

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510065

研究課題名(和文) Rad18とチェックポイント因子の相互作用の解析

研究課題名(英文) Interaction of Rad18 with factors involved in checkpoint regulation

研究代表者

立石 智(Tateishi, Satoshi)

熊本大学・発生医学研究所・講師

研究者番号：00227109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：Chk2-/-Rad18-/-マウスを作製し表現型をみた結果、自然発ガン率が野生型マウスに比べて高いことがわかった。我々はマウス由来のES細胞を用いることにより、放射線照射だけでなくUV照射によるDNA損傷でも、傷害された細胞がChk2依存的に排除されることを示唆する実験結果を得た。Rad18が機能しないと複製フォークが不安定しDNAが切断され、Chk2が活性化される。活性化Chk2は、傷害をもつ細胞を排除することによりゲノムの安定性を保ち、発がんを抑制すると考えられる

研究成果の概要(英文)：The Chk2 kinase functions as a tumor suppressor. Chk2 Rad18 double knockout mice showed increased rate of spontaneous spleen lymphoma and UV induced skin tumor formation. To elucidate molecular mechanism how the two gene products maintain genome integrity, we have prepared ES cells from the mice and examined survival, apoptosis, chromosomal aberration and sister chromatid exchange rate following UV irradiation of the cells. While deficiency of Rad18 sensitized the cells against UV irradiation, deficiency of Chk2 conferred resistance on the cells. Deficiency of Chk2 increased chromosomal aberration while it did not have a great effect on SCE rates following UV irradiation. Collectively we surmised that deficiency of Rad18 cause genome instability including DSB while the DSB activate Chk2 to compensate deficiency of Rad18 in damaged cells via elimination of DNA damaged cells from the organisms.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：DNA修復 チェックポイント Rad18 Chk2 発がん抑制 遺伝子欠損マウス

1. 研究開始当初の背景

Rad18 タンパクは PCNA をモノユビキチン化する E3 酵素であり、細胞の DNA が損傷されると、Rad18 が複製停止部位に集積し PCNA をユビキチン化することにより、通常の複製酵素 から損傷乗り越え複製酵素 への転換を促し、損傷乗り越え複製を誘導する機構を明らかにした。生体での Rad18 の役割を知るため、Rad18 ノックアウト (*Rad18*^{-/-}) マウスを作成した。このマウスは、ほぼ正常に誕生し成育した。若年齢 マウスの精巣および生殖能力は正常であったが、加齢に伴い生殖細胞数が減少したため、Rad18 は長期にわたる精子形成の維持に必要である。意外なことに、*Rad18*^{-/-} マウスには、高発ガン性は見られなかった。*Rad18*^{-/-} 細胞に UV が照射されると、Chk2 が活性化される。Chk2 は、切断 DNA に応答して活性化されるリン酸化酵素であり、細胞周期、アポトーシス等を制御する。*CHEK2* はガン抑制遺伝子であり、放射線照射 (IR) による DNA 切断損傷に応答して、アポトーシスなどを誘導する。ヒト *CHEK2* の SNP である *CHEK2*^{1100delC} をもつヒトは、発ガンのリスクが約 3 倍高くなる。どのような機構により *CHEK2* が発ガンを抑制しているか解明することは重要であるが、その全体像は明らかにされていない。Rad18 と Chk2 は連携してゲノム DNA を安定に維持している可能性があるため、*Chk2*^{-/-}*Rad18*^{-/-} マウスを作製した。このマウスの自然発ガン率および UV 照射による皮膚ガン形成率が高いことがわかった (未発表データ)。このため、Rad18 が複製フォークを安定に保つ一方で、未修復の損傷 DNA をもつ細胞は、Chk2 の機能により排除される可能性が高い。本研究の主な目的は、Chk2

による発ガン抑制機構を明らかにすることである。

2. 研究の目的

- (1) Rad18 とチェックポイントの両方を欠損した細胞の増殖・DNA 複製速度が低下し細胞周期の S 期が減少していることを明らかにする。
- (2) 細胞老化が進行し、また細胞周期を負に制御する p16, p27 などの発現が亢進していることをみる。
- (3) 細胞周期の停止または細胞老化との関連をみるため、細胞が放射線の照射、活性酸素、UV、メチル化剤等に対して感受性を示すか調べる。
- (4) 放射線を照射した細胞内での活性酸素の発生状況を調べることにより、細胞周期の停止または細胞老化との関連を調べる。
- (5) *Chk2*^{-/-}*Rad18*^{-/-} マウスの生存率が上昇していることの原因をさぐるため、マウスの腫瘍形成頻度が低下していることを明らかにする。
- (6) *Chk2*^{-/-} マウスは放射線の照射により発ガンが誘導されることが予想される。これに対して、*Chk2*^{-/-}*Rad18*^{-/-} マウスで発ガンが抑制されているか調べる。

