

## 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 25 年 5 月 17 日現在

研究種目：基盤研究（C） 機関番号：12301  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22590264  
 研究課題名（和文） 熱ショック応答機構による DNA 損傷応答の制御機構-細胞のがん化と老化における役割  
 研究課題名（英文）Regulation of the DNA damage response mediated by the heat shock response  
 研究代表者  
 小田 司（ODA TSUKASA）  
 群馬大学・生体調節研究所・助教  
 研究者番号：10323643

研究成果の概要（和文）：1) 分子シャペロン HSP90 が、突然変異に関わる Y-ファミリーDNA ポリメラーゼ REV1 の細胞内安定性や DNA 損傷部位への集積を制御していることを明らかにした。2) 熱ショック応答転写因子 HSF1 を RNAi で抑制すると、DNA 損傷応答の活性化が誘起されずに細胞老化が誘導されることを見いだした。この過程において、p53 の安定化と p21 の発現誘導が必要であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：1) We found that the molecular chaperone HSP90 regulates the stability of REV1, a Y-family DNA polymerase, and accumulation of REV1 at DNA damage sites. 2) We showed that suppression of heat shock transcription factor (HSF1) induces cellular senescence mediated by activation of p53-p21 pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：DNA 損傷、複製ストレス、HSP90、損傷乗越え DNA 合成、熱ショック応答、HSF1、細胞老化、p53

## 1. 研究開始当初の背景

紫外線、化学物質、酸化ストレスや発がん

遺伝子の活性化など細胞内外の様々な因子は、ゲノム DNA に損傷を与え、DNA 修復、細

胞周期、遺伝子発現の変化などの DNA 損傷応答 (DNA Damage Response: DDR) を引き起こす。DDR は細胞のがん化や老化と密接に関係しており、その先天的異常は、高発がんや早老症をはじめとする様々な疾患の原因となる。近年 DDR の分子機構については飛躍的に解明が進み、細胞の代謝や環境などの諸要因が DDR の制御を介して細胞のがん化や老化に影響する仕組みに注目が集まっている。

熱ショック応答系 (Heat Shock Response, HSR) は、HSP90 や HSP70 などの分子シャペロンと、これらの発現に関わる転写因子 HSF1 とから構成されている。HSR は、熱などの蛋白質変性ストレスに対処する機構として知られるが、非ストレス時においても蛋白質の folding を促進し、プロテアソームなどと協同して、蛋白質の機能や発現量を制御する。中でも HSP90 は特に細胞生存・増殖に重要な働きをする蛋白 (増殖因子受容体、転写因子、テロメラーゼなど) を基質とする。

我々は、「FA/BRCA 経路」(先天性骨髄不全と家族性乳がんの原因遺伝子群の産物蛋白が形成するゲノム安定化機構)の制御機構を解析する経過において、HSP90 がその構成蛋白 FANCA の安定化と核移行を介して本経路の活性化に必要であることを見いだした (*Blood* 109:5016, 2007)。続いて、損傷乗り越え DNA 合成 (TLS) に関与する Y-family ポリメラーゼのひとつ Pol- $\eta$  が HSP90 によって制御されることを見いだした (*Mol Cell* 37:79, 2010)。しかし、Pol- $\eta$  以外の Y-family ポリメラーゼに対する HSP90 の関与は明らかになっていない。

一方、HSF1 が発がんを強力に促進することが示された (Dai et al. *Cell* 130:1005, 2007) が、その作用機構はいまだ解明されていない。

我々は、ヒト細胞における HSF1 の抑制が細胞老化を引き起こすことを見いだした。また、HSF1 抑制は、DNA 架橋剤による DNA 損傷を増強することを明らかにした。これらの知見は、HSR が細胞のがん化と老化に重要な役割を果たしており、これに DDR の制御が関与することを示唆する。

## 2. 研究の目的

- I. HSP90 による Y-Pol の制御機構を詳細に解析する。特に誘発突然変異に関与する REV1 に対する HSP90 の役割を解明する。
- II. HSF1 抑制による細胞老化の分子機構を明らかにする。また、この細胞老化過程における DDR の関与について検討する。

## 3. 研究の方法

### I. HSP90 による REV1 の制御

A) HSP90 は client 蛋白と結合する。そこで、HSP90 と REV1 との結合を免疫沈降法で調べた。

B) Client 蛋白の多くは、HSP90 により安定化されている。そこで、細胞を HSP90 阻害剤で処理したり、HSP90 RNAi で HSP90 レベルを減少させ、REV1 の発現量が変化するか調べた。

C) 紫外線照射により、REV1 は DNA 損傷で生じる複製阻害部位へ集積し働くと考えられている。HSP90 が REV1 の核内局在を制御するか検討するため、GFP-REV1 を安定に発現する細胞を作製し、HSP90 阻害剤処理や HSP90 RNAi をおこなった後、REV1 の複製阻害部位への集積に影響がどうか蛍光顕微鏡で観察をした。さらに、その分子機構を免疫沈降法や GST pull-down 法で解析した。

