

ゲノム分子病態研究分野

<研究スタッフ>

教授	山本健一	大学院（修士）	赤池聡
助教	清水弘子		早部紘子
	林直之		望月めぐみ
	小林昌彦		森村容子
技能補佐員	武紀代子	学部4年	塩谷裕司

<研究室としての方向性>

高等動物の DNA 損傷・複製異常ストレス応答の制御に中心的な役割を果たしている ATM/ATR キナーゼファミリーの、発がんメカニズムに関係する、酵母では見られない高等動物特有の活性化の機序を明らかにすると共に、そのがん抑制における役割を細胞レベルで明らかにする。さらに、その成果をがん分子標的薬剤開発への応用を図る。

<一年間の進捗状況>

- 1) ATM 異常による酸化ストレスに対する細胞応答の異常は、ATM 異常による小脳神経細胞死、造血幹細胞の分化異常、早老、あるいは発がんに関連していると考えられているが、その機序は明らかではない。我々は、酸化ストレスやアルキル化剤による ATM の活性化が DNA 塩基の修飾を介さず、その ATM 蛋白に対する直接作用であり、このような DNA 損傷を介さない ATM の活性化は、p53 の活性化を引き起こすが、Chk1 や Chk2 などの活性化は起こさないことを明らかにしたが、さらに、プロスタグランディンの一種の 15-D-PDJ2 以外に、4-oxo-2-nonenal (ONE) などの過酸化脂質や、一酸化窒素 (NO) により生体内に生成し、シグナル伝達のセコンドメッセンジャーとして機能している 8-Nitro-cGMP、等の細胞内代謝ストレスにより、ATM 依存性に p53 の活性化を引き起こすことを明らかにした。
- 2) 我々は、高等動物では DNA 損傷を伴う様々な DNA 複製異常による Chk1 活性化と FancD2 ユビキチン化には、Rad17-RFC 複合体、Rad9-Rad1-Hus1 複合体、ATR-ATRIP 複合体以外に、DNA 修復因子 Msh2/Msh6 および Nbs1 が関与していることを明らかにした。特に、Nbs1 の関与については、パートナーの Mre11 の関与を必要としない独自の機能であり、Nbs1 が ATR と相互作用し、TopBP1 とは独立に ATR を直接活性化することを明らかにした。さらに、ATR タンパク質中の NBS1 相互作用領域を HEAT モチーフ繰り返し配列中の 160 アミノ酸配列に限定した。
- 3) TopBP1 は、Rad9 末端のリン酸化部位に、その N 末の BRCT ドメインを介して結合することにより、DNA 複製停止部位に動員され、ATR/ATRIP 複合体と相互作用して、その活性化を起こす。最近、TopBP1 蛋白がユビキチン系の制御を受けていることが明らかになり、我々は、そのプロセスに Rad9 と、それと相互作用する TPR モチーフを持つコシャペロン TPR2 が関与している、予備的研究結果を得ており、現在、

その作用機序および機能部位の同定を行っている。

- 4) 我々は最近、NBS1 と相互作用する新たな因子として、PCNA と相互作用して複製複合体に局在し、主要な CpG メチル化酵素である DNA(cytosine-5-)-methyltransferase 1 (DNMT1) を同定し、DNMT1 内の NBS1 結合領域を、1398 aa から C 末端領域に限定した。また、NBS1 に関しては FHA ドメインを含む N 末端側の領域が重要であることを示した。細胞レベルでの両因子の相互作用を解析した結果、DNMT1 は NBS1 とヒドロキシ尿素 (HU) による複製阻害条件下で共局在することが観察されたが、NBS1 変異細胞中では局在性の変化が認められなかった。

<将来の展望>

様々ながん遺伝子の活性化によって起こる ATM/ATR キナーゼの活性化は、発がんの最も重要バリアーである細胞老化を誘導する。従って、上に述べたような、我々が行っている ATM/ATR の活性化機構の研究は、発がん初期の細胞内でのプロセスを理解する上で重要である。さらに、その作用機序および機能部位を同定することは、細胞老化をターゲットとした、がんの治療戦略の開発にも重要であると考えられる。また DNMT1 は、がん遺伝子の活性化によって起こる細胞老化の誘導に、ATM/ATR と共に重要である、INK4a/ARF 遺伝子のプロモーターの主要な CpG メチル化酵素であると考えられており、我々が注目している DNA 損傷応答とリンクする新たな DNMT1 の活性制御機構を明らかにすることは、発がんとの関連、さらにはがん治療戦略の、新たな視点からの展開が可能になると期待される。

<研究業績>

原著論文

1. Shimizu, H., Ppova, M., Fleury, F., Kobayashi, M., Hayashi, N., Sakane, I., Venkitaraman, A.R., Kurumisaka, H., Takahashi, M., and Yamamoto, K. c-Abl tyrosine kinase stabilizes Rad51 chromatin association. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 382: 286-291, 2009 (研究室主体)
2. Jacob, M., Todd, L.A., Majumdar, R. S., Li, Y., Yamamoto, K., and Pure, E. Endogenous cAbl regulates receptor endocytosis. *Cell. Signal.*, 21: 1308-1316, 2009 (共同研究)
3. Popova, M., Shimizu, H., Yamamoto, K., Lebecqec, M., K, Takahashi, M., and Fabrice Fleury, F. Detection of c-Abl kinase-promoted phosphorylation of Rad51 by specific antibodies reveals that Tyr54 phosphorylation is dependent on that of Tyr315. *FEBES Letters*, 583: 1867-1872, 2009 (共同研究)

学会発表

- 1) 山本健一、小林昌彦、塩谷文章、若林敬二：NBS1 is directly involved in ATR activation、第68回日本癌学会（横浜）、平成21年10月1-3日
- 2) 林直之、森村容子、小林昌彦、山本健一：チェックポイントを制御するNBS1と相互作用する因子の探索と解析、第82回日本生化学会（神戸）、平成21年10月21-24日
- 3) 小林昌彦、林直之、塩谷文章、若林敬二、山本健一：A role for NBS1 in ATR activation、第2回日本分子生物学会（横浜）、平成21年12月9-12日