

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25701005

研究課題名（和文）ATRの新規基質の網羅的同定及び機能解析

研究課題名（英文）Identification and dissection of ATR substrates

研究代表者

塩谷 文章（Shiotani, Bunsyo）

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・主任研究員

研究者番号：10627665

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 18,200,000円

研究成果の概要（和文）：ATRはDNA損傷応答を制御し、ゲノムの安定性を維持するキナーゼである。ATRはより広範なDNA損傷に応答し、多様な機能を示す事が明らかにされてきている。本課題ではATRのDNA構造依存的な活性化を基にATRの直接的な基質を網羅的同定し機能を明らかにする事を目的に研究を行った。成果として、DNA二本鎖切断部位における新規ATR活性化機構を見出した。またアナログ感受性ATR変異体を作成し、多くの未知基質の検出及び同定に成功した。

研究成果の概要（英文）：ATR is a kinase that regulates the DNA damage response and maintains genome stability. ATR has been shown to respond to a wider range of DNA damage and exhibit diverse functions. In this study, we aimed to clarify the mechanism underlying DNA structure-dependent activation of ATR and to identify the direct substrate of ATR. As a result, we found a novel ATR activation mechanism at the DNA double strand break site. We also made analog susceptible ATR mutants and successfully detected and identified many unknown substrates.

研究分野：DNA損傷応答

キーワード：ATR DNA損傷応答 DNA複製ストレス

1. 研究開始当初の背景

すべての生命体の最も根本的な目的は、それぞれの持つ遺伝物質すなわち DNA を、そのままに変化なく次の世代に提供することである。しかしながら、真核生物のゲノム DNA は継続的に内的及び外的要因によって損傷の危機にさらされている。その起源にかかわらず DNA 損傷は遺伝子不安定性を誘発し、細胞の生存を脅かし、また生命体のがんをはじめ様々な疫病をもたらす原因となる。これらの DNA 損傷による脅威に対抗するため、真核生物は DNA 損傷応答 (DNA Damage Response: DDR) というメカニズムを獲得・進化させてきた。DNA 損傷応答は細胞周期、DNA 複製、DNA 修復、アポトーシス及び細胞老化等を制御するシグナル伝達経路から成る。この内、phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-related protein kinases (PIKKs) に属する Ataxia telangiectasia mutated (ATM) や Ataxia telangiectasia and Rad3 related (ATR) は DDR の最上流において主要な役割を果たす。申請者は DNA 損傷構造特異的な ATM、ATR の活性化機構を詳細に調べるため、合成 DNA とヒト細胞抽出液を用いた DNA-based In vitro checkpoint assay を開発した。このアッセイを用いて、DNA 二本鎖切断 (DSB) 応答において DSB Resection によって形成される ssDNA が ATM から ATR へのスイッチ機構を促進することで、DSB 応答は ATM と ATR によって段階的に制御されることを明らかにした。また、ATR の活性化には Thr1989 の自己リン酸化が必須であることを示し、驚くべきことに Thr1989 はこれまでに報告のある ATR の認識配列 TQ 配列ではなく TP であることから ATR が SQ/TQ 配列ではない配列も基質とすることを初めて示した。これらの研究から ATR はこれまで考えられてきたよりもより広範な DNA 損傷構造に応答し活性化すること及び ATR の基質特異性に多様性が認められたことから、ATR の機能の抜本的解明にはさらなる ATR 活性化機構の解明および ATR 特異的な基質の同定が必須と考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

1) DSB は遺伝子の突然変異や転移、欠失の原因となる最も危険な DNA 損傷であり、DSBs の末端構造はエクソヌクレアーゼによって切除され (DSB Resection) 3' 突出末端を生ずることなどから、末端の構造は常に変化する。DSB Resection によって形成される ssDNA は ATR 依存的な RPA32 (Ser33) のリン酸化を誘導するが、このリン酸化にはこれまでに ATR 活性化に必須とされてきた Rad17 複合体ではなく Nbs1 が関与することを見出した。これらのことから、DSB における Nbs1 を介した ATR 活性化機構を明らかにし、DNA 損傷応答における ATR の新たな機能を解析するため、研究を行った。

