

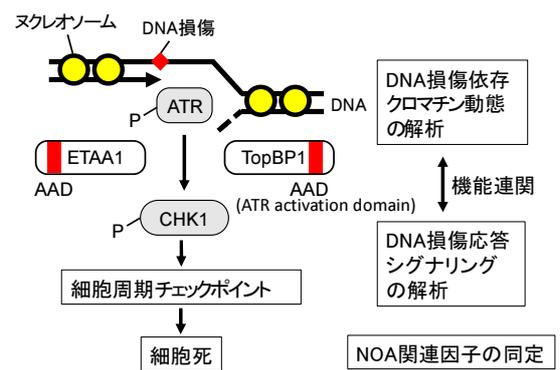
DNA 損傷に応答して細胞死を選択する制御機構の解明

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、その鍵となる 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。同定した因子についてはノックダウン/ノックアウト細胞を樹立し、細胞死誘導制御における機能を検証する。本研究で得られた知見をもとに、癌細胞固有な特徴である non-oncogene addiction (NOA) を標的とした新しい化学療法への展開を図る。



クロマチン動態とDNA損傷応答に依存した細胞死機構の解明

(1) 細胞死を誘導するクロマチン動態の解析

① 損傷クロマチン動態の可視化とそこに集積するタンパク質の同定

損傷クロマチンには細胞死誘導の制御に関わる多くのタンパク質が経時的に集積すると考えられる。ビオチン標識したオリゴDNAをATAC法にて挿入し、DNA損傷領域特異的に集積している関連タンパク質をストレプトアビジンビーズとの親和性を利用して単離する。単離したタンパク質を質量分析し、細胞死関連因子として同定する。

(2) DNA 損傷応答シグナリングの解析

① ATR activation domain (AAD) の機能解析

TopBP1とETAA1はともにAAD(約162アミノ酸配列)を持つが、それらがどのようにATR/CHK1経路の活性化に関与するのかは未だ明らかになっていない。RouxらのBio-ID法 (Roux et al., J. Cell Biol., 2012) を応用して、それぞれの因子のAADと相互作用するタンパク質を同定する。具体的には、ビオチンリガーゼBirAとAAD (TopBP1あるいはETAA1由来) の融合タ

ンパク質を細胞内で発現させることで、BirA融合AADとの相互作用因子はビオチン化され、親和性ビーズを用いて特異的に精製できる。精製タンパク質の質量分析を行い、新規の損傷応答シグナリング因子として同定する。

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損傷クロマチン動態の可視化とそこに集積するタンパク質の同定

精製した Tn5 タンパクと標識オリゴ DNA を混合後に細胞に導入することで、DNA のアルキル化損傷に応答したオープンクロマチン領域と思われるシグナルを顕微鏡下で確認することができた。ただし、その効率が期待したほど高くなかったため、現在、Tn5 の導入効率を上げる条件の検討を行なっている。

(2) DNA 損傷応答シグナリングの解析

①ATR activation domain (AAD)の機能解析

前年度のTopBP1-KD細胞の解析に続けてETAA1-KD細胞の解析を進めたところ、TopBP1/ETAA1-double KD細胞は、それぞれのsingle KD細胞に比べてアルキル化剤に対する感受性が亢進することが明らかとなった。single KD細胞とdouble KD細胞のDNA損傷応答を比較解析したところ、アルキル化剤処理に応答してTopBP1-single KD細胞ではCHK1 (S317)のリン酸化の低下と一本鎖DNA結合タンパクであるRPA2(S8)のリン酸化の亢進が観察された。それに対して、ETAA1-single KD細胞ではCHK1のリン酸化の亢進とRPA2のリン酸化の低下が観察された。TopBP1/ETAA1-double KD細胞では、予備的ではあるがTopBP1-single KD細胞とほぼ同様な結果が得られた。

