

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710057

研究課題名(和文) がん抑制遺伝子 LKB1 のクロマチン制御における機能解析と、放射線・抗がん剤感受性

研究課題名(英文) LKB1-AMPK2 signaling promotes non-homologous end joining by regulating SWI/SNF chromatin remodeling

研究代表者

宇井 彩子 (Ui, Ayako)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：00469967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000 円、(間接経費) 1,110,000 円

研究成果の概要(和文)：がん抑制遺伝子のLKB1は、細胞質で細胞増殖・細胞極性・エネルギー代謝に関与することが知られていた。私は、新たにLKB1がDNA二重鎖切断後に核内でクロマチン制御因子を制御するという新規機能を発見した。LKB1はクロマチンリモデリング因子のSWI/SNF複合体と相互作用し、そのクロマチンへの集積に必要であり、機能制御にかかわることを明らかにした。また、LKB1だけでなく、その下流のAMPK2キナーゼもこのクロマチンリモデリングの機能の制御にかかわることを明らかにした。この結果は、論文として国際誌に発表した(Ui et al. 2014. Oncogene)。

研究成果の概要(英文)：LKB1 regulates multiple processes by phosphorylating adenosine monophosphate-activated protein kinases (AMPKs). LKB1 and AMPK2 proteins were found here to be recruited to DNA double strand break (DSB) sites. Their depletion or inhibition compromises the ability of cells to repair DNA by non-homologous end joining (NHEJ) by suppressing accumulation of KU70, a key NHEJ protein, and of BRM, a catalytic subunit in the SWI/SNF complex to DSB sites, resulting in the occurrence of chromosome breaks. Histone H2B mutants lacking AMPK2 phosphorylation site impaired the KU70 and BRM recruitment. LKB1-AMPK2 signaling is likely to regulate NHEJ and contribute to genome stability.

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：LKB1 クロマチンリモデリング DSB修復 AMPK2 SWI/SNF

1. 研究開始当初の背景

がん抑制遺伝子 LKB1 は、消化管ポリポーシスや粘膜炎・皮膚の色素斑形成を主な症候とし、がんの発症リスクが健常人に比較して著しく高い遺伝性疾患、ポイツ・イェーガー症候群 (Peutz-Jeghers Syndrome; PJS) の原因遺伝子である。また、LKB1 は肺がんの約 30% で機能欠失変異がみられることから、がん抑制遺伝子であると考えられている。今までに LKB1 はリン酸化酵素であり、細胞増殖・細胞極性・エネルギー代謝、転写など、様々な細胞内機能に関与していることが報告されている。しかし機能が多岐に渡るため、どの機能が細胞がん化に関与しているかなどの明確な答えは明らかになっていないため、国内外で LKB1 の研究が進められている。

最近、LKB1 がクロマチン構造制御因子 (クロマチンリモデリング因子) と共に機能する可能性が見出された。クロマチンリモデリング因子はクロマチン構造の弛緩や凝集することで DNA 複製・転写・修復などを制御していることから、細胞が増殖するのに必須なイベントに機能している。また、近年、がん細胞で様々なクロマチンリモデリング因子が欠損していることが報告されていることから、クロマチンリモデリングと細胞がん化は深く関連していると考えられており注目を集めている。今までに LKB1 はリン酸化酵素であり、細胞増殖・細胞極性・エネルギー代謝など、様々な細胞内機能に関与していることが示唆されてきているが、その詳細はまだ不明な点が多く、どの機能が細胞がん化に関与しているかなどの明確な答えは明らかになっておらず、世界中で LKB1 の機能解析の研究が進められている。

2. 研究の目的

私は、新たに LKB1 が DNA 二重鎖切断後に核内でクロマチン制御因子を制御するという新規機能を発見した。このクロマチンの制御は核内での DNA 複製・転写・DNA 修復という細胞内の必須な生命維持の機構において重要な役割を果たすと考えられている。このため、この LKB1 のクロマチン制御における新規機能の解析は、細胞の生命維持の機構の解明につながると考えられる。また、LKB1 やクロマチンリモデリング因子は細胞がん化と深くかかわっているため、この基礎研究結果をがん化のメカニズムの解明や新たながん治療の開発に役立てたい。そこで、主に以下の二点について明らかにする目的として、研究を進める。

(1) LKB1 のクロマチン制御機構の解明
今までの上記の私の研究から、DNA 二重

鎖切断後に LKB1 のリン酸化シグナル経路が制御しているクロマチンリモデリング因子は、BRM を含む SWI/SNF 複合体であることが明らかになったが、他のクロマチンリモデリング複合体である ISWI 複合体に関しても機能を制御するという結果が得られている。そこで、その相互作用因子の同定と作用機序について詳細を明らかにする。