2) ATM と ATR は主に SQ/TQ 配列を標的としてリン酸化するなど、生化学的及び機能的に

非常に良く似た性質を示すことが知られており、標的とする基質はそれぞれ重複すると考えられている。しかし、ATR は外的 DNA 損傷非存在下であっても細胞増殖に必須であることに対して ATM は必須ではない。この理由として、ATM は発生頻度の低い DNA 二本鎖切断 (DSB) に応答するのに対して、ATR は DSB を含むほぼ全ての DNA 損傷に応答することがあげられる。このような背景から ATR は DNA 複製に伴い生ずる内的なゲノムのストレスに応答し活性化され、S 期の進行及び G2/M 期への移行を制御することが示唆されているが、その具体的な機能、及び基質はほとんど知られていない。近年、ATM/ATR の SQ/TQ 配列に特化した基質の大規模なスクリーニングが報告され、およそ 600-700 種類のタンパク質におけるリン酸化部位が同定された。しかしながらこれらの報告では ATM 及び ATR を同時に活性化する DNA 損傷依存的 (放射線及び紫外線) なリン酸化が同定されており、ATR 特異的な基質の特定は非常に困難である。最近、Analog-Sensitive kinase (AS-kinase) 法を用いた特異的リン酸化基質の網羅的解析が報告がされている。AS-kinase とは自然界には存在しない ATP アナログを使用できるように ATP-binding pocket を改変したキナーゼのことである。AS-kinase は基質の特異性には影響を与えないことからこの改変を ATR に導入することにより ATR の特異的な基質の同定が可能になることが期待される。ここでは、AS-ATR の特異的な基質を網羅的に解析し、ATR によるゲノムの安定性維持機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

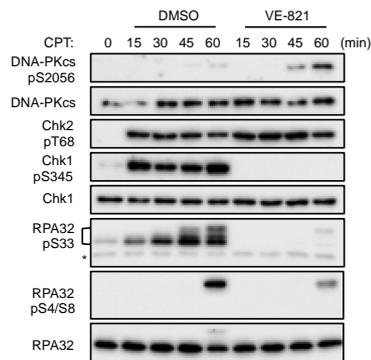
1) Nbs1 及び機能ドメイン変異体の生化学的性質の解析にはヒト細胞 (293T)、昆虫細胞 (Sf9) または大腸菌より精製したタンパク質を用いて解析した。Nbs1 の RPA-ssDNA 結合ドメインを解析し、RPA-ssDNA に結合しない Nbs1 変異体を作成した。ヒト培養細胞の核抽出液及び合成 DNA を利用した DNA-based In vitro checkpoint assay を用いて DSB 応答における Nbs1 を介した ATR 活性化について解析した。培養細胞を用いた実験では RNAi 干渉法により Nbs1 及び Rad17 ノックダウンを行ったこれらの細胞において DSB が誘導する ATR 依存的なリン酸化を同定し、Nbs1 依存性について検討した。Nbs1 ノックダウン細胞に野生型または RPA-ssDNA に結合しない Nbs1 変異体を導入し Nbs1 野生型と RPA-ssDNA に結合しない Nbs1 変異体を細胞に発現し DSB 応答における DNA 修復や細胞周期制御に及ぼす影響を解析した。

2) AS-ATR を作成するため ATR キナーゼドメインの ATP 結合部位に存在する "Gatekeeper" アミノ酸残基に変異を導入し N6 位を改変した ATP アナログに感受性の AS-ATR 候補を作成した。これら候補 AS-ATR と ATP アナログ数種存在下で pRPA32(Ser33) リン酸化を指標

