

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 14 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790306

研究課題名（和文）Y-family DNAポリメラーゼの制御機構と腫瘍病態における役割の解明

研究課題名（英文）Analysis of the regulatory mechanisms of Y-family DNA polymerases and its roles in precancerous lesions

研究代表者

関本 隆志（SEKIMOTO TAKAYUKI）

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：20436322

研究成果の概要（和文）：発がんシグナルが引き起こす DNA 複製ストレスは、細胞老化を介して発がんを抑制する一方で、DNA 損傷を介してゲノム不安定化を引き起こす。本研究では、ヒト胚性腫瘍細胞株 U2OS に cyclin E を高発現するモデル細胞系を確立し、この過程における複製ストレス応答を解析した。この細胞において、cyclin E 発現によって誘導される DNA 再複製において Y-family DNA ポリメラーゼによる損傷乗り越え DNA 合成が重要な働きをしていることを見いだした。

研究成果の概要（英文）：In precancerous lesions, oncogenic signals induce cellular senescence, causing tumor suppression; whereas they promote genomic instability, leading to tumor progression. We studied the role of DNA replicative stress in cyclin E overexpressed U2OS human cells. Our data suggest that Y family Polymerases play a role in oncogene-induced DNA re-replication.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：発がん、ゲノム不安定性、複製ストレス応答、細胞老化、Y-family DNA ポリメラーゼ、損傷乗り越え DNA 合成

1. 研究開始当初の背景

発がん過程の初期に見られる前がん状態では、発がんシグナルが引き起こす DNA 複製異常に対するストレス応答（複製ストレス応答）に伴い DNA 損傷、細胞老化（持続的な細胞増殖停止、SAHF と呼ばれるヘテロクロマチン形成）などが特徴的に見られる。発がん抑

制作用のある細胞老化については、多くの研究が行われ、その複雑な機構の一端が明らかになりつつある。しかし、発がんシグナルによる複製ストレス応答の本態や、DNA 損傷がゲノム不安定化を介して発がんを促進する分子機構に関する研究は乏しい。

一方、紫外線や化学物質による DNA 損傷が

引き起こす複製ストレス応答機構については、近年著しく理解が進み、(1)細胞周期チェックポイントを作動させる「ATR-Chk1 経路」、(2) ファンconi 貧血 (Fanconi anemia; FA) と家族性乳がん (BRCA) の原因遺伝子群から構成され、ゲノム安定化と腫瘍抑制に働く「FA/BRCA 経路」、(3) Y-family DNA ポリメラーゼ (Y-Pol) を始めとする忠実度の低いポリメラーゼにより、損傷 DNA を乗り越えて複製を継続する「損傷乗り越え DNA 合成 (TLS)」、(4) 「相同組換え」などが相互作用して、クロマチンにおいて形成する分子ネットワークが明らかになりつつある。

そこで、本研究においては発がんシグナルによる複製ストレス応答とゲノム不安定化に関連するクロマチン分子動態を解明することにより、発がん予防や早期がんの治療に貢献できるのではないかと着想し研究を開始した。

2. 研究の目的

cyclin E を始めとする様々な発がんシグナルによる複製ストレスの発生機構を解析し、これに対する細胞応答からゲノム不安定化に到る過程を、Y-Pol による TLS の役割を中心に明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 前がん状態を再現するモデル実験系の開発