(2) LKB1 と DNA 二重鎖切断の正常な修復の完了機構と細胞がん化との関連
私は初めて、LKB1 が DNA 二重鎖切断後に SWI/SNF を制御してクロマチン構造を変化させ、DNA 修復を促進していることを発見した。しかし、LKB1 の上記以外のクロマチン制御や DNA 修復などの核内機能については不明な点が多い。LKB1 欠損がん細胞では、クロマチン制御や DNA 修復に異常がおき、染色体不安定性に繋がっている可能性があり、LKB1 のこれらの機能解析は細胞がん化のメカニズムの解明につながると考えられる。そこで、LKB1 のクロマチン制御や DNA 修復における機能の詳細を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) LKB1 のクロマチン制御機構の解明
私は、LKB1 がいくつかのクロマチンリモデリング因子と相互作用することを見出した。

そこで LKB1 のリン酸化シグナルがこの複合体の活性制御に関与している可能性もあり、実際にバイオフィオマティクス解析から、すでに複合体のリン酸化部位の候補も絞られている。そこで、リン酸化部位の同定と、リコンビナント蛋白質を用いて *in vitro* アッセイを行う。

さらに、細胞内でその変異体が DNA 切断修復に与える影響を、レーザー光を用いて *in situ* に細胞核内に局所的に DNA 切断を作りリアルタイムで観察することにより、LKB1 がこのクロマチンリモデリング複合体の修飾を介して、DNA 二重鎖切断が起きた後のクロマチンの状態をどのように制御し、正常な DNA 修復を促進するのかを検討する。

(2) LKB1 と DNA 二重鎖切断の正常な修復の完了機構との関連

LKB1 リン酸化シグナルの細胞質内の機能は近年明らかになってきており、細胞質内の相互作用因子もいくつか同定されている。しかし、核内における機能や相互作用因子はほとんど明らかになっていないため、今後さらに LKB1 の DNA 修復やクロマチン制御における機能を明らかにする必要がある。

そこで、nanoLC/MS/MS を用いたプロテ

オーム解析技術により、細胞核抽出液を用いて核内で結合する新規相互作用因子と、また DNA 切断を起こした時に結合する新規相互作用因子の同定を行い、LKB1 が関与するクロマチン制御や DNA 修復を検討する。これらの解析は、すでに現在進行中であり、いくつかの候補は同定されている。

さらに、LKB1 欠失細胞でこれらの候補の DNA 損傷後の動的変化を、レーザー光を用いて DNA 切断を作りリアルタイムで観察する。これらの結果から、DNA 二重鎖切断後、LKB1 が制御しているクロマチンリモデリング因子や DNA 切断修復経路の同定をおこなうことにより、LKB1 変異株では DNA 修復がどの段階で止まって修復異常が起きているかを検討する。これらの解析から、LKB1 の染色体不安定性の抑制機構を明らかにする。

(3) クロマチンリモデリング因子のがん細胞における欠損との関連

LKB1 に加えて、いくつかのクロマチンリモデリング因子 (BRG1 等) は、がん細胞株で高頻度に欠損・変異・エピジェネティックなサイレンシング等により発現低下していることが知られている。また、近年、クロマチンリモデリング因子の発現低下細胞は、DNA 二重鎖切断を起こさせる放射線・抗がん剤処理により、感受性になり、細胞死を起こすことが報告されていることから、これらの発現低下がん細胞では治療を選択できる可能性がある。

そこで、様々な肺がん細胞株を用いて他のクロマチンリモデリング因子の発現低下を調べたところ、私はいくつかのクロマチンリモデリング因子は、がん細胞で発現が低下していることを見出し、新規がん抑制遺伝子の候補であると考えられた。今後さらに、国立センター河野隆志分野長と、荻原秀明研究員と共同研究で、網羅的にがん細胞での発現等を検討し、新規がん抑制遺伝子であることを確認すると共に、LKB1 との機能的関連と、この因子が関与する修復経路や作用機序を同定する予定である。

(4) クロマチンリモデリング因子欠損がん細胞の放射線・抗がん剤感受性の検討

LKB1 やクロマチンリモデリング因子が関わる DNA 切断修復経路の同定やその作用機序が明らかになれば、それらの因子が発現低下等により機能欠損したがん細胞において、欠損分子を標的とした適切な抗がん剤の選択ができると考えられる。現在、がん治療に用いられている放射線やいくつかの抗がん剤は、DNA 損傷の中でも DNA 二重鎖切断を生じる薬剤が