3. 研究の方法

(1) 細胞増殖速度の比較: 野生型、*Rad18*^{-/-}、*Chk2*^{-/-}、*Chk2*^{-/-}*Rad18*^{-/-}、*p53*^{-/-}、*p53*^{-/-}*Rad18*^{-/-} の計 6 種類のマウスからそれぞれ胎児由来繊維芽細胞 (MEF) を樹立する。低酸素インキュベーターを用いて培養し、経時的に細胞数を計測することにより増殖速度を決定する。

(2) 相互作用解析: 放射線を照射した細胞での、Rad18 タンパクと各種のチェックポイント因子 (Chk2、p53、53BP1 タンパク) との物理的な相互作用を、免疫沈降法およびプルダウン法により調べる。

C. 細胞周期制御異常の検出: MEF を

培養した後に、フローサイトメトリーを用いて、G1,S, G2/M 期の割合を求め。また、BrdU を細胞に取り込ませた後に抗 BrdU 抗体を用いて 2 重染色することにより S 期の割合を正確に求める。

D. **細胞老化の検定:** 培養した MEF の表面積を比較する。老化の指標となる -SA-gal 染色をおこなう。

E. **ROS の測定:** 最近 ATM 欠損細胞で ROS が発生し誘導された p16 により細胞老化が促進されるモデルが報告された。今回の研究では、MEF に ROS が発生している可能性を検討する。MEF に ROS を検出するための試薬である DCF-DA を加え H₂O₂ 処理後に、ROS の発生を検出する(立石、熊本大学 COE 支援班)。

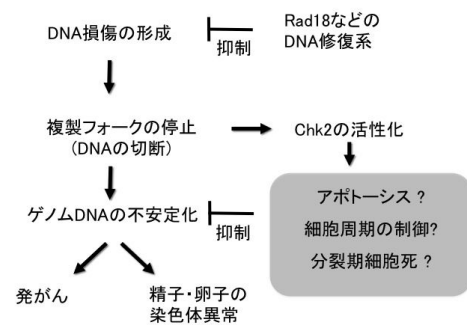
F. **感受性の測定:** Chk2-/-Rad18-/- または p53-/-Rad18-/-細胞で放射線の照射、活性酸素、UV、等に対する感受性が高くなっているか検証する。MEF に対する各種の DNA 損傷処理後に培養し、色素排除試験により生存率を測定する。

4. 研究成果

Chk2 と Rad18 が連携した発がん防御の分子メカニズムを解析するために、WT、Rad18^{-/-}、Chk2^{-/-}または Chk2^{-/-}Rad18^{-/-}マウスから調整した ES 細胞を用いて、放射線または UV 照射後の生存率、アポトーシス、染色体異常頻度、組換え頻度などを測定した。その結果、Chk2^{-/-}細胞に UV を照射すると、テロメア融合などの染色体異常が形成される頻度が野生型細胞に比べて約 2 倍高いことがわかった。活性化した Chk2 が DNA 切断などの損傷を含む細胞を生体から排除する可能性が高いことがわかった。また、Chk2 は、損傷をもつ細胞の SCE 頻度を調節する作

用はないと考えられる。以上の結果を踏まえて、DNA が損傷した際に Rad18 が機能しないと、複製フォークが不安定化し DNA の切断が起こることで、Chk2 が活性化される。活性化した Chk2 は、異常な DNA を含む細胞が生体から排除することにより、発がんを抑制する作業仮説を立てた(図 3)。

図3 Rad18とChk2の連携によるゲノム安定化を介した、発がん防御および配偶子の染色体維持機構



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 6 件)

