

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 4 日現在

機関番号：37114

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23701065

研究課題名(和文)アルキル化DNA損傷に応答したアポトーシスシグナルの分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism of the apoptosis pathway triggered by alkylated base lesions

研究代表者

藤兼 亮輔 (Fujikane, Ryosuke)

福岡歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：20581713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：O6メチルグアニンは変異原性が高いため、このDNA損傷を持つ細胞はミスマッチ修復依存のアポトーシスで除かれる。本研究でミスマッチ修復依存のアポトーシスに関わるMAPO2遺伝子を同定した。この遺伝子のアポトーシス経路での役割を調べるため、この遺伝子発現を抑制したヒト細胞株を作成した。この細胞はアルキル化剤に暴露されると細胞周期がG2/M期で正常に停止した。一方で、アポトーシスを起こした細胞が顕著に減少した。また、アポトーシス誘導のマーカーであるBAKやカスパーゼ3の活性化、ミトコンドリア膜の脱分極も抑制されていた。このことからMAPO2はこのアポトーシス誘導に関わることが示された。

研究成果の概要(英文)：O6-Methylguanine is especially mutagenic. Cells containing this lesion are eliminated by the mismatch repair (MMR)-dependent apoptosis. After attempts to identify new genes related to the induction of MMR dependent apoptosis, a novel gene named as MAPO2 was identified. To elucidate the function of the MAPO2 gene product in the apoptosis pathway, a MAPO2 knocked-down human cell line was constructed. After exposure to an alkylating agent, MNU, control HeLa MR cells and the knockdown cells underwent cell cycle arrest at G2/M phase, however, the production of the sub-G1 population in the knockdown cells was significantly suppressed in comparison to that in HeLa MR cells. Moreover, the activation of BAK and caspase-3, and depolarization of mitochondrial membrane, hallmarks for the induction of apoptosis, were also suppressed in the knockdown cells. These results suggest that the MAPO2 gene product might positively contribute to the induction of apoptosis triggered by O6-methylguanine.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：アポトーシス アルキル化剤 ミスマッチ修復

## 1. 研究開始当初の背景

ミスマッチ修復 (MMR) 機構は複製エラーを修復するのみならず、損傷に応答したアポトーシス誘導もその機能の一つである。そのため MMR 欠損は突然変異の誘発、細胞がん化の原因となる。また、MMR 欠損は遺伝病であり、その患者の 80% は 60 歳までに大腸がんに、また、その他のがんに高い頻度で罹患する。このように MMR 機構の複製エラー修復とアポトーシス誘導はゲノムの恒常性維持と発がん抑制に重要な役割を果たしている。生体内では DNA のアルキル化は、野菜などの日常の食物中に含まれるアミン類や亜硝酸塩の反応によって生じるニトロソアミンなどによって引き起こされる。そのため MMR による発がん抑制機構は日常的に生体防御に重要な役割を果たしている。DNA アルキル化損傷のうち O<sup>6</sup>メチルグアニン (O<sup>6</sup>-mG) はシトシンと同程度の割合でチミンと誤対合を起こし MMR によるアポトーシスを誘導するため高い細胞毒性を示す。これを利用して DNA アルキル化剤は抗がん剤として利用される。MMR によって誘導されるアポトーシスは O<sup>6</sup>-mG を含む DNA を持つ細胞を排除することで発がん抑制において重要な役割を担っている。この O<sup>6</sup>-mG/T 誤対合に応答した MMR 依存のアポトーシスの発動は DNA 複製に依存しており、チェックポイント活性化、アポトーシス誘導は 2 度の S 期を経て起こる。しかしながら、このアポトーシス発動が、なぜ DNA 複製に依存するのか、どのようにしてアポトーシス経路を活性化されるのかは明らかでない。

## 2. 研究の目的

ミスマッチ修復機構は DNA アルキル化損傷に応答してアポトーシスを誘導し、損傷を持つ細胞を排除する。このことを利用してアルキル化剤は抗がん剤として広く臨床で利用

されているが、アルキル化損傷によって誘導されるアポトーシスの分子機構には不明な点が多い。本研究では、マウス培養細胞を用いた遺伝学的スクリーニングによってアルキル化損傷、特に O<sup>6</sup>-メチルグアニンに応答する新規アポトーシス関連遺伝子の同定と解析を行い、このアポトーシス誘導の分子機構を解明することを目標とした。

## 3. 研究の方法

Mgmt 欠損細胞は O<sup>6</sup>-mG に応答してアポトーシスを誘導するため、アルキル化剤 MNU に対して高感受性を示す。ところが、Mgmt に加えてアポトーシス関連タンパク質のひとつである Mlh1 に異常を持つ細胞は MNU に耐性を示すようになる。この Mgmt 欠損細胞の表現型を利用して、遺伝子トラップ法により作製した遺伝子破壊株ライブラリーの中から MNU 耐性を示す株をスクリーニングすることで、アポトーシス関連遺伝子の欠損株を多数単離することができる。遺伝子同定後、それら遺伝子の遺伝学的、細胞生物学的、生化学的解析を行い、アポトーシス誘導経路における機能ネットワークを明らかにしようとした。