D) HSP90 が REV1 の機能に関与するか調べるため、HSP90 阻害剤処理した細胞内で、紫外線照射したシャトルベクターDNA を複製させた時にレポーター遺伝子 *supF* に生ずる変異率とその性状に及ぼす HSP90 阻害の影響を解析した。

## II. HSF1 抑制による細胞老化の誘導機構

A) hTERT 不死化ヒト線維芽細胞 (OUMS-36T-3F) とレンチウイルスベクターを用いて、ドキシサイクリン (DOX) で HSF1 に対する shRNA (shHSF1) を発現する細胞株 (OUMS/Tet-on shHSF1) を作製した。DOX 処理後、老化マーカーや発現変動するタンパクをウエスタンブロットティングで調べた。

B) HSF1 抑制による細胞老化誘導では、p53-p21 経路の活性化がみられた。そこで、HPV16 E6 の発現や siRNA の導入をおこない、この経路の重要性について解析した。

C) 用いた shHSF1 の標的配列は 3' 非翻訳領域にある。したがって、内在性 HSF1 mRNA は分解されるが、3' 非翻訳領域を持たない外来性 HSF1 mRNA は分解されない。そこで、種々の HSF1 変異体をコードする発現ベクターを作製し、内在性 HSF1 の抑制で誘導される細胞老化をレスキューできるか調べ、細胞老化誘導に関わる HSF1 機能について解析した。

D) HSF1 の転写制御機能が細胞老化に関わっていることが明らかになった。そこで、HSF1 を抑制したときに変動する遺伝子をマイクロアレイと定量的 RT-PCR で同定した。

## 4. 研究成果

### I. HSP90 による REV1 の制御

A) GFP-REV1 を安定に発現する HEK293T 細胞を作製し、免疫沈降法をおこなったところ、HSP90 は REV1 と特異的に結合し、これらの結合は HSP90 阻害剤 17-AAG で抑制された。また、内在性の REV1 と HSP90 の特異的な結合も複数の細胞株で確認した。さらに rabbit reticulocyte lysates で合成した REV1 も lysates 中の HSP90 と結合した。

B) 17-AAG 処理により、複数の細胞株において、REV1 の発現が減少することが分かった。この減少は REV1 mRNA の転写抑制ではなく、REV1 のポリユビキチン化とプロテアソームによる分解の亢進によるものであることが明らかになった。これらの結果により、HSP90 が REV1 の安定性に重要な働きをしていることが分かった。

C) HEK293T 細胞において、紫外線で生じた複製阻害部位への GFP-REV1 の集積が 17-AAG や HSP90 RNAi により抑制された。REV1 の複製阻害部位への集積にはモノユビキチン化された複製因子 PCNA との結合が重要である。そこで、両者の結合を免疫沈降法と GST pull-down 法で解析したところ、HSP90 阻害は REV1 の PCNA への結合を抑制することが明らかになった。

D) Pol- $\eta$  欠損細胞株と *SupF* シャトルベクターを用いて、紫外線誘発突然変異率を解析したところ、17-AAG 処理による HSP90 阻害は、点突然変異率を減少させた。また、REV1 RNAi でも同様の効果がみられた。17-AAG と REV1 RNAi で処理すると、点突然変異率の減少は相

加的にはならず、単独処理の場合とほぼ同じであった。これらの結果は、HSP90 が REV1 の機能を制御して、紫外線誘発性突然変異の発生に関与することを示唆する。

我々は REV1 が HSP90 のクライアント蛋白であり、その安定性や機能に HSP90 が重要な役割を果たしていることを明らかにした。HSP90 の発現量や活性に影響を与える様々なストレスや化学物質は、REV1 機能を介して、遺伝子の突然変異の誘発頻度に影響を与える可能性がある。

## II. HSP90 抑制による細胞老化の誘導機構

A) OUMS/Tet-on shHSF1 を DOX 存在下で培養すると、扁平な形態、巨大な核と核小体、Senescence-associated  $\beta$  galactosidase 活性 (SA- $\beta$  gal), Senescence-associated heterochromatin foci (SAHF), Senescence-associated secretory phenotype (SASF) などが陽性である細胞が増加し、細胞老化が誘導されたことが示された。また、発がん遺伝子誘導性の細胞老化で見られるような脱リン酸化型 Rb ファミリー、p53, p21, p16 のレベルが増加した。興味深いことに、発がん遺伝子や抗がん剤で誘導される細胞老化と異なり、p53 のリン酸化や  $\gamma$ H2AX の誘導など DNA 損傷応答系の活性化は検出されなかった。また、HSP72 や HSP90 などの HSP の減少はみられなかった。

B) OUMS/Tet-on shHSF1 に HPV16 E6 や p53 RNAi をおこなうと、HSF1 抑制による細胞老化が抑制された。また p21 RNAi でも同様の結果が得られたことから、この細胞老化には p53-p21 経路の活性化が必要であることが分

