

c-AbIファミリーのクロマチンにおけるRad51の機能制御の意義

著者	山本 健一
著者別表示	Yamamoto Ken-ichi
雑誌名	平成19(2007)年度 科学研究費補助金 基盤研究(C) 研究成果報告書
巻	2006-2007
ページ	9p.
発行年	2008-05
URL	http://doi.org/10.24517/00050567



c-Ablファミリーのクロマチンにおける
Rad51の機能制御の意義

研究課題番号：18590286

平成18年度～平成19年度 科学研究費補助金
(基盤研究 (C)) 研究成果報告書

平成20年 5月

研究代表者 山本 健一

金沢大学がく研究所 教授

金沢大学附属図書館



1300-05191-4

<はしがき>

相同組み換え DNA 修復は，放射線などによる DNA 二重鎖切断や，様々な抗ガン剤による DNA 複製阻害の結果として起こる二重鎖切断の修復に必須の役割を果たしている．さらに，細胞分裂の際の正常な DNA の segregation にもかかわり，細胞の増殖に必須である．この反応は癌細胞の増殖にも働き，その損傷 DNA 修復活性は癌細胞の化学治療，放射線治療の耐性にも関わっている．実際，相同組み換え修復において中心的な役割を果たしている Rad51 は，悪性腫瘍でその発現が亢進し，様々な抗ガン剤によりその発現が誘導され，その細胞内の発現量を減少することで腫瘍の発展が抑制され，また化学治療の効果が上がることで動物実験で検証されている．さらに Rad51 活性の過剰は染色体転座を起こし，発ガンの原因，あるいは癌細胞の悪化にもつながる．このように Rad51 は，生体内で重要な役割を果たし，その制御メカニズムを明らかにすることは，発ガンの抑制や抗がん剤の開発に寄与する．Rad51 のいくつかの機能制御プロセスが明らかにされ始めている．特に高等動物では，家族性乳ガンの原因遺伝子として同定された BRCA2 が，Rad51 の活性制御において重要な役割を果たしていると考えられている．さらに，DNA 二重鎖切断に対するチェックポイント応答に中心的な役割を果たしている ATM により活性化され，アポトーシスに重要な役割を果たしている c-Abl チロシンキナーゼ，及びファミリーメンバーで機能が明らかではない Arg(c-Abl related gene)，さらには慢性骨髄性白血病の原因である異常融合タンパク Bcr/Abl により，Rad51 蛋白がチロシンリン酸化される．しかし，生理的条件下での細胞内でのリン酸化の状態やリン酸化の部位については，異なる報告がなされており，その Rad51 活性への影響や相同組み換え活性への影響は確立されていない．また，慢性骨髄性白血病の分子標的治療薬として，目覚ましい成果をあげている Glivec の主要な分子標

的の Bcr/Abl および c-Abl ファミリーは，増殖系のみならず，DNA 修復系，とくに Rad51 の制御に参与している事が明らかになったが，Glivec の DNA 修復系への影響については明らかではない．本研究では，これらの点について，以下のような結果を得た．DNA 二重鎖切断等の DNA 損傷応答に中心的な役割を果たしている ATM の下流で，c-Abl チロシンキナーゼが ATM 依存性に，DNA 相同組み換えタンパク質 RAD51 をリン酸化するが，相同組み換え修復経路における RAD51 の多岐にわたる機能のうちどの部分に関わるかは明らかではない．我々は，c-Abl のクロマチン結合は Glivec で阻害され，Kinase-dead 変異体では起こらないことを明らかにした．また最近新たに同定した RAD51-R167G 変異体(R167G)は，単独発現ではクロマチンに集積しないが，c-Abl との共発現により，RAD51 野生型と同様に，クロマチン分画に集積し，抗 Y-54p あるいは Y-315p 特異抗体を用いた解析により，c-Abl による Rad51 の 54 番，315 番のチロシンのリン酸化がクロマチン分画でのみ起こることを認めた．R167G は，RAD51 がフィラメントを形成した時に，隣接する RAD51 分子との境界領域に存在すると考えられている．やはり，この領域に存在すると予想される RAD51-F86E 変異体（ケンブリッジ大，Venkitaraman 博士から供与された．）についても，c-Abl との共発現でクロマチン集積が回復し，54 番，315 番のチロシンリン酸化を確認した．さらに R167G の 54 番と 315 番のどちらのチロシンがリン酸化によるクロマチン集積に必要なかを調べるために，二重の変異体（RAD51Y54F/R167G と RAD51R167G/Y315F）を作製して，蛍光抗体法で c-Abl 共発現の場合の RAD51 の局在を検討した．その結果，R167G の c-Abl 共発現によるクロマチン集積には，RAD51 の 315 番のチロシンのリン酸化が重要であることが判明した．以上の結果から，c-Abl が自身のキナーゼ活性依存性に DNA 損傷部位に移行し，BRCA2 依存性に DNA 損傷部位に移行した Rad51 のチロシンリン酸化を行い，おそらくは Rad51 の自己集合あるいは DNA 結合を制御することにより，