にキナーゼアッセイを行い、活性を示す AS-ATR とアナログ ATP の組み合わせのスクリーニングを行った。AS-ATR さらに γ -phosphoryl oxygen を S に置換した ATP アナログ-gamma-S を用いて核抽出液中で合成 DNA により ATR を活性化しキナーゼ反応により基質を thiophosphate で標識した。AS-ATR を免疫沈降し共沈するタンパク質を回収しトリプシン消化後、iodoacetyl-agarose により thiophosphate 標識されたペプチドを捕獲した。続いて加水分解処理によって thiophosphate 標識されたペプチドを選択的に遊離し LC-MS/MS 解析を行った。研究の過程でアナログ ATP の細胞膜透過性が非常に低いことが判明したため、AS-ATR 発現細胞を用いた細胞内における ATR 基質同定の予定を変更し、内因性 DNA 複製ストレスを誘発する k-ras 変異体発現細胞核内におけるリン酸化動態を網羅的に解析した。

4. 研究成果

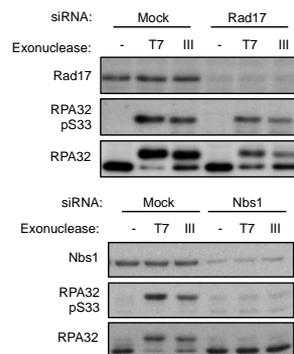
1) Camptothecin (CPT) によって誘発される DSBs 応答の解析から、Chk1, Rad17, RPA32, 及び ATR のリン酸化は ATR の選択的阻害剤である VE-821 によって抑制されたことから、これらのリン酸化が ATR 依存的であることを示した。また Chk1 のリン酸化は CPT 処理後間もない 15 分で認められるのに対し、RPA のリン酸化は時間依存的に段階的にリン酸化が認められた。このことから RPA のリン酸化は DSB 部位で起こる 5' から 3' へ起こる DNA の削り込み (DSB resection) によって生ずる一本差 DNA (ssDNA) によって制御される可能性が示唆された (下図)



Chk1 および RPA は経時的に異なったリン酸化速度が認められたことから、ATR はこれらの基質に対して異なったメカニズムによって制御されているのではないかと考えた。そこで RNA 干渉法により Rad17 の発現を抑制したところ、これまで報告されているように Chk1 (S345) のリン酸化は非常に効率よく抑制されたのに対して、RPA (S33) のリン酸化は抑制されなかった。一方、DNA 損傷応答に密接に関与することで広く知られる Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) 複合体の構成因子の一つである Nbs1 の発現抑制は Chk1 のリン酸化に及ぼす影響は弱いにも関わらず、RPA のリン酸化を非常に強く抑制したことから、Rad17 と異なり Nbs1 は RPA のリン酸化に対し

てより重要な役割を果たすことが明らかとなった。

DNA-based In vitro checkpoint assay により Nbs1 による直接的な RPA のリン酸化に及ぼす影響を検討した。このアッセイでは直鎖状の二本鎖 DNA をあらかじめ exonuclease によって処理することで ssDNA を露出させることにより DSB resection を模倣し、また ATM および DNA-PKcs の阻害剤存在下で実験を行った。RPA (S33) のリン酸化は Rad17 発現抑制細胞から準備した核抽出液中においてわずかな抑制しか認められないのに対して、Nbs1



発現抑制細胞より準備した核抽出液中では顕著な RPA (S33) のリン酸化の抑制が認められた。

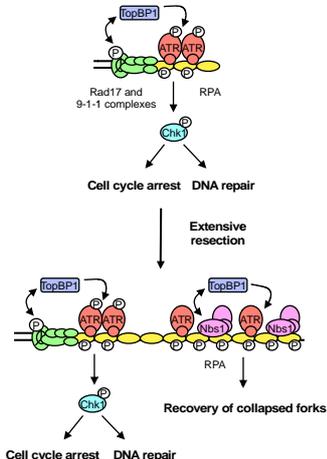
(下図)

次に DSB resection 後に Nbs1 がどのように ATR の活性化に関わるのかについて検討した。ssDNA プルダウンアッセイを行ったところ精製した MRN 複合体は RPA 依存的に ssDNA に結合し、またその結合は Nbs1 に依存することを見いだした。また様々な Nbs1 変異体を用いた解析から Nbs1 の RPA-ssDNA に重要な働きをするアミノ酸配列 (559EDE561) を決定し、EDE を AAA に置換した全長 Nbs1 は RPA-ssDNA に結合しないことを確認した。