かった。前述したように、p53 のリン酸化等は検出されなかったが、HSF1 抑制によりポリユビキチン化 p53 の減少、p53 蛋白の半減期の延長がみとめられた。

C) 種々の HSF1 変異体を作製し、OUMS/Tet-on shHSF1 に導入し、細胞老化をレスキューできるか解析したところ、その能力は HSF1 の転写活性化能と相関した。この結果は、非ストレス条件下において、HSF1 の転写活性化能は細胞老化の抑制に重要であることを示唆する。

D) マイクロアレイ解析をおこない、HSF1 抑制で変動する遺伝子の経時的な変化を調べた。前述したように多くの HSP の変動は見られなかった。一方、p53 の標的遺伝子や SASP に特徴的なサイトカインやケモカインは増加した。また、多くの large intergenic non-coding RNA (lincRNA) の変動もみられた。

HSF1 抑制で変動した遺伝子の中には p53 の安定性に関わる蛋白が含まれており、細胞老化における役割について解析を進めている。

HSF1 抑制による細胞老化は、HSF1 のストレス応答転写因子としての機能の他に、非ストレス条件下で細胞老化を抑制するという新たな作用を示唆する。細胞老化と個体老化は密接な関連が知られている。また、線虫やショウジョウバエでは HSF1 活性と個体寿命の相関性が見られることから、高等生物においても HSF1 が個体寿命に関係している可能性がある。

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3件)

- ① 小田 司 「分子シャペロン HSP90 による複製ストレス応答機構の制御」 **生化学** 84 巻 556-562. (2012) 査読無
- ② 小田 司 「熱ショック転写因子 HSF1 の抑制による細胞老化の誘導機構」 **癌と人** 第 39 号 38-39. (2012) 査読無
- ③ Mayca Pozo, F., Oda, T. (筆頭著者と equal contribution), Sekimoto, T., Murakumo, Y., Masutani, C., Hanaoka, F., Yamashita, T. “ Molecular Chaperone Hsp90 Regulates REV1-Mediated Mutagenesis. ” **Molecular and Cellular Biology** 16:3396-3409. (2011). 査読有

[学会発表] (計8件)

- ① 小田 司、関本 隆志、山下孝之、熱ショック応答転写因子 Heat shock factor 1 (HSF1) の抑制による細胞老化の誘導機構: DHRS2 と p300/CBP の関与 第 35 回日本分子生物学会 2012 年 12 月 11 日～2012 年 12 月 14 日 福岡
- ② 関本 隆志、小田 司、益谷 央豪、花岡 文雄、山下孝之、Y-family DNA ポリメラーゼは、発がんシグナルが誘導する DNA 再複製に関与する 第 35 回日本分子生物学会 2012 年 12 月 11 日～2012 年 12 月 14 日 福岡

- ③ 関本 隆志、小田 司、益谷 央豪、花岡 文雄、山下孝之、ポリメラーゼ  $\eta$  は発がんシグナルが誘導する DNA 再複製 DNA 損傷応答に関与する 第 71 回日本癌学会学術総会 2012 年 9 月 19 日～2012 年 9 月 21 日 札幌
- ④ 小田 司、関本 隆志、山下孝之、熱ショック応答転写因子 Heat shock factor 1 (HSF1) の発現抑制は p53-p21 経路を介した細胞老化を誘導する 第 34 回日本分子生物学会 2011 年 12 月 13 日～2011 年 12 月 16 日 横浜
- ⑤ 関本 隆志、小田 司、益谷 央豪、花岡 文雄、山下孝之、Y-family DNA ポリメラーゼによる損傷乗り越え DNA 合成は、cyclin E 過剰発現による DNA 複製ストレス応答に関与する 第 34 回日本分子生物学会 2011 年 12 月 13 日～2011 年 12 月 16 日 横浜
- ⑥ マイカ ポゾ フランクリン、小田 司、関本 隆志、村雲 芳樹、益谷 央豪、花岡 文雄、山下 孝之、分子シャペロン Hsp90 は REV1 による突然変異の誘発を制御する 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 3 日～2011 年 10 月 5 日 名古屋
- ⑦ 小田 司、関本 隆志、山下 孝之、熱ショック転写因子 HSF1 の急性欠乏は複数の腫瘍抑制経路を介して細胞老化プログラムを活性化する 第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10 月 3 日～2011 年 10 月 5 日 名古屋

⑧ 小田 司、関本 隆志、山下孝之、熱シ  
ヨック転写因子 HSF1 の急性欠乏は腫瘍  
抑制性の細胞老化プログラムを活性化  
する 第 69 回日本癌学会学術総会  
2010年9月22日～2010年9月24日 大  
阪

〔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

小田 司 (ODA TSUKASA)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：10323643

### (2) 研究分担者

山下 孝之 (YAMASHITA TAKAYUKI)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：10166671

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：