1. Hu, L., Kim, T. M., Son, M. Y., Kim, S. A., Holland, C. L., Tateishi, S., Kim, D. H., Yew, P. R., Montagna, C., Dumitrache, L. C., Hasty, P. Two replication fork maintenance pathways fuse inverted repeats to rearrange chromosomes. **Nature** 501, 569-572 (2013) 査読有り
2. Durando, M., Tateishi, S., Vaziri, C. A non-catalytic role of DNA polymerase η in recruiting Rad18 and promoting PCNA monoubiquitination at stalled replication forks. **Nucleic Acids Res.** 41, 3079-3093 (2013) 査読有り
3. Hashimoto, K., Cho, Y., Yang, I., Akagi, J., Ohashi, E., Tateishi, S., Wind, N., Hanaoka, F., Ohmori, H., Moriya, M. The vital role of pol ζ and REV1 in mutagenic, but not correct, DNA synthesis across

benzo[a]pyrene-dG and the recruitment of pol ζ by REV1 to a replication-stalled site. **J.Biol. Chem.** 287, 9613-9622 (2012) 査読有り

4. Nakazawa, Y., Sasaki, K., Mitsutake, N., Matsuse, M., Shimada, M., Ohyama, K., Ito, K., Masuyama, R., Kudo, T., Utani, A., Takenaka, K., Miki, Y., Nardo, T., Stefanini, M., Takahashi, Y., Yamashita, S., Tateishi, S., Lehmann, A., Yoshiura, K., Ogi, T. Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and impair RNA polymerase IIo processing in transcription-coupled nucleotide-excision repair. **Nat. genet.** 44, 586-592 (2012) 査読有り
5. Hendel, A., Krijger, P. H., Diamant, N., Goren, Z., Langerak, P., Kim, J., Reibner, T., Lee, K. Y., Geacintov, N. E., Carell, T., Myung, K., Tateishi, S., D'Andrea, A., Jacobs, H., Livneh, Z. PCNA ubiquitination is important, but not essential for translesion DNA synthesis in mammalian cells. **PLoS Genet.** (9) e1002262. (2011) 査読有り
6. Yanagihara, H., Kobayashi, J., Tateishi, S., Kato, A., Matsuura, S., Tauchi, H., Yamada, K., Takezawa, J., Sugawara, K., Masutani, C., Hanaoka, F., Weemaes, C. M., Mori, T., Komatsu, K. NBS1 recruits RAD18 via a RAD6-like domain and regulates Pol η -dependent translesion DNA synthesis. **Mol. Cell** 43, 788-797 (2011) 査読有り

[学会発表](計 6件)

1. Tateishi, S. Chk2 and Rad18 concertedly maintain genomic

integrity to prevent tumor formation International Conference Replication, repair and transcription; coupling mechanisms and chromatin dynamics for genome integrity, 2014.2.4-5, Kyoto University Clock Tower Centennial Hall, Kyoto, Japan

2. Tanoue, Y., Tateishi, S. Chk2 and Rad18 contribute cooperatively to maintain genomic stability, leading to prevention of tumorigenesis and germ cells maintenance. 29th RBC-NIRS INTERNATIONAL SYMPOSIUM 2013.11.28-29 コーポ京都 Kyoto, Japan
3. Tanoue, Y., Takamori, S., Tateishi, S. Rad18 contributes to prevention of UV-induced skin cancer and senescence in testis. 28th RBC-NIRS INTERNATIONAL SYMPOSIUM 2012.11.29-30 コーポ京都 Kyoto, Japan
4. Tanoue, Y., Takamori, S., Tateishi, S. Rad18 contributes to prevention of tumorigenesis. 28th RBC-NIRS INTERNATIONAL SYMPOSIUM 2012.11.29-30 コーポ京都 Kyoto, Japan
5. Tateishi, S., Watanabe, K., Sun, J., Iwabuchi, K., Yomogida, K. Rad18 is required for double-stranded break repair and long-term spermatogenesis, The 34th annual meeting of the molecular biology society of Japan, Workshop 2011 Dec. 13-16 パシフィコ横浜 Yokohama, Japan

6. Tateishi, S. Loss of *Rad18* alleles suppresses tumorigenesis in *p53*-null mice via cellular senescence, Gordon conference 2012 Mar. 25-30 Ventura, U.S.A.

(3)連携研究者 ()

研究者番号 :

〔図書〕(計 1 件)

Vaziri C, Tateishi S., Yang Y, Greenwalt A. Regulation of Y-Family Translesion Synthesis (TLS) DNA polymerases by RAD18. In 'Translesion DNA polymerases: from DNA repair and beyond' Editors: Domenico Maiorano & Dr. Jean-Sébastien Hoffmann ISBN 978-81-308-0538-2 *in press*

〔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

http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/cell_genetics/index.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

立石 智 (TATEISHI, Satoshi)
熊本大学・発生医学研究所・講師
研究者番号 : 00227109

(2)研究分担者

()

研究者番号 :