種々のがん遺伝子をレンチウイルスベクターで種々のヒト培養細胞株に導入し、ゲノム不安定性、細胞老化が見られる実験系を開発する。

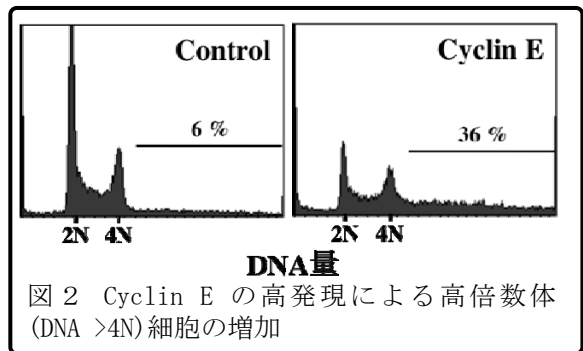
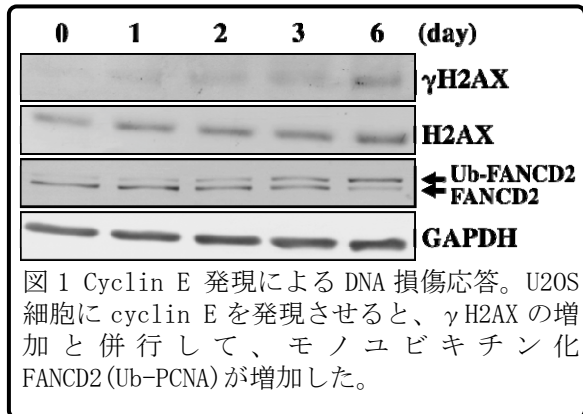
(2) 複製障害部位への DNA 損傷応答蛋白の動員

上記 (1) で見いだした実験系において、DNA 損傷応答分子の活性化状態や、顕微鏡画像において Y-Pol の点状集積 (フォーカス) 形成を確認する。さらにこれら分子の相互関係を明らかにするために、時間的・空間的に定量的画像解析を行う。

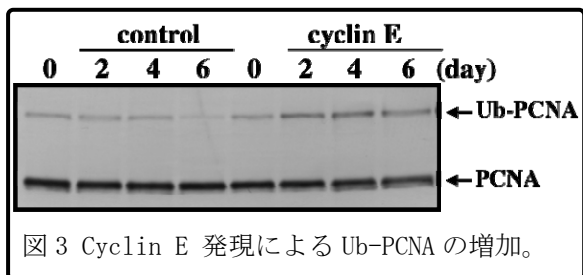
4. 研究成果

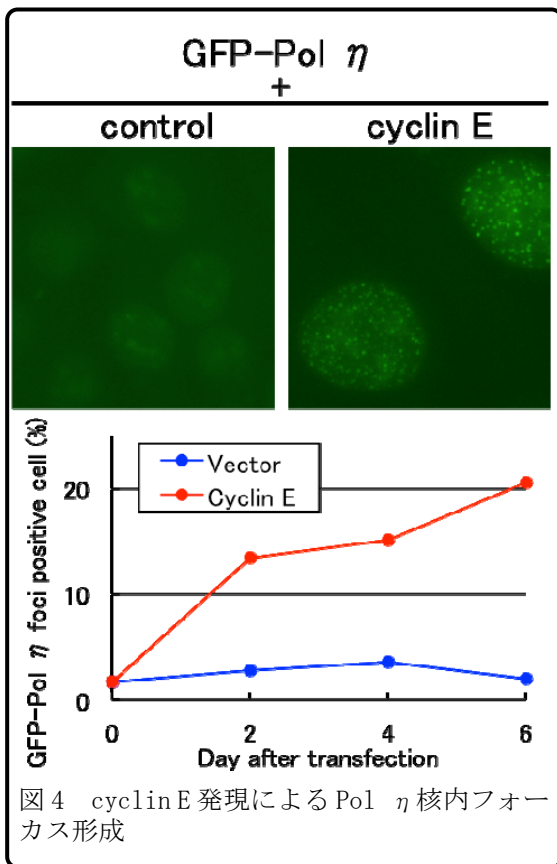
(1) 種々のヒト培養細胞株に活性型 Ras, 活性型 B-Raf, c-myc, cyclin E など種々の発がん遺伝子を導入して複製ストレス応答を系統的に解析し、発がん遺伝子によって大きな差があることを見出した。最も解析が進んでいるのは、cyclin E である。cyclin E は、ヒトのがんでしばしば発現が亢進しており、トランスジェニックマウスでがんを引き起こす。ヒト低悪性腫瘍細胞株 U20S に cyclin E を過剰発現させると、老化マーカー (Senescence associated β -galactosidase 活性、SAHF) の発現とともに細胞分裂は停止したが、ヒストン H2AX のリン酸化 (γ H2AX)

等で示される強い DNA 損傷反応を伴いつつ (図 1) 複製が持続し、高倍数体 (DNA > 4N) の細胞が出現した (DNA 再複製、図 2)。これは 1 回の細胞周期につき DNA が 1 回のみ複製されるよう制御する「ライセンス化機構」の異常によると考えられ、DNA 鎖切断を招き、遺伝子増幅を始めとするゲノム不安定性を引き起こすと考えられる。以上よりこの実験系においては、細胞老化とゲノム不安定性が共存する前がん状態がよく再現され、モデル細胞系として利用できる。

