

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700952

研究課題名(和文) 発がんシグナルが誘導するDNA複製ストレス応答ークロマチン分子動態と治療への展開

研究課題名(英文) Analysis of replication stress responses caused by oncogenic signals

## 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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：発がんシグナルによる複製開始の過剰な活性化が、DNA再複製による遺伝子増幅をはじめとするゲノム不安定性を介して腫瘍形成を促進すると提唱されている。我々は、再複製にY-familyポリメラーゼ(Y-Pol)が複製ポリメラーゼと独立して関与することを見いだした。この研究成果は、発がん初期におけるゲノム不安定性の機構に新しい知見を提供する。また、複製忠実度の低いY-Polの関与は、がんゲノムにおいてコピー数の変化やDNA再構成とともに点突然変異が多く検出されることと合致する。我々の知見は、前がん病変から発がんへの悪性化メカニズムの一端を解明し、新たな治療法の開発へとつながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：DNA rereplication is a major type of oncogene-induced aberrant replication and plays an important role in genomic instability during tumor development. Rereplication causes DNA double strand breaks, resulting in copy number changes and genomic rearrangements. However, little is known on what DNA polymerases are involved in rereplication. Normal DNA replication is catalyzed by high-fidelity replicative polymerases, Pol  $\alpha$  and Pol  $\delta$ . Y-family polymerases (Y-Pols) are the major group of low-fidelity polymerases whose main function is bypass of replication blocks at sites of DNA damages, i.e. translesion synthesis. We found that Y-Pols as well as replicative polymerases, participate in rereplication.

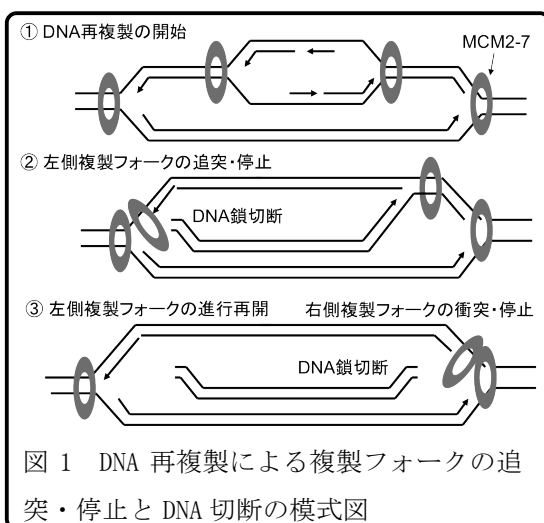
The present findings have important mechanistic implications in genomic instability during tumorigenesis. Speculatively, the involvement of Y-Pols in rereplication may account for frequent occurrence of single nucleotide variations in conjunction with gene rearrangements in cancer genomes.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：複製ストレス Y-familyポリメラーゼ 発がん遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

発がんは、それを促進する“driver”変異の蓄積によって進行する過程であり、様々なメカニズムによるゲノム不安定性がその基盤となる。特に、がん早期病変においては、driver変異による発がんシグナルがDNA複製ストレスを引き起こし、その結果起こるDNA損傷がゲノム不安定性の誘因になることが示唆されている。主なメカニズムとして、DNA複製開始の亢進→DNA再複製→複製フォークの衝突・崩壊→DNA二重鎖切断→相同組み換え、非同源末端接合→DNA増幅、再構成というモデルが提唱されている(図1)。一方、がんゲノムに多発する点突然変異の発生機序に複製忠実度の低いY-familyポリメラーゼ(Y-Pol)の関与が想定されているが、その機構は十分解明されていない。近年、UVや薬剤によるDNA損傷、また、転写に関連する複製ストレスやR-loop形成に対する応答機構に関する研究の進展が著しい。これらの知見を活かして、発がんシグナルが引き起こす複製ストレスにおけるY-Polの働きを解明することは、発がんの病態解明と新しい制御法の開発に、きわめて重要である。



## 2. 研究の目的

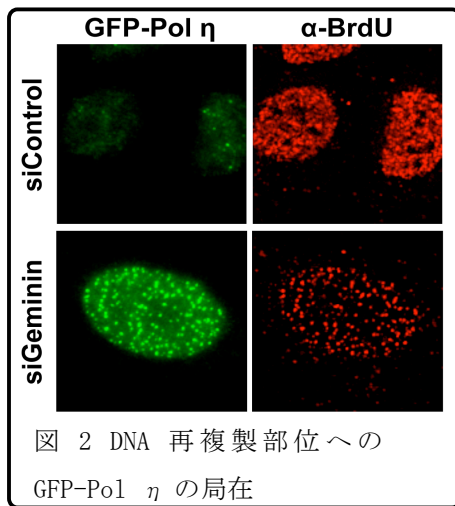
本研究では、発がんシグナルが誘導するDNA再複製におけるY-Polの働きを解析する。

## 3. 研究の方法

DNA再複製におけるY-Polの役割を解析するために、モデル実験系として汎用されるヒトU2OS細胞に、各種GFP-Y-Pol(Pol $\eta$ , Pol $\iota$ , Pol $\kappa$ , REV1)を安定的に発現する細胞を作製し(U2OS/GFP-Y-Pol)、RNA干渉法(RNAi)による複製開始制御因子Gemininの発現抑制によってDNA再複製を起こす実験系を樹立した。この実験系において、種々の細胞生物学、分子生物学、生化学的手法を用いて実験をおこなった。また、レンチウィルスの感染によりがん遺伝子cyclin EやヒトパピローマウィルスE6/E7を発現させ同様の実験をおこなった。