TopBP1とETAA1が共に有するAADの機能解析においては、それぞれのAADに保存されており、その機能に必須なアミノ酸に変異を導入した変異型AAD (AAD領域のみ) の発現プラスミドを構築した。そのプラスミドを細胞内に導入し変異型AADペプチドを発現させたところ、細胞の化学療法剤に対する感受性への影響を確認することはできなかった。現在は変異型TopBP1 (全長) の発現プラスミドを構築し、影響を及ぼすのに必要な領域の同定をすすめている。

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損傷クロマチン動態の可視化とそこに集積するタンパク質の同定

DNA損傷に応答したオープンクロマチンの形成は確認することはできたが、その効率は損傷クロマチンに集積してくるタンパク質の単離同定のためには未だ不十分であると考えられる。そこで現在、Tn5の導入効率を上げる条件の検討を行っており、至適条件確立後に、ビオチン標識したオリゴDNAとストレプトアビジンビーズとの親和性を利用して集積タンパク質を単離する。単離したタンパク質を質量分析し、細胞死関連因子として同定する。

(2) DNA 損傷応答シグナリングの解析

①ATR activation domain (AAD)の機能解析

TopBP1とETAA1が共に有するAADがどのようにDNA損傷応答の活性化に関与するのかは未だ明らかになっていない。TopBP1のAADにおいて、1071番目のPheと1145番目のTrpがその活性に必須であるが、この2つのアミノ酸はETAA1のAADにおいても保存されている。そこで、この部位にアミノ酸置換を導入した変異型AADを細胞内で発現させ、細胞の化学療法剤に対する感受性への影響を解析した。その結果、変異型AADペプチドのみではその影響を確認することはできなかった。ただし、TopBP1とETAA1はそれぞれホモ二量体を形成して機能しているため (Thada & Cortez, J. Biol. Chem., 2020)、導入した変異タンパク質がドミナントネガティブとして機能するためには、二量体の形成に必要なドメインも必要であると考えられる。今後は二量体形成ドメインを同定し、それと融合したAAD (機能性AAD) を構築し解析することで、AADのDNA損傷応答と細胞死誘導における機能を明らかにする。さらに、この機能性AADをbaitとしたBio-ID法による解析を行い、機能性AADの近傍に位置するタンパク質を新規の損傷応答シグナリング因子として同定する。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ① Takedachi A., Matsuishi E., Mizusaki S., Nagasawa T., Fujikane R., Hidaka M., Iwai S., Kuraoka I. Novel plasmids for the fluorescence-based evaluation of DNA mismatch repair in human cells. *Mutat. Res.*, 2022 Apr 9;824:111779. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2022.111779.
- ② Oka S., Tsuzuki T., Hidaka M., Ohno M., Nakatsu Y., Sekiguchi M. Endogenous ROS production in early differentiation state suppresses endoderm differentiation via transient FOXC1 expression. *Cell Death Discov.* Apr 1;8(1):150. 2022, <https://doi.org/10.1038/s41420-022-00961-2>

(2) 口頭発表

- ① 藤兼亮輔、上地有香、森田祥、得居果乃、日高真純. アルキル化損傷応答におけるミスマッチ修復因子PMS1の機能. 第45回日本分子生物学会年会、2022年11月30日
- ② 森田祥、藤兼亮輔、上地有香、松浦尚志、日高真純. アルキル化損傷応答におけるミスマッチ修復因子FANCD2の役割. 第45回日本分子生物学会年会、2022年11月30日
- ③ 上地有香、藤兼亮輔、森田祥、玉置幸雄、日高真純. アポトーシス誘導におけるミBLM-スマッチ修復タンパク質複合体の機能解析. 第45回日本分子生物学会年会、2022年11月30日
- ④ 竹立新人、白川知樹、松石英莉那、水崎彰治、長澤知樹、藤兼亮輔、日高真純、岩井成憲、倉岡功. 生細胞のミスマッチ修復能をリアルタイムで評価できるプラスミドの構築と評価. 第45回日本分子生物学会年会、2022年11月30日

(3) 出版物

なし