RB2が機能しない場合、適切な複製ストレス応答が起こらず、細胞の染色体異常や増殖異常を誘発することが示された。したがって、がん抑制因子p130RB2はDNA複製の異常時に対応して染色体を守るという、これまで明らかでなかった機能をもつことがわかり、がん抑制因子としての重要性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：Proper DNA replication and division control cell proliferation. When intracellular or extracellular disturbances aberrantly arrest DNA replication, replication stress responses occur to prevent cell division from proceeding without completing correct DNA replication, resulting in a pause in cell proliferation. In this study, we found that the tumor suppressor p130RB2 is actively involved in the DNA replication stress response by activating ATR, one of the critical phosphorylation enzymes in the DNA damage response pathway. p130RB2 dysfunction causes chromosomal aberrations and prevents normal cell growth.

研究分野：がん研究、細胞周期、DNA損傷応答

キーワード：がん抑制因子 p130RB2 複製ストレス 染色体不安定性

## 1. 研究開始当初の背景

細胞の増殖は適切な DNA 複製と分裂のメカニズムによってコントロールされている。紫外線や薬剤などが引き起こす障害によって DNA 複製が異常な停止状態に陥ると、DNA 複製が完了しないまま細胞分裂が進まないよう DNA 複製ストレス応答という反応が起き、細胞の増殖は一時停止する。DNA 複製ストレス応答で重要な ATR (ATM and Rad3 related serine threonine kinase) 活性化の機序において、詳細が明らかでない点が残されていた。

がん抑制因子 RB ファミリータンパク質 (pRB、p130RB2、p107) は、細胞周期進行の抑制 (細胞増殖の抑制) および染色体不安定化の抑制において重要な役割を持つことが知られている。これまで pRB が DNA 複製に関与していることが示されていた。しかしながら、その分子メカニズムは部分的にしか解明されておらず、特に DNA 複製ストレスに対する RB ファミリーの役割はほとんど不明であった。

## 2. 研究の目的

我々の研究開始当初の予備的実験で、がん抑制因子 p130RB2 が ATR 活性化因子と相互作用することが示唆された。そこで ATR 活性化因子および p130RB2 の DNA 複製ストレス (以下、複製ストレスと略) 応答における役割を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

複製ストレス応答の研究で汎用される培養細胞系を用い、ノックダウン法により p130RB2 機能を喪失させた場合に生じる ATR 活性化への影響を調べた。複数の ATR 活性化因子と p130RB2 の相互作用、細胞内の存在部位、複製ストレス解除後の DNA 複製の回復度、染色体の正常性、および細胞生存能について解析した。

## 4. 研究成果

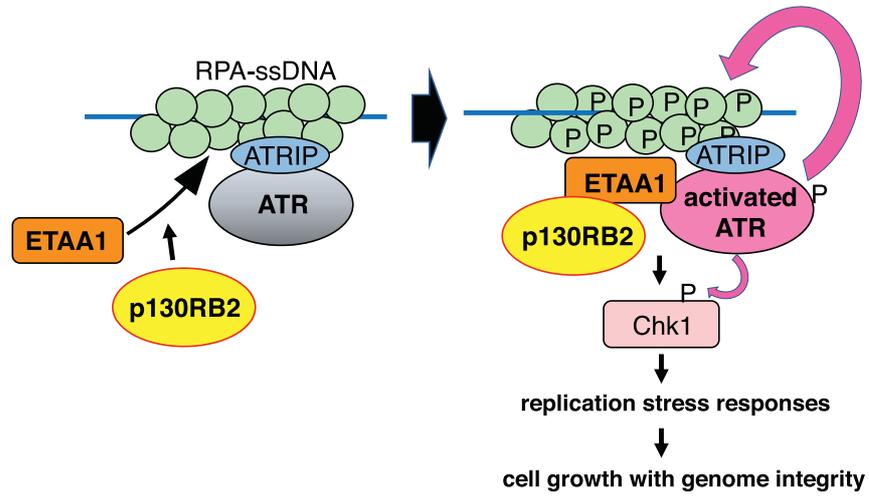
「概要」複製ストレス応答は、正常な染色体の維持のために重要である。本研究において、がん抑制因子 p130RB2 が機能しない場合、適切な複製ストレス応答が起こらず、細胞の染色体異常や増殖異常を誘発することが示された。したがって、p130RB2 は、DNA 複製の異常時に対応して染色体を守るといふ、これまで明らかではなかった機能を持つことがわかり、がん抑制因子としての重要性を示すことができた。

### 「研究結果」

ATR 活性化の特徴である RPA32、Chk1 のリン酸化 (RPA32pS33, Chk1pS345) が、p130RB2 ノックダウンによって減少することがわかった。p130RB2 は、ATR 活性化因子の一つである ETAA1 に結合し、p130RB2 ノックダウンは RPA32-ETAA1 相互作用を阻害することも見いだした。

また p130RB2 ノックダウンは、複製ストレス除去後に、一本鎖 DNA の残存と S 期再開の遅延を引き起こした。

さらに p130RB2 ノックダウンは、複製ストレス除去後に、異常な染色体である anaphase bridge の増加と細胞生存率の低下をもたらした。重要なことに、p130RB2 を遺伝子導入によって発現回復させると、p130RB2 ノックダウン細胞の異常な表現型が改善した。このように、p130RB2 が複製ストレスにおける RPA32-ETAA1-ATR 活性化経路に働き、染色体安定性を維持するために積極的に関与していることが示された。



これらの成果を国際誌に発表 (Uchida, et al., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1870, 119484-119499, 2023) した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Uchida Chiharu, Niida Hiroyuki, Sakai Satoshi, Iijima Kenta, Kitagawa Kyoko, Ohhata Tatsuya, Shiotani Bunsyo, Kitagawa Masatoshi	4. 巻 1870
2. 論文標題 p130RB2 positively contributes to ATR activation in response to replication stress via the RPA32-ETAA1 axis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research	6. 最初と最後の頁 119484 ~ 119499
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamcr.2023.119484	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内田千晴、丹伊田浩行、酒井聡、大畑樹也、塩谷文章、北川雅敏
2. 発表標題 p130RB2は複製ストレス応答におけるATR活性化へ正に関与する
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 内田千晴、丹伊田浩行、塩谷文章、北川雅敏
2. 発表標題 複製ストレス応答-ATR活性化におけるp130RB2の正の役割
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023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	塩谷 文章  (Shiotani Bunsyo)  (10627665)	国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・ユニット長    (82606)	

6. 研究組織（つづき）

	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	丹伊田 浩行  (Niida Hiroyuki)  (20336671)	浜松医科大学・医学部・准教授    (13802)	
研究分担者	北川 雅敏  (Kitagawa Masatoshi)  (50294971)	浜松医科大学・医学部・教授    (13802)	

	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
研究協力者	飯島 健太  (Iijima Kenta)		
研究協力者	合田 真  (Goda Makoto)		
研究協力者	堀口 涼  (Horiguchi Ryo)		

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