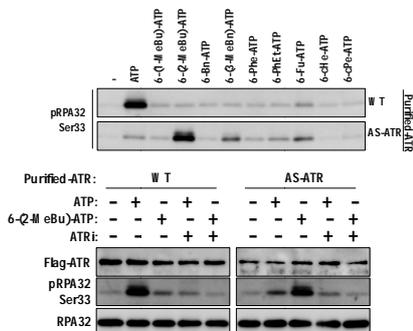
Nbs1 と RPA-ssDNA との結合が RPA32 (S33) のリン酸化に重要かどうかを検討するため、内在性の Nbs1 を RNA 干渉により発現を抑制し、RNA 干渉抵抗性の野生型 Nbs1 または EDE 変異体を発現する細胞を構築した。野生型 Nbs1 を発現した細胞では CPT によって誘発される RPA32 (S33) のリン酸化が認められるのに対して、EDE 変異体を発現した細胞では RPA32 (S33) のリン酸化が顕著に抑制された。このことは、Nbs1 と RPA-ssDNA との結合が DSB resection 後に起こる ATR 依存的な RPA32 (S33) のリン酸化に重要な働きを示している。さらに、Nbs1 による RPA の認識が DNA 損傷応答に及ぼす影響を検討した。S 期に同調した Nbs1 野生型及び EDE 変異体発現細胞において CPT 処理によりほぼ同等 (約 80%) の γ H2AX (DNA 損傷マーカー) foci 陽性細胞が認められた。CPT 除去 24 時間後において γ H2AX foci 陽性細胞の割合を比較したところ、Nbs1 野生型発現細胞ではほぼ認められないのに対して、EDE 変異体発現細胞においてはおよそ 40% の陽性細胞が残存してい

た。これらのことから Nbs1 を介した ATR の活性化は CPT によって誘発される DSBs の修復に重要な働きをすることが明らかとなった。

以上より、DSBs 発生後、DSB resection の開始とともに ssDNA/dsDNA ジャンクションが形成され、Rad17 複合体がリクルートされ、9-1-1 複合体をローディングする。この Rad17 を介した ATR の活性化は ssDNA/dsDNA ジャンクション付近で Chk1 のリン酸化を促進する。DSB resection の進行に伴い ssDNA は長くなり、ATR-ATRIP 複合体が ssDNA/dsDNA ジャンクションから離れた位置にリクルートされる。このとき MRN 複合体が Nbs1 を介して RPA を認識し TopBP1 をリクルートすることにより ATR を活性化し、RPA32 のリン酸化を促進するモデルを提唱した(下図)。ATR の活性化が Rad17 及び Nbs1 を介した二つの異なる機構によって制御される異なる基質のリン酸化制御することは、DSB 応答において ATR が二層性に機能しゲノムの安定性を維持する可能性を示している。

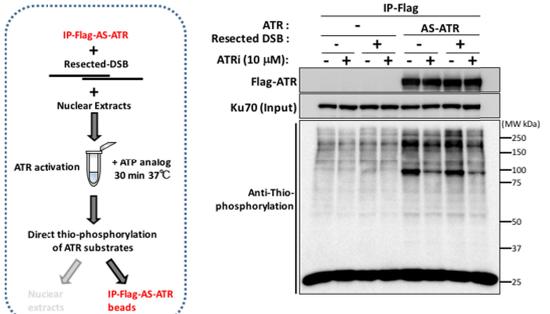


2) 本研究では ATR 特異的リン酸化基質の網羅的な解析を行うため、自然界には存在しない ATP アナログを利用できるように ATR のキナーゼドメイン中の ATP-binding pocket を改変した。ATR のファミリーキナーゼである ATM における Y2365A 改変によって AS-ATM 作成に成功したと報告を参考に ATR において Y2365A を導入したところ、予想に反してキナーゼ活性が完全に失われた。そこで Y2365A に加えて ATP 結合部位に変異を様々に導入しキナーゼ活性を維持する AS-ATR 候補を約 60 種類作成し、これらの中から 6-(2-Mebu)-ATP 存在下で活性を示す Analog sensitive ATR (AS-ATR) を同定した。またこの活性は ATR 阻害剤存在下で効率よく抑制されたことから ATR 特異的な活性を維持していることをみだした(下図)。



