

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：11401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659357

研究課題名(和文) 分子シャペロンHSP90を基盤とする細胞癌化機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the cell neoplastic transformation mechanism based on the molecular chaperone HSP90

研究代表者

伊藤 英晃 (Itoh, Hideaki)

秋田大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：80168369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：DNAポリメラーゼ・イータ(Pol ϵ)は、損傷のないDNAを鋳型として大変誤りがちなDNA合成を行い、免疫グロブリン遺伝子領域の体細胞突然変異の生成にも寄与する。Pol ϵ が活性化するためには分子シャペロンHSP90との相互作用が必須であり、HSP90阻害剤は、Pol ϵ の構造を不安定にし、がん細胞の増殖を抑制するものと考えられている。

本研究では、完全長ヒトPol ϵ を精製した。また、抗ウサギPol ϵ の特異的な抗体を得た。HSP90はPol ϵ の安定化に寄与すること、膠芽腫で核周辺にHSP90とPol ϵ の強い相互作用が確認できた。上衣腫では、HSP90とPol ϵ の相互作用は検出できなかった。

研究成果の概要(英文)：Deficiency of DNA Pol ϵ in humans causes a variant form of the cancer predisposition syndrome xeroderma pigmentosum.

We will clarify the physiological significance of HSP90 and Pol ϵ interaction. We tried the construction and purification of full-length human Pol ϵ . Pol ϵ is a very unstable protein, but by the addition of a His-tag in the C-terminal, we have succeeded in purification of Pol ϵ . Also, we got specific polyclonal antibody against Pol ϵ . HSP effected on the stability of Pol ϵ . HSP90 and Pol ϵ were co-localized strongly near nuclear of glioblastoma cells. Glioblastoma is the most aggressive malignant primary brain tumor in humans. On the contrary, we couldn't clear interaction between HSP90 and Pol ϵ in the ependymoma cells. Ependymoma is a tumor that arises from the ependyma, a tissue of the central nervous system.

研究分野：挑戦的萌芽研究

科研費の分科・細目：7909

キーワード：分子シャペロン DNAポリメラーゼ

1. 研究開始当初の背景

細胞はストレス負荷時に、分子シャペロンとも総称される熱ショックタンパク質 (HSP: heat shock protein) の合成を増加させることによって、各種ストレスに反応する。分子シャペロンは、新規合成タンパク質のフォールディングを介助し、誤ったフォールディングや、フォールディングしなかったタンパク質の非特異的な凝集のような、非機能的副反応を防ぐ (伊藤英晃: 哺乳類分子シャペロンの作用機構, 生化学, 77, 1137-1151, 2005, 表紙絵を飾った)。

HSP90 は主要な細胞内分子シャペロンの一つであり、細胞ストレス状況下で発現量が増大するが、通常細胞の細胞質に最も多く存在するタンパク質の一つである。HSP90 はステロイドホルモン受容体の核移行制御等、生体にとって重要なタンパク質の生理機能を制御する。HSP90 は図 (中央) の様に、N 末端部分の ATP 結合領域に ATP が結合し、加水分解後、HSP90 の構造変化に伴い、クライアント蛋白質の構造等が変化し、生理機能が制御される。分子シャペロン HSP70 や HSP90 は通常細胞では各々単独で存在し、各種の生理機能を発揮する。癌との関連では、変異型 p53 に分子シャペロン複合体が結合し、一部をアンフォールドし、HSP90 は p53 を野生型に戻すことが示唆されている (図下)。

最近、細胞内にある HSP90 は、癌細胞を悪性化する酵素の一つである DNA polymerase η (Pol η) の働きを促進していることが明らかとなった。細胞が癌化すると、HSP90 の働きが活発化する。一方、癌細胞は遺伝子の変異を繰り返してさらに悪性化するが、Pol η は変異を促進させることが報告されている。最近、培養癌細胞において、HSP90 と Pol η が結合していることが報告された (Yamashita et al. Mol Cell 2010)。HSP90 阻害剤を用いることにより、Pol η の分解促進や、機能が抑制されることが示唆されたが、結合様式等、詳細は不明のままである。

以上の結果から、正常細胞内で HSP90 が癌を抑制する機能と、癌細胞内で癌の悪性度に関与する機能に関して、以下の様な仮説を立案した。

- ①細胞の癌化に伴い、分子シャペロンが複合体を形成し、癌抑制遺伝子 p53 の変位型と結合し、変位型 p53 をアンフォールドし、さらに HSP90 が野生型 p53 への正しい変換を試み、細胞の癌化を阻止する。
- ②上記機構が破綻した場合には、癌細胞を悪性化する酵素の一つである Pol η の活性化には、HSP90 が単独、またはシャペロン複合体との相互作用が必須となり、(Pol η の非活性化状態 \rightarrow 活性化状態)、結果として癌を悪性化する。癌細胞内では変異タンパク質が粗製濫造されるため、分子シャペロンも正常細胞とは異なる構造や機能を有する可能性が大きい。