## 4. 研究成果

これまで我々が用いてきたレトロウイルス遺伝子トラップ用ベクターを改良し、その改良型ベクターを用いた遺伝子トラップ法によってマウス繊維芽細胞で遺伝子破壊ライブラリーを作製した。ライブラリー構築の際には改良型ベクターで設計された通り、ハイグロマイシンと、続くネオマイシンの二段階薬剤選択を行い、両対立遺伝子が破壊されるように工夫した。このような方法で作成した遺伝子破壊ライブラリーの中からアポトーシスに異常が生じ、アルキル化剤である MNU に耐性となる株をスクリーニングした。ある MNU 耐性株の解析から C1orf201 homolog とデータベースに

登録された機能未知の遺伝子を同定し、Mapo2と名付けた。この新規遺伝子Mapo2は高等真核生物に高度に保存されており、その機能の重要性が予想された。この新規遺伝子MAP02のアルキル化剤で誘導されるアポトーシスにおける機能を明らかにするため、ヒト子宮頸癌由来HeLa MR細胞においてmiRNAを安定的発現させることでMAP02遺伝子の発現を抑制(ノックダウン)した細胞株を作成した(RF101)。このMAP02ノックダウン細胞をアルキル化剤で処理すると、DNA損傷チェックポイントには異常を示さず、細胞周期関連キナーゼCHK1は活性化して細胞周期がG2/M期で停止した(図1)。

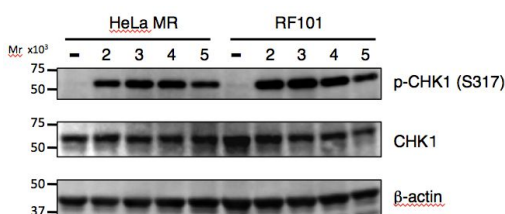


図1 CHK1は正常にリン酸化され活性化する

一方で、フローサイトメーターをもちいた解析から、アルキル化剤処理後にsub-G1細胞の割合が減少し、MAP02ノックダウンによってアルキル化剤に誘導されるアポトーシスの発動が顕著に抑制されることがわかった。種々のアポトーシスマーカーを用い、MAP02発現ノックダウンがメチル化剤誘導のアポトーシスに与える影響を調べたところ、アポトーシス促進因子であるBAK活性化(図2)、アポトーシス実行に重要なカスパーゼ3の活性化が抑制されており(図3上段)、また、ミトコンドリア膜の脱分極がHeLa MR細胞と比べて有意に抑制されていることがわかった(図3下段)。

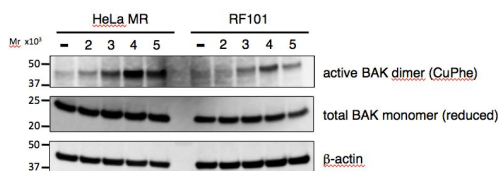


図2 MAP02発現抑制で活性化BAKは現象する

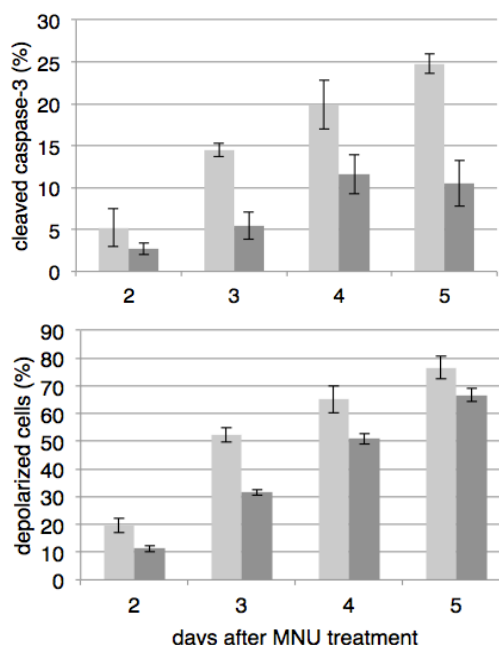


図3 アルキル化剤処理後のカスパーゼ3の活性化(上段)とミトコンドリア膜の脱分極(下段)

したがって、新規遺伝子MAP02はミトコンドリア経路の上流でアポトーシス促進に関わる機能を有することがわかった。MAP02の機能の更なる解析と相互作用因子の同定によってアルキル化剤に誘導されるアポトーシスの分子機構をより詳細に知ることができると考えられる。

## 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 1 件)

Fujikane, R, Sanada, M, Sekiguchi, M, Hidaka, M.

The Identification of a Novel Gene, MAP02, That Is Involved in the Induction of Apoptosis Triggered by O(6)-Methylguanine. 査読あり

PLoS One 2012;7(9):e44817.

doi:10.1371/journal.pone.0044817

〔学会発表〕(計 2 件)

Fujikane R, Sanada, M, Sekiguchi M, and Hidaka M.

A novel gene, C10, is related to the induction of apoptosis triggered by O<sup>6</sup>-methylguanine

第 34 回日本分子生物学会年会

2011 年 12 月 15 日

パシフィコ横浜

Fujikane R, Sanada, M, Sekiguchi M, and Hidaka M

The identification of a novel gene, *MAPO2*, that is involved in the induction of apoptosis triggered by O<sup>6</sup>-methylguanine

The 8<sup>th</sup> International Symposium on DNA Replication, Recombination, and Repair

2012 年 11 月 25～28 日

淡路夢舞台国際会議場

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

藤兼 亮輔 (FUJIKANE, Ryosuke)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教

研究者番号 : 20581713