また 6-(2-Mebu)-ATP-gamma-S 存在下で AS-ATR は ATR 特異的基質である Rad17 及び RPA32 に対してキナーゼ活性を示すことを確認した。

次に核抽出液中において ATR を活性化する合成 DNA、免疫沈降法により精製した Flag-AS-ATR を、6-(2-Mebu)-ATP-gamma-S 存在下でインキュベートしたのち、Flag-AS-ATR と共沈するタンパク質におけるチオリン酸化をウエスタンブロット法によって解析したところ多くの未知基質をチオリン酸化することが明らかとなった。またこれらのチオリン酸化は ATR 阻害剤存在下において抑制されたことから、ATR 特異性の極めて高い基質が検出可能となった(下図)。



AS-ATR によってチオリン酸化された基質ペプチドを Sulfolink beads にて精製し質量分析による解析を行った。その結果、19 種類のタンパク質上に 23 種の新規リン酸化部位を同定した。これらのリン酸化配列には典型的な SQ/TQ 配列およびこれらとは異なる配列を認められた。これらのことから ATR はこれまでに知られていない未知基質をリン酸化することにより DNA 損傷応答を制御することを見出した。

次にがん遺伝子誘発性の内因性 DNA 複製ストレス応答を解析するため、変異型 K-Ras を正常肺上皮細胞に導入し形質転換を誘導する肺腺がんモデルを構築した。正常上皮細胞に比べて変異型 K-Ras 発現細胞は ATR 阻害剤に対して強い感受性を示したことから、ATR 依存性が高いことが示された。また変異型 K-Ras 発現細胞から調整した核抽出液中のリン酸化プロテオーム解析から DNA 複製ストレス応答性のリン酸化基質を含む約 400 種類のリン酸化サイトを同定した。この中には ATR が認識する SQ/TQ 配列を有する 90 基質を含むこと、これらのうち正常細胞で 2 倍以上リン酸化されている基質を 3 種類、変異型 K-Ras 発現細胞において 2 倍以上リン酸化を認める基質を 7 種類同定した。しかしこれまで報告のある外的 DNA 損傷応答で認められる ATR 基質のリン酸化は顕著には認められなかった。これらのことから内因性 DNA 複製ストレス応答における ATR は外的要因による DNA 損傷応答時とは異なる基質群をリン酸化することにより染色体を安定に維持しがん細胞の生存を維持することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Asano N, Yoshida A, Mitani S, Kobayashi E, **Shiotani B**, Komiyama M, Fujimoto H, Chuman H, Morioka H, Matsumoto M, Nakamura M, Kubo T, Kato M, Kohno T, Kawai A, Kondo T, Ichikawa H. Frequent amplification of receptor tyrosine kinase genes in well differentiated/dedifferentiated liposarcoma. *Oncotarget*. 8: 12941-12952 doi: 10.18632/oncotarget.14652; (2017)

Matsunuma R, Niida H, Ohhata T, Kitagawa K, Sakai S, Uchida C, **Shiotani B**, Matsumoto M, Nakayama KI, Ogura H, Shiya N, Kitagawa M. UV Damage-Induced Phosphorylation of HBO1 Triggers CRL4DDB2-Mediated Degradation To Regulate Cell Proliferation. *Mol Cell Biol*. 36: 394-406; doi: 10.1128/MCB.00809-15. (2015)

Hirokawa T., **Shiotani B**, Shimada M., Murata K., Johmura Y., Haruta M., Tahara H., Takeyama H., and *Nakanishi M., CBP-93872 is an inhibitor of NBS1-mediated ATR activation that abrogates maintenance of the DNA-double-stranded break-specific G2 checkpoint. *Cancer Res.*, 74: 3880-3889, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3604. (2014)

***Shiotani B**, Nguyen H. D., Håkansson P., Maréchal A, Tse A., Tahara H., and *Zou L, Two Distinct Modes of ATR Activation Orchestrated by Rad17 and Nbs1. *Cell Reports*, 3: 1651-1662; doi: 10.1016/j.celrep.2013.04.018. (2013)