③正常細胞内の HSP90 と癌細胞内の HSP90 に対する 17-AAG の親和性の相異は、Pol η に結合する HSP90 の構造変化 (シャペロン複合体形成の結果?) によるものである。

④正常細胞で p53 と結合する HSP90 と、癌細胞内の Pol η に結合する HSP90 は、構造様式やクライアントタンパク質の制御様式が異なる。

本研究では、細胞の癌化に伴う分子シャペロン HSP90 \cdot p53 \cdot Pol η との相互作用機構を解析する。

正常細胞における癌抑制機構と、癌細胞の悪性度規定機構における HSP90 の存在様式と生理機能を解析することは、細胞の癌化機構の本論を解析できる可能性が極めて高い。この様に、本研究は極めて独創的であり、予想される結果とインパクトは極めて高い。

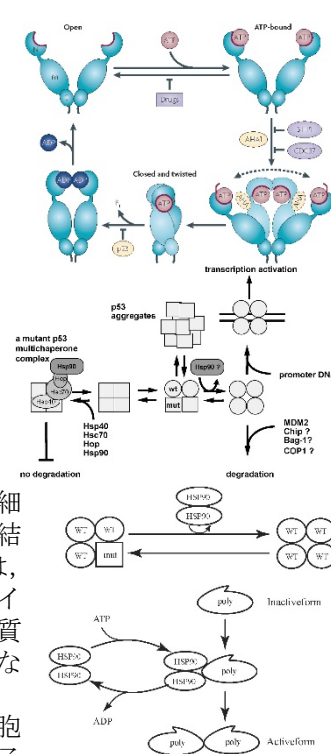
2. 研究の目的

本研究では、細胞の癌化に伴う分子シャペロン HSP90 の制御機構を、生化学的に明らかにする。癌抑制遺伝子 p53 と HSP90 の相互作用、及び癌の悪性度を規定する分子 DNA Polymerase η (Pol η) と HSP90 の相互作用を明らかにし、正常細胞と癌細胞における HSP90 の役割分担を解明する。

具体的には癌の種類や悪性度と HSP90 の相関、及び、HSP90 \cdot p53 \cdot Pol η との相互作用を解析する。すなわち、正常細胞における癌抑制遺伝子 p53 の HSP90 による制御機構、癌細胞における HSP90 と Pol η の相関と生理機能を解析する。「p53 が如何にして細胞の癌化を抑制するのか」、また「癌の悪性度 (ステージ) を規定する Pol η は HSP90 により如何なる制御を受けるのか」を解明する研究内容である。従来癌研究は、癌遺伝子等からのアプローチが殆どであり、分子シャペロン HSP90 を基盤とする本申請研究は極めて独創的であり、予想される結果とインパクトは極めて高い。本申請研究は、細胞の癌化機構の本論を解析できる可能性が極めて高い。

3. 研究の方法

一般に細胞の癌化機構、特に化学発癌の過程



は図のように考えられている。



平成 24 年度は以下の 2 点に重点を置き、HSP90 側からのアプローチを基盤とした化学物質の発癌システムを構築すると共に、細胞の癌化に伴う分子シャペロン複合体形成機構を解析する。

①HSP90-p53 の相互作用解析

化学発癌物質（イニシエーター、及びプロモーター）投与細胞における、HSP90 の検出正常細胞である正常ブタ腎臓近位尿管細胞 LLC-PK1 細胞やマウス線維芽細胞等に、発癌イニシエーターとして報告されているベンゾピレンとメチルコラントレン処理を施すことによって癌化を誘導作用させ、細胞の形態変化等を観察する。プロモーターとしてリトコール酸や Phorbol myristate acetate, Okadaic acid を細胞内に投与し、正常細胞から癌細胞への誘導を試みる。

細胞の発癌実験としては、発癌剤のみ、イニシエーター+プロモーターの 2 段階投与でも確認する。細胞の癌化に伴い、細胞の明確な形態変化が確認され得る。また、ソフトアガーでのコロニー確認や、foci の数を確認すると同時に、その foci をクローニングして、ソフトアガーや造腫瘍性で悪性を検討する。

これら化学物質の長期投与により、癌化誘導細胞内の HSP90-p53 と HSP90-Pol η 複合体を解析すると共に、細胞癌化過程に於いて、どの段階で HSP90-p53 と HSP90-Pol η 複合体が形成されるのかを明らかにする。また、ワイルドタイプ (wt), 及びホットスポット変位型 (mt) p53 を PET-3 系発現ベクターによる大腸菌での発現・精製後、4 量体形成 (wt p53 x 4 または mt p53 wt p53) における HSP90 の制御機構を明らかにする。特に、p53 の 4 量体組み合わせが如何なる法則に基づくのかを明らかにする。