最終的に Rad51 の DNA 損傷部位でのフィラメント形成を促進すると考えられる。今後、DNA 損傷による c-Abl ファミリーの活性化と、チロシンキナーゼ活性依存性に起こる DNA 損傷部位への集積の機序について、BRCA1 と TopBP1 の役割に重点をおいて検討すると共に、Rad51 の相同組み換え DNA 修復能への、分子標的薬剤 Glivec の影響について検討していく。

研 究 組 織

研究代表者 : 山本 健一 (金沢大学 がん研究所)

交付決定額 (配分額)

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
平成18年度	2,200,000	0	2,200,000
平成19年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総 額	3,500,000	390,000	3,890,000

研究発表

(1) 雑誌論文

- ① Shibata, T., Iio, K., Kawai, Y., Shibata, N., Kawaguchi, M., Toi, S., Kobayashi, M., Kobayashi, M., Yamamoto, K., and Uchida, K. Identification of a lipid peroxidation product as a potential trigger of the p53 pathway. *J. Biol. Chem.*, 281, 1196-1204, 2006
- ② Shiotani, B., Kobayashi, M., Watanabe, M., Yamamoto, K., Sugimura, T., and Wakabayashi, K. Involvement of the ATR- and ATM-dependent checkpoint responses in cell cycle arrest evoked by pierisin-1. *Mol. Cancer Res.*, 4, 125-133, 2006
- ③ Kobayashi, M., Ono, H., Mihara, K., Tauchi, H., Komatsu, K., Shimizu, H., Uchida, K., and Yamamoto, K. ATM activation by a sulfhydryl-reactive inflammatory cyclopentenone prostaglandin. *Genes to Cells*, 11, 779-789, 2006
- ④ Iwabuchi, K., Hashimoto, M., Matsui, T., Kurihara, T., Shimizu, H., Adachi, N., Yamamoto, K., Tauchi, H., Koyama, H., and Date, T. 53BP1 contributes to survival of cells irradiated with X-ray during G1 without Ku70 or Artemis. *Genes to Cells*, 11, 935-948, 2006
- ⑤ Yamamoto, K., Kobayashi, M., and Shimizu, H. ATM, a paradigm for a stress-responsive signal transducer in higher vertebrate cells. *Subcell Biochem.*, 40, 327-339, 2006.
- ⑥ Hayashi, N., Murakami, S., Tsurusaki, S., Nagaura, Z., Oki, M., Nishitani, H., Kobayashi, M., Shimizu, H.,

- Yamamoto, K., and Nishimoto, T. temperature-sensitive defects of the GSP1 gene, yeast Ran homologue, activated the Tel1-dependent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 353, 330-336, 2007.
- ⑦ Zhao, G.Y., Sonoda, E., Barber, L.J., Oka, H., Murakawa, Y., Yamada, K., Ikura, T., Wang, X., Kobayashi, M., Yamamoto, K., Boulton, S.J., and Takeda, S. A critical role for the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in initiating homologous recombination. *Mol. Cell*, 25, 663-675, 2007
- ⑧ Delacroix, S., Wagner, J.M., Kobayashi, M., Yamamoto, K., and Karnitz, L.M. The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) complex activates checkpoint signaling via TopBP1. *Genes and Development*, 21, 1472-1477, 2007
- ⑨ Hayashi, N., Kobayashi, M., Shimizu, H., Yamamoto, K., Murakami, S., and Nishimoto, T. Mutation in Ran system affected telomere silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 363, 788-794, 2007
- ⑩ Wakasugi, M., Matsuura, K., Nagasawa, A., Tao Fu, D., Shimizu, H., Yamamoto, K., Takeda, S., and Matsunaga, T. DDB1 gene disruption causes a severe growth defect and apoptosis in chicken DT40 cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 364, 771-777, 2007
- ⑪ Ishikawa, K., Ishii, H., Murakumo, Y., Mimori, K., Kobayashi, M., Yamamoto, K., Mori, M., Nishino, H., Furukawa, Y., and Ichimura, K. Rad9 modulates the p21^{waf1} pathway by direct association with p53. *BMC Mol. Biol.*, 8, 37-47, 2007
- ⑫ Nomme, J., Takizawa, Y., Martinez, S., Renodon-Cornière, A., Fabrice Fleury, F., Weigel, P., Ken-ichi

Yamamoto, K., Hitoshi Kurumizaka, H., and Takahashi, M. Inhibition of filament formation of human Rad51 protein by a small peptide derived from the BRC motif