Ogiwara H, Ui A, **Shiotani B**, Zou L, Yasui A, *Kohno T. Curcumin suppresses multiple DNA damage response pathways and has potency as a sensitizer to PARP inhibitor. *Carcinogenesis*. 34: 2486-2497; doi: 10.1093/carcin/bgt240. (2013)

〔学会発表〕(計 32 件)

Bunsyo Shiotani, Development of a direct ATR substrates identification system utilizing ATP analog., Gordon Research Conference, 7月・2016、香

港(中国)

塩谷文章, Dark side of ATR. DNA 損傷ワークショップ 浜名湖ミーティング、4月・2016年、ジ・オーシャン(静岡県・浜松市)

Bunsyo shiotani, Identification of ATR substrates utilizing analog ATP sensitive-ATR. 第75回 日本癌学会学術総会、10月・2016年、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Bunsyo shiotani, Establishment of direct substrates identifying system by analog sensitive-ATR kinase. 第39回 日本分子生物学会年会、12月・2016年、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Bunsyo Shiotani, Sensing and signaling of DNA damage by master checkpoint kinase ATM and ATR, Tenth AACR-JCA Joint conference, 2月・2016年、Hawai・USA

塩谷文章, Revisiting ATR functions in safeguarding genome stability. DNA 損傷ワークショップ 浜名湖ミーティング、4月・2015年、ジ・オーシャン(静岡県・浜松市)

Bunsyo shiotani, Nbs1-mediated ATR activation maintaining G2 Checkpoint at resected DNA double stranded breaks. 第74回 日本癌学会学術総会、10月・2015年、パシフィコ横浜(愛知県・名古屋市)

塩谷文章, ATMとATRが制御するDNA二本鎖切断部位におけるゲノム安定性維持機構. 日本人類遺伝学会第60回大会、10月・2015年、パシフィコ横浜(愛知県・名古屋市)

Bunsyo shiotani, Identification and dissection of ATR substrates. 国立遺伝学研究所 研究集会、12月・2015年、国立遺伝学研究所(静岡県・三島市)

Bunsyo shiotani, ATP アナログを利用した ATR 基質同定法の開発. BMB2015、12月・2015年、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

Bunsyo Shiotani, Two distinct modes of ATR activation orchestrated by Rad17 and Nbs1 at resected DNA double stranded breaks., Gordon Research Conference, 7月・2014、香港(中国)

Bunsyo shiotani, Activation and regulation of ATR at double stranded breaks. 日本放射線学会 57 回大会、10月・2014年、かごしま県民交流センター(鹿児島県・鹿児島市)

Bunsyo shiotani, Biphasic activation of ATR induced by DSBs. 国立遺伝学研究所 研究集会、11月・2014年、国立遺伝学研究所(静岡県・三島市)

塩谷文章, Regulation of ATR

checkpoint pathway at DSB . DNA 損傷
ワークショップ 浜名湖ミーティング、
4月・2013年、ジ・オーシャン（静岡県・浜松市）
塩谷文章、ATR activation regulated by
Nbs1 at DSB. 第65回日本細胞生物学会、
6月・2013年、ウイנקあいち（愛知県・
名古屋市）

〔図書〕(計 2 件)

***Shiotani B** and *Zou L. Signaling of
DNA Replication Stress through the
ATR Checkpoint. In Hanaoka F. and
Sugasawa K. (ed.) *DNA Replication,
Recombination and Repair - Molecular
Mechanisms and Pathology*, Springer,
405-428,
[https://link.springer.com/chapter/1
0.1007/978-4-431-55873-6_16](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-4-431-55873-6_16) (2016)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.nccri.ncc.go.jp/jimu/030/030
/20151209151751.html](http://www.nccri.ncc.go.jp/jimu/030/030/20151209151751.html)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

塩谷 文章 (SHIOTANI, Bunsyo)

国立がん研究センター研究所・遺伝医学研究
分野・主任研究員

研究者番号：10627665