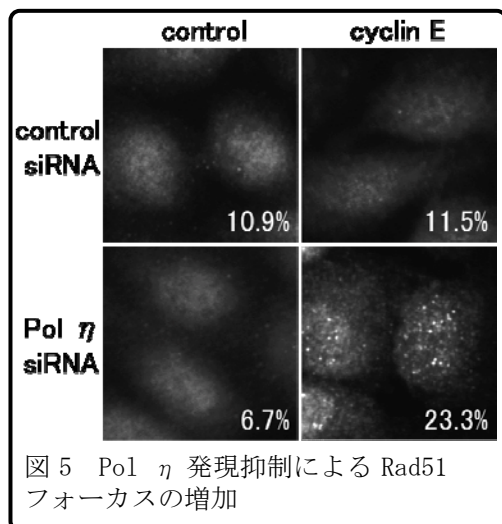


(2) モデル細胞系において、cyclin E 発現により DNA 損傷 (γ H2AX) の亢進にともない、Y-family DNA ポリメラーゼの DNA 損傷部位への動員に重要な役割を果たす PCNA のモノユビキチン化 (Ub-PCNA) や FA/BRCA 経路のマーカーであるモノユビキチン化 FANCD2 が亢進し (図 1、3)、GFP 標識した Y-Pol メンバー (Polymerase η (Pol η), REV1, Pol ι , Pol κ) は高倍数体の細胞において PCNA や FANCD2 と共存するフォーカスを形成した (図 4)。





また、この核内フォーカスはヌクレオチドアナログ Bromodeoxyuridine (BrdU) でラベルした新規合成 DNA 部位(replisome)と共存在した。さらに、siRNA を用いて Pol η 、REV1 を knockdown した U2OS において、cyclin E の発現誘導時に相同組み替え修復に参与する Rad51 のフォーカス形成が増加した(図5)。



したがって、これら Y-Pol の機能抑制により代替的に相同組み替え修復が亢進した可能性が考えられる。

そこで、さらに DNA 再複製における Y-Pol の役割を解析するために、GFP-Y-Pol を安定発現する U2OS 細胞においてライセンス機構の負の制御因子である geminin の発現を抑制して DNA 再複製を誘導したところ、DNA 量の高倍数化にともなって DNA 損傷応答の亢進、PCNA モノユビキチン化、replisome への Y-Pol の集積が観察された。また、EdU で標識した新規合成 DNA を免疫沈降すると、Ub-PCNA、GFP-Pol η の共沈した。これらの結果は、DNA 再複製に Y-Pol (特に Pol η) が関与することを強く示唆する。

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 2 件)

- ① Yamashita T, Oda T, Sekimoto T. Translesion DNA Synthesis and Hsp90. Genes and environment. in press 査読有
- ② Mayca Pozo F., Oda T., Sekimoto T., Murakumo Y., Masutani C., Hanaoka F. and Yamashita T. Molecular Chaperone Hsp90 Regulates REV1-Mediated Mutagenesis. *Mol. Cell. Biol.* **31**, 3396-3409. (2011) 査読有

[学会発表] (計 5 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年会、2011 年 12 月 14 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ② 関本隆志、小田司、益谷央豪、花岡文雄、山下孝之、Y-family 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参与する。第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 14 日、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ③ 小田司、関本隆志、山下孝之、Acute depletion of HSF1 triggers activation of cell senescence program through multiple tumor suppressor pathway. 第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 5 日、名古屋国際会議場 (愛知県)
- ④ Mayca Pozo Franklin、小田司、関本隆志、村雲芳樹、益谷央豪、花岡文雄、山下孝之、Molecular chaperone Hsp90 regulates REV1-mediated mutagenesis.

第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 4 日、名古屋国際会議場（愛知県）

- ⑤ 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 23 日、大阪国際会議場（大阪府）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.imcr.gunma-u.ac.jp/lab/molgen/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関本 隆志 (SEKIMOTO TAKAYUKI)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：20436322