このため、①wt₄ p53, wt₃mt₁ p53, wt₂mt₂ p53, wt₁mt₃ p53, mt₄ p53 を作製し、HSP90 との親和性の強さを、表面プラズモン解析 (SPR) にて計測し、K_d 値を求める。②HSP90 アフィニティーカラムを作製し、①の各種 p53 と結合させ、交換反応を行い、親和性の最も強い組み合わせを決定する。変位型 p53 に関しては、肺癌、肝臓癌、大腸癌等のホットスポットを参考にして発現・精製した p53 を使用する。p53 の精製標品は、すでに得ている。

②Pol η-HSP90 相互作用解析

当研究室では、ブタ脳から HSP90 を精製し、組織由来の HSP90 を有している。さらに、遺伝子組換えにより、HSP90 の機能的ドメイン



の発現・精製標品を得ている。

転写因子 Pol η は、右図の様な構造である。バキュロウイルス系での発現ベクターを構築すると共に、Pol η の Full length, 各種ドメインを発現・精製し、HSP90 単独、及び、分子シャペロン複合体との結合領域を同定する。具体的には、ゲル濾過法や、表面プラズモン解析 (SPR), Native PAGE, 蔗糖密度勾配超遠心分析法などにより、HSP90 結合領域を同定する。

申請者らは、抗癌剤シスプラチンや抗生物質の特異結合タンパク質がシスプラチンであり、その結合領域等を報告しており、実績がある。

・ Ito H, et al.: A novel chaperone-activity-reducing mechanism of the 90-kDa molecular chaperone HSP90. *Biochemical Journal*. 343: 697-703. (1999)

・ Miyazaki T, et al. and Ito H: 73-kDa molecular chaperone HSP73 is a direct target of antibiotic gentamicin. *Journal of Biological Chemistry*. 279: 17295-300. (2004)

・ Ishida R, Takaoka Y, Yamamoto S, Miyazaki M, Otaka M, Watanabe S, Komatsuda A, Wakui H, Sawada K, Kubota H, Ito H: Cisplatin differently affects amino terminal and carboxyl terminal domains of HSP90. *FEBS Letter* 582: 3879-3883 (2008)

このため、17-AAG やシスプラチン等の抗癌剤による Pol η の安定化や活性化能を解析することにより、新たな細胞の癌化機構・抗癌作用機構を提示する。

4. 研究成果

我々は、完全長ヒト Pol η を精製し、抗ウサギ特異抗体を得た。

ヒト Pol η は、N 末端に DNA 結合領域、C 末端に NLS 配列を有することが判明した。In vitro において、Pol η と HSP90 の相互作用を確認した。また、鋳型 DNA 伸張反応実験を行った結果、Pol η 単独より Pol η と HSP90 が共に存在する系で明確な鋳型 DNA の伸張が確認できた。これらの結果より、HSP90 は Pol η の生理機能を制御することが示唆された。培養細胞を用いた組織染色の結果、Pol η は HeLa 細胞の核小体、及び核周辺に局在が観察された。また、脳腫瘍患者さんの手術標本を染色した結果、低悪性度の Ependymoma と高悪性度の Glioblastoma において、Pol η は Glioblastoma により強いシグナルを検出した。がんの悪性度の違いにより、Pol η の発現量、局在が異なることが示唆された。

了する機構がある。この機構は、損傷乗り越え DNA 複製 (TLS: TransLesion Synthesis) と呼ばれている。高発がん性の遺伝疾患である色素性乾皮症バリエーション群の責任遺伝子産物は、DNA polymerase η (Pol η) であり、Pol η は主要な紫外線損傷であるシクロブタン型ピリミジン二量体を鋳型として正しいヌクレオチドを重合して忠実な TLS を担い、細胞や個体の紫外線抵抗性の獲得、発がん防御に重要な役割を担っている。また Pol η は、損傷の無い DNA を鋳型として大変誤りがちな DNA 合成を行い、免疫グロブリン遺伝子領域の体細胞超突然変異の生成にも寄与する。しかし、Pol η を含めた TLS の DNA polymerase の制御機構は、殆ど解明されていない。2010 年に Yamashita et al. は、Pol η と分子シャペロン HSP90 との相互作用を免疫沈降法により報告している。Pol η の活性化には HSP90 との相互作用が必須であることが示唆されているものの、分子レベルでの研究は殆ど報告がない。これは、Pol η の C 末端側が非常に不安定であるために、完全長 Pol η の精製が困難を極めることに起因する。