## 4. 研究成果

(1) Y-Polの動員に重要な働きをするモノユビキチン化PCNA(Ub-PCNA)が増加し、高倍数体細胞において、BrdUで標識したDNA再複製部位に共局在するGFP-Y-Polの核内フォークスの形成が見られ(図2)、Ub-PCNAとGFP-Pol $\eta$ の結合が増加することを免疫沈降法により確認した。また、最近開発された新規合成DNAと結合する蛋白を検出する手法(isolation of proteins on nascent DNA; iPOND)(Sirbu et al. Genes Dev 2011)による解析では、新規合成DNAと共沈するUb-PCNA、内因性Pol $\eta$ が増加した。さらに、RNAiによるY-Polの発現抑制は、再複製の進行を遅延させた。これらの結果は、再複製にY-Polが関与することを示唆する。



(2) Pol  $\eta$  のポリメラーゼ活性を欠損したドミナントネガティブ変異体を発現させた U2OS において、siGeminin で再複製を誘導すると野生型 Pol  $\eta$  発現細胞に比べて有意に再複製が抑制された。このことは、Pol  $\eta$  のポリメラーゼ活性が再複製に必要であることを示唆する。

(3) 4 種類の Y-Pol をすべての組み合わせで発現抑制した上で再複製を誘導すると、それぞれ単独の発現抑制と同程度の再複製抑制しか見られなかった。また、Y-Pol と複製ポリメラーゼ (Pol  $\delta$ , Pol  $\epsilon$ ) の組み合わせで発現抑制をおこなうと、再複製が相加的に抑制された。このことから、Y-Pol は同一経路で、Y-Pol と複製ポリメラーゼはそれぞれ独立して再複製に関与すると考えられる。

(4) U2OS 細胞にがん遺伝子 Cyclin E を、あるいはヒトケラチノサイト初代培養細胞にヒトパピローマウイルス E6/E7 蛋白を発現させた場合にも、再複製細胞の複製フォーカスに Pol  $\eta$  が集積した。また、前者では Pol  $\eta$  RNAi によって再複製が抑制された。これにより、発がん遺伝子が誘導する再複製においても Y-Pol が関与することを示唆される。

以上の結果は、DNA 再複製に Y-Pol が関与

することを強く示唆し、発がん初期におけるゲノム不安定性の機構に新しい知見を提供する。また、他のがん遺伝子にも複製開始の活性化亢進が報告されている点や、がんゲノムにおいてコピー数の変化や DNA 再構成とともに点突然変異が多く検出されることと合致し、近年盛んに報告されている腫瘍における点突然変異発生率の亢進を説明するかもしれない。我々の知見は前がん病変から発がんへの悪性化メカニズムの一端を解明し、新たな治療法の開発へとつながる可能性がある。

## 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 2 件)

- ① Yamashita T., Oda T., Sekimoto T. Translesion DNA synthesis and Hsp90. *Genes and Environment*, 34, 89-93 (2012) (査読有)
- ② Sekimoto T., Oda T., Kurashima K., Hanaoka F., Yamashita T., Both high fidelity replicative and low fidelity Y-family polymerases are involved in DNA rereplication. *Mol Cell Biol*, 35, 699-715 (2015) (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

- ① 関本隆志、小田司、益谷央豪、花岡文雄、山下孝之、Polymerase eta is involved in oncogene-induced DNA re-replication and DNA damage response. 第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 20 日札幌
- 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13日福岡

- ③ 小田司、関本隆志、益谷央豪、花岡文雄、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12日福岡
- ④ 関本隆志、小田司、益谷央豪、花岡文雄、山下孝之、Y-family polymerases participate in oncogene-induced DNA re-replication. 第72回日本癌学会学術総会、2013年10月4日横浜
- ⑤ 小田司、関本隆志、山下孝之、DHRS2: a potential mediator of cellular senescence induced by depletion of heat shock factor 1 (HSF1). 第72回日本癌学会学術総会、2013年10月3日横浜
- ⑥ 関本隆志、小田司、倉島公憲、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 再複製に関与する。第36回日本分子生物学会、2013年12月5日神戸
- ⑦ 小田司、関本隆志、倉島公憲、山下孝之、DHRS2 は、熱ショック転写因子 HSF1 の発現抑制で誘導される細胞老化に関与する可能性がある。第36回日本分子生物学会、2013年12月4日神戸
- ⑧ 倉島公憲、小田司、関本隆志、小林広実、尤礼佳、花岡文雄、山下孝之、c-Myc による DNA 複製ストレスに DNA ポリメラーゼ  $\eta$  が関与する。第36回日本分子生物学会、2013年12月5日神戸
- ⑨ 倉島公憲、小田司、関本隆志、花岡文雄、山下孝之、DNA polymerase  $\eta$  (Pol  $\eta$ ) suppresses c-myc-induced replication stress. 第73回日本癌学会学術総会、2014年9月27日横浜
- ⑩ 小田司、関本隆志、倉島公憲、山下孝之、Inhibition of Heat Shock Factor 1

(HSF1) selectively activates cellular senescence program in Ras V12-transformed cells. 第73回日本癌学会学術総会、2014年9月27日横浜

[その他]

ホームページ等

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

## 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