ある。さらに DNA 切断修復経路の修復経路の一つである NHEJ 経路を選択的に阻害する NU7026 や、もう一方の修復経路の HR (homologous recombination) 経路に関与する因子の欠損により死をもたらす PARP inhibitor などの臨床化も進んでいる。そこで、(1)(2)の解析により同定された修復経路や作用点の結果から、上記タイプの DNA 二重鎖切断誘導薬剤を組み合わせ、(3)の解析で得られる新規がん抑制遺伝子の発現低下が起きているがん細胞の細胞死を、効率よく誘導する方法を見出し、新たながん治療への応用を目指す。

4. 研究成果

(成果の概要)

私は、新たに LKB1 が DNA 二重鎖切断後に核内でクロマチン制御因子を制御するという新規機能を発見した。LKB1 はクロマチンリモデリング因子の SWI/SNF 複合体と相互作用し、そのクロマチンへの集積に必要であり、機能制御にかかわることを明らかにした。また、LKB1 だけでなく、その下流の AMPK2 キナーゼもこのクロマチンリモデリングの機能の制御にかかわることを明らかにした。さらに、このクロマチンリモデリングの機能が、DNA 修復因子 (non-homologous end joining 経路の修復因子:NHEJ)の DNA の正常な修復を促進し、放射線やいくつかの抗がん剤に対して抵抗性を示すことを見出した。この結果は、論文として国際誌に発表した (Ui et al. 2014. Oncogene)。

私が今回、新たに明らかにした成果の内容の詳細は、以下の三点である。

(1) LKB1 のクロマチン制御機構の解明

がん抑制遺伝子 LKB1 の機能解析を行った。その結果、LKB1 はクロマチンリモデリング因子の BRM、BRG1 だけでなく、ACF1 とも相互作用することが明らかになった。また、LKB1 のリン酸化シグナル経路は、クロマチンリモデリング因子の DNA 二重鎖切断部位への結合促進することが明らかになった。さらに、この経路に、AMPK2 も関与することが明らかになった。

(2) LKB1 と DNA 二重鎖切断の正常な修復の完了機構との関連

LKB1/AMPK2 のリン酸化シグナル経路は、クロマチンリモデリング因子の DNA 二重鎖切断部位への結合促進し、さらに、クロマチン構造変化を介して、DNA 修復因子 (non-homologous end joining 経路の修復因子:NHEJ)の DNA 損傷部位の認識と結合を促し、DNA の正常な修復を促進することにより、修復異常を抑制していることが明らかになった。

(3) クロマチンリモデリング因子のがん細胞における欠損との関連と、クロマチンリモデリング因子欠損がん細胞の放射線・抗がん剤感受性の検討
siRNAによるLKB1ノックダウン細胞では、放射線だけでなく、一部の抗がん剤に感受性になることが明らかになった。さらに、LKB1と物理的・機能的に相互作用するクロマチンリモデリング因子のいくつかの因子も、上記の放射線や抗がん剤に感受性になることが明らかになった。

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 3件)

1. Possible involvement of LKB1-AMPK signaling in non-homologous end joining.

Ui A, Ogiwara H, Nakajima S, Kanno S, Watanabe R, Harata M, Okayama H, Harris CC, Yokota J, Yasui A, Kohno T
Oncogene. 2014 Mar 27;33(13):1640-8. doi: 10.1038/onc.2013.125. Epub 2013 Apr 15. 査読あり

2. Fine-tuning of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB2 supports the DNA repair pathway choice.

Kato K, Nakajima K, Ui A, Muto-Terao Y, Ogiwara H, Nakada S.
Mol Cell. 2014 Feb 20;53(4):617-30. doi: 10.1016/j.molcel.2014.01.030. 査読あり

3. Curcumin suppresses multiple DNA damage response pathways and has potency as a sensitizer to PARP inhibitor.

Ogiwara H, Ui A, Shiotani B, Zou L, Yasui A, Kohno T.
Carcinogenesis. 2013 Nov;34(11):2486-97. doi: 10.1093/carcin/bgt240. Epub 2013 Jul 3. 査読あり

[学会発表](計 4件)

1. 染色体ワークショップ(箱根)

2013年11月25日~2013年11月27日
「MLL融合遺伝子 ENL は転写抑制とDSB修復の制御に関する」
発表者: 宇井彩子

2. 3R(仙台秋保)

2013年11月20日~2013年11月22日
「MLL融合遺伝子 ENL は転写抑制とDSB修復の制御に関する」
発表者: 宇井彩子

3. 遺伝研研究会(三島)

2013年9月27日~2013年9月28日
「DNA二重鎖切断修復と転写におけるMLL融合遺伝子、ENLの機能」
発表者: 宇井彩子

4. 第二回DNA損傷応答ワークショップ(浜松)

2013年4月4日~2013年4月5日
「DNA修復とクロマチンリモデリング」
発表者: 宇井彩子

[図書](計 0件)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇井 彩子 (UI AYAKO) (代表)
東北大学・加齢医学研究所・助教
研究者番号: 00463367

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号: