

2023年度（第48回）學術研究振興資金 學術研究報告

学 校 名	福 岡 歯 科 大 学	研究所名等		
研 究 課 題	DNA損傷に応答して細胞死を選択する制御機構の解明		研 究 分 野	医 学
キ ー ワ ー ド	①DNA損傷 ②細胞死 ③ミスマッチ修復(MMR) ④クロマチン動態 ⑤ATR/CHK1 ⑥細胞周期チェックポイント ⑦ゲノム安定化 ⑧口腔扁平上皮癌細胞			

○研究代表者

氏 名	所 属	職 名	役 割 分 担
日 高 真 純	口 腔 歯 学 部	教 授	実験の総括・論文作成

○研究分担者

[illegible]

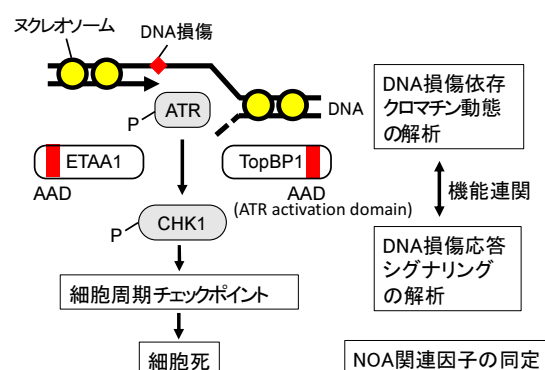
DNA 損傷に応答して細胞死を選択する制御機構の解明

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。また、クロマチン制御因子SMARCAD1との機能的相互作用が報告されたCENP-A (セントロメア領域のヌクレオソームを構成因子するヒストンH3バリエント) のDNA損傷が引き起こす細胞死誘導における新規機能の検討を行う。

(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。また、別の手法として、Flagタグを付加したTopBP1とETAA1を恒常的に発現する細胞を構築し、抗Flag抗体アガロースビーズを用いた免疫沈降法により、相互作用するタンパク質を同定する。

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

細胞死誘導において機能するSMARCD1はセントロメア領域のヌクレオソームの構成因子CENP-Aのクロマチンへの取り込みと維持に必要であることが報告されている (Mitra *et al.*, Nature Com., 2020)。そこで、CENP-Aの細胞死誘導における新規機能の可能性を検討するために、CENP-Aのノックダウン細胞 (図1) とCENP-A過剰発現細胞を構築したところ、正常細胞に比べて前者はアルキル化剤に耐性 (図2) となり、後者は感受性となることがわかった。このことから、SMARCD1とCENP-Aの機能的な相互作用がDNA損傷により引き起こされる細胞死誘導に関与していることを新規に明らかにすることができた。

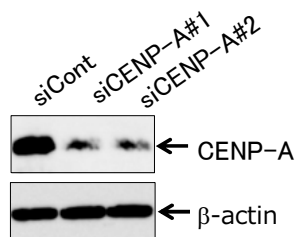


図1. CENP-Aノックダウン細胞の構築

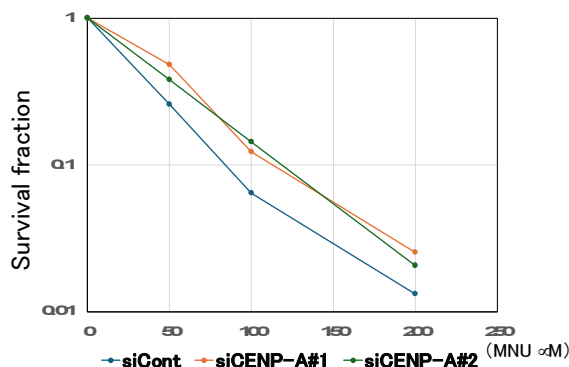


図2. CENP-Aノックダウン細胞のアルキル化剤耐性

(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

ETAA1ノックダウン細胞がアルキル化剤に対して感受性を示すという前年度の解析結果を受けて、今年度はETAA1ノックアウト細胞とETAA1過剰発現細胞を構築した。それぞれの細胞のアルキル化剤に対する感受性を解析したところ、ETAA1ノックアウト細胞はより顕著に感受性を示すのに対し、ETAA1過剰発現細胞は予備的ではあるが僅かに耐性を示すことが明らかとなった。ETAA1発現量の違いによるATR/CHK1シグナル経路の活性化への影響は現在解析中である。

