

DNA 損傷に応答して細胞死を選択する制御機構の解明

1. 研究の目的

細胞は DNA 損傷に応答して傷の修復あるいは細胞死を誘導することでゲノムの恒常性を維持しているが、細胞がどちらをどのようにして選択しているかについては未だ明らかになっていない。我々はアルキル化 DNA 損傷が引き起こす細胞死誘導過程において、ミスマッチ修復 (MMR) 複合体がクロマチン制御因子 SMARCAD1 と協働しながら損傷を認識し、ATR/CHK1 キナーゼを介した DNA 損傷応答シグナリングを活性化することを明らかにしてきた。本研究では、損傷領域特異的なクロマチンの動態と ATR/CHK1 シグナル経路の活性化の機能連関を解析することで、DNA 損傷が引き起こす選択的な細胞死誘導の制御機構を明らかにすることを目的とする。「DNA 修復」を選択することの方が一考するとポジティブに捉えることができるが、生存するために「損傷乗り越え DNA 合成」や「非相同末端結合」等の修復系を選択した場合はエラーを伴い、その結果、突然変異や染色体異常を伴った状態で細胞が生き残ることとなる。ヒトのような多細胞生物にとっては、このような突然変異細胞の出現を防ぐために「細胞死」を選択することの方が、ゲノム安定化の観点ではポジティブな細胞応答と捉えることができる。得られる知見は、化学療法剤に対する細胞の感受性を亢進させるための標的となることが期待でき、社会的な意義は大きい。また、ゲノムの恒常性維持の観点からもこの分子機構の解明の学術的意義は大きい。

2. 研究の計画

本研究では、DNA 損傷が引き起こす細胞死誘導を制御するクロマチン動態と DNA 損傷応答シグナリングを分子レベルで明らかにする。細胞は口腔扁平上皮癌細胞株 (SAS, HSC3 等) を用いる。方法としては、(1)クロマチン動態の解析では、近年開発された ATAC (Assay for Transposase-Accessible Chromatin) 法 (Chen *et al.*, Nat. Methods, 2016) を用いて、損傷領域のクロマチン動態の可視化と損傷クロマチンに集積するタンパク質の同定を行う。(2)DNA 損傷応答シグナリングの解析では、ATR/CHK1 キナーゼ経路の活性化を制御する TopBP1 と ETAA1 に着目し、両タンパク質が保有する AAD (ATR activation domain) を介したシグナリング活性化のしくみを明らかにする。

(1) 細胞死を誘導するクロマチン動態の解析

① 損傷領域クロマチン動態の可視化

我々は細胞死誘導の初期過程において、SMARCAD1に依存した損傷領域クロマチンのリモデリングが必要であることを見出している。ATAC法はトランスポゾンTn5を利用した解析手法で、Tn5が弛緩したクロマチン領域特異的に標識オリゴDNAを挿入することで、オープンクロマチン領域を顕微鏡下で可視化できる。化学薬剤処理した細胞において、損傷領域のクロマチンがSMARCAD1依存的に弛緩することをMMR因子との共局在を指標に解析する。

(2) DNA 損傷応答シグナリングの解析

① TopBP1, ETAA1遺伝子ノックダウン細胞の解析

我々はTopBP1あるいはETAA1遺伝子のノックダウン細胞を作成し、いずれの細胞もアルキル化剤とシスプラチンに高い感受性を示すことを見出している。遺伝子ノックダウンのDNA損傷応答シグナリングへの影響はATRとCHK1のリン酸化、また、細胞死誘導への影響はCaspase-9の活性化を指標に解析することで、DNA損傷応答シグナリングと細胞死誘導の関係を明らかにする。さらに、遺伝子ノックダウン細胞におけるDNA損傷領域のクロマチン動態とDNA構造変化(一本鎖DNAの露出や二本鎖DNA切断)を解析し、細胞死誘導の直接的な要因を明らかにする。

3. 研究の成果

(1) 細胞死を誘導するクロマチン動態の解析

① 損傷領域クロマチン動態の可視化

Addgeneより入手したpTXB1-Tn5プラスミドを用いて、大腸菌内で発現誘導したIntein-

tagged Tn5をその親和性を利用してchitinカラムに吸着させ、DTT添加によるタグ切断によりTn5タンパクを単一標品まで精製することが出来た。また、標識オリゴDNAの入手も行ない、顕微鏡観察を始める準備を整えたところである。