我々は、完全長ヒト Pol η を精製し、抗ウサギ特異抗体を得た。ヒト Pol η は、N 末端に DNA 結合領域、C 末端に NLS 配列を有することが判明した。*In vitro* において、Pol η と HSP90 の相互作用を確認した。また、鋳型 DNA 伸張反応実験を行った結果、Pol η 単独より Pol η と HSP90 が共に存在する系で明確な鋳型 DNA の伸張が確認できた。これらの結果より、HSP90 は Pol η の生理機能を制御することが示唆された。培養細胞を用いた組織染色の結果、Pol η は HeLa 細胞の核小体、及び核周辺に局在が観察された。また、脳腫瘍患者さんの手術標本を染色した結果、低悪性度の Ependymoma と高悪性度の Glioblastoma において、Pol η は Glioblastoma により強いシグナルを検出した。がんの悪性度の違いにより、Pol η の発現量、局在が異なることが示唆された。

本実験の分子レベルの解析により、Pol η は HSP90 と相互作用し、DNA の伸長を効率的に促進させることが判明した。Pol η は、がんの悪性度と強い相関を示した。また、核膜周辺に Pol η および HSP90 が共局在することは、HSP90-pol η 複合体の形成と解離が細胞のがん化、及びがんの悪性度に影響を与えることが示唆された。

日本分子生物学会要旨 2013. 12. 3-6, 神戸ポートアイランド

Analysis of interaction between HSP90 and DNA polymerase η

羽賀 愛沙美¹, 岡本知也¹, 畠山詩織¹, 菅原卓², 南條 博², 伊藤英晃¹

¹秋田大・院 工学資源学研究所 生命科学専攻

²秋田大・院 医学系研究所

損傷乗り越え DNA 複製 (TLS: TransLesion Synthesis) は、DNA 損傷により通常の DNA 複製を担う DNA ポリメラーゼの進行が阻害された際に、損傷を鋳型として DNA 合成を行える特殊な DNA ポリメラーゼを動員し、複製を続行・完了する機構である。

高発がん性遺伝疾患である色素性乾皮症バリエーション群の責任遺伝子産物は、DNA ポリメラーゼ・イータ (Pol η) であり、Pol η は主要な紫外線損傷であるシクロブタン型ピリミジン二量体を鋳型として正しいヌクレオチドを重合し、忠実な TLS を担い、細胞や個体の紫外線抵抗性の獲得、発がん防御に重要な役割を果たしている。また Pol η は、損傷のない DNA を鋳型として大変誤りがちな DNA 合成を行い、免疫グロブリン遺伝子領域の体細胞突然変異の生成にも寄与する。これまでの報告から、Pol η が活性化するためには分子シャペロン HSP90 との相互作用が必須であることが示唆されている。また、17-AAG のような HSP90 阻害剤は、Pol η の構造を不安定にし、結果としてがん細胞の増殖を抑制するものと考えられている。

本研究では、Pol η と HSP90 のタンパク質間相互作用の生理的意義を明らかにし、TLS 因子の制御機構、および染色体サイクルに関連した未知の機能の解明に繋がりたいと考えている。そこで今回は、完全長ヒト Pol η の構築、および精製を試みた。Pol η は非常に不安定なタンパク質であるが、C 末端に His-tag 付加することにより、Pol η の精製に初めて成功した。また、抗ウサギ Pol η の特異的な抗体を得た。その結果、HSP90 は Pol η の安定化に寄与すること、神経膠腫の中でも最もがんの悪性度が高い膠芽腫で核周辺に HSP90 と Pol η の強い相互作用が確認できた。一方、悪性度の低い上皮腫では、HSP90 と Pol η の相互作用は殆ど検出できなかった。

Pol η の活性化は、HSP90 が制御することが *in vivo* の研究から予想されている。このため、*in vitro* での HSP90 と Pol η の詳細な相互作用解析により、がんの種類や悪性度と HSP90 の相関、がん細胞における HSP90 と Pol η の相関と生理機能を解析する。「がんの悪性度を規定する Pol η は HSP90 によりいかなる制御を受けるのか」、HSP90 を中心に解明し、HSP90-pol η 複合体阻害剤の開発し、理想の抗がん剤開発の知見を得たい。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

(1) 羽賀愛沙美, 岡本知也, 畠山詩織, 黒澤友翼, 三瓶杏, 西聡美, 菅原卓, 南條博, 伊藤英晃, DNA polymerase η と HSP90 の相

相互作用解析,
第 8 回臨床ストレス応答学会大会, 2013 年
11 月 15 日, 信州大学
(2)羽賀愛沙美, 岡本知也, 畠山詩織, 菅原
卓, 南條博, 伊藤英晃, HSP90 と DNA
polymerase η の相互作用解析, 2013 年 12
月 3-6 日, 神戸市

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 英晃 (ITO H. Hideaki)

秋田大学・大学院工学資源学研究科・教授
研究者番号: 80168369