AADの機能解析においては、その機能に必須なアミノ酸に変異を導入した変異型AAD (W107RとF198Aの2種類) を有するFlag-ETAA1発現プラスミドを正常型とともに構築した。現在、ETAA1ノックアウト細胞にこれらの発現プラスミドを導入し、その安定発現細胞を樹立しているところである。これらの細胞を用いて抗Flag抗体アガロースビーズによる免疫沈降を行い、細胞死誘導時にAADと相互作用する因子の同定を進める。

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

ATAC法を用いたDNA損傷領域特異的に集積している関連タンパク質の単離実験に関しては、昨年度から引き続きTn5の導入効率を上げる条件検討を行ったが、その効率を目的達成のために必要なレベルまで押し上げることが出来なかった。そこでこの手法による解析を中断し、セントロメア領域特異的なヒストンバリエントCENP-Aの機能解析に着手した。その結果、DNA損傷が引き起こす細胞死誘導に関わる新たなクロマチン制御因子としてCENP-

Aを見出すことができた。今後は、CENP-AのDNA損傷領域への集積を可視化し、SMARCD1とどのように協働しながら細胞死誘導において機能するかを分子レベルで明らかにしていく予定である。

(2) DNA 損傷応答シグナリングの解析

①ATR activation domain (AAD)の機能解析

本研究において、TopBP1とETAA1がATR/CHK1シグナル経路の活性化を制御することで、DNA損傷が引き起こす細胞死の誘導を調節していることが明らかとなった。また、その制御にはAADが必須であることも明らかとなった。ただし、当初予定していたAADと相互作用する細胞死誘導制御因子の同定までは達成出来なかった。今後は、Flag-ETAA1(正常)、Flag-ETAA1(W107R)、Flag-ETAA1(F198A)発現細胞を用いた解析を継続し、TopBP1とETAA1がともに有するAADの機能上での共通点と相違点を明らかにし、その細胞死誘導における分子機能を明らかにする予定である。

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- ①Morita S., Fujikane R., Uechi Y., Matsuura T., Hidaka M. FANCD2 counteracts O⁶-methylguanine-induced mismatch repair-dependent apoptosis. *Molecular Biology Reports*, in press
- ②Uechi Y., Fujikane R., Morita S., Tamaoki S., Hidaka M. Bloom syndrome DNA helicase mitigates mismatch repair-dependent apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, in press

(2) 口頭発表

- ①井口晃太郎、藤兼亮輔、日高真純. セントロメアタンパク質CENP-Aのアポトーシス誘導における新規機能. 第50回福岡歯科大学学会総会、2023年12月10日
- ②藤兼亮輔、倉岡功、日高真純. 蛍光プラスミドを用いたミスマッチ修復効率の定量的解析. 第52回日本環境変異原ゲノム学会、2023年11月11日
- ③白川知樹、竹立新人、松石英莉那、水崎彰治、長澤知樹、藤兼亮輔、日高真純、石井成憲、倉岡功. 生細胞のDNAミスマッチ修復能を評価する新規レポータープラスミドの構築と評価. 第52回日本環境変異原ゲノム学会、2023年11月11日
- ④Fujikane R., Morita S., Rikitake M., Uechi Y., Hidaka M. Mechanism of mismatch repair-dependent apoptosis and its regulation by DNA damage response and DNA repair systems. 第96回日本生化学会大会、2023年11月1日
- ⑤井口晃太郎、藤兼亮輔、日高真純. アルキル化DNA損傷応答におけるセントロメアタンパク質CENP-Aの役割. 第65回歯科基礎医学会学術大会、2023年9月16日
- ⑥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FANCD2の役割. 第27回DNA複製・組換え・修復ワークショップ、2023年6月6日

(3) 出版物

なし