(2) DNA 損傷応答シグナリングの解析

① TopBP1, ETAA1遺伝子ノックダウン細胞の解析

2021年度はTopBP1ノックダウン細胞について解析を進め、TopBP1ノックダウン細胞ではシスプラチン投与後にサブG₁細胞の割合とカスパーゼ9の活性化が増大することを明らかにした(図1)。この時にCHK1(S317)のリン酸化は低下し、一本鎖DNA結合タンパクであるRPA2(S8)のリン酸化が亢進していた(図2)。また、ATM/CHK2のリン酸化には明らかな変化は認めなかった。ATR/CHK1経路の抑制が薬剤感受性を亢進することはATR阻害剤を用いた実験においても確認できた。この結果よりTopBP1がDNA損傷応答の活性化に関与し、損傷DNAを保護することでアポトーシスを抑制していることが考察され、この成果を*Oral Sci. Int.*誌に報告した(Obayashi et al., 2021)。現在は、SAS, HSC3の他にも様々な癌細胞株を準備して、各細胞株でのTopBP1の発現レベルとTopBP1ノックダウンによる薬剤感受性の相関を調べている。また、TopBP1が保有する8つのBRCA1 C-Terminal (BRCT)ドメインの中でリン酸化ATRとの結合に重要と考えられているBRCA7/8に着目して、その細胞死誘導における機能解析も進めている。

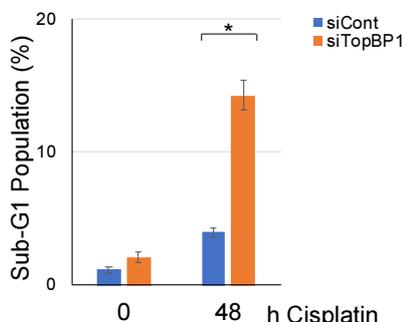


図1. TopBP1ノックダウンSAS細胞のシスプラチン投与によるアポトーシス誘導

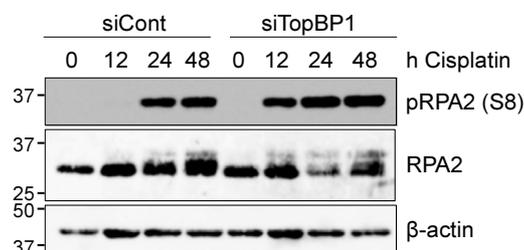


図2. TopBP1ノックダウンSAS細胞のシスプラチン投与後のRPA2のリン酸化

4. 研究の反省・考察

(1) 細胞死を誘導するクロマチン動態の解析

① 損傷領域クロマチン動態の可視化

大腸菌内で発現誘導したIntein-tagged Tn5のchitinカラムへの吸着効率、ならびにDTT添加による溶出効率が期待していたほど高くなく、Tn5タンパクを十分量精製するのに手間取ってしまった。Intein-tagged Tn5のchitinカラムへの吸着時間、ならびに吸着タンパクのDTTによる処理時間を長くする等のプルトコールの修正により、単一標品のTn5タンパクを十分量精製することができた。

(2) DNA 損傷応答シグナリングの解析

① TopBP1, ETAA1遺伝子ノックダウン細胞の解析

今年度はDNA損傷応答で機能する中心的なタンパクキナーゼであるATRの制御因子TopBP1に着目し、TopBP1が化学療法剤の感受性を亢進する標的となりうるかの検討を行なった。その結果、作成したTopBP1ノックダウン細胞はシスプラチンに対する薬剤感受性が亢進し、細胞死誘導の指標であるsub-G₁細胞の割合、ならびにCaspase-9の活性化、PARP1の切断が増加した。この時、DNA損傷応答の活性化の指標となるCHK1(S317)のリン酸化が有意に低下していたが、ATR(T1989)のリン酸化には明らかな変化を認めなかった。この結果は先にLiuらによって報告された論文結果(Liu et al., 2011)とよく合致するものであった。この条件下において、1本鎖DNA結合タンパク質RPA2(S8)のリン酸化が強く亢進しており、TopBP1の抑制は細胞周期チェックポイントの活性化の低下を引き起こし、DNA損傷で停止した複製フォークに一本鎖DNA領域を蓄積させることで細胞死誘導を促進すると考えられた。以上のことより、TopBP1が癌細胞において化学療法に対する感受性の効果を促進させる治療戦略の標的となりうる可能性を見出した。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①Obayashi Y., Fujikane R., Morita S., Uechi Y., Hiraki A., and Hidaka M. Suppression of TopBP1 function increases the efficacy of chemotherapeutic treatments by enhancing the induction of apoptosis. Oral Science International, 18, 209–216, 2021
- ②Shioi S., Shimamoto A., Song Y., Hidaka K., Nakamura M., Take A., Hayashi N., Takiguchi S., Fujikane R., Hidaka M., Oda S., Nakatsu Y. DNA polymerase delta Exo domain stabilizes mononucleotide microsatellites in human cells. DNA Repair, 108, 103216, 2021

(2) 口頭発表

- ①藤兼亮輔、森田祥、上地有香、日高真純、アルキル化DNA損傷応答におけるミスマッチ修復因子PMS1の機能の解析、第44回日本分子生物学会年会、2021年12月2日
- ②織田信弥、塩井誠次郎、瀧口聡一、日高京子、藤兼亮輔、日高真純、中津可道、DNAポリメラーゼ δ Exoドメイン変異によって不安定化される一塩基繰り返しマイクロサテライト、第80回日本癌学会学術総会、2021年9月30日

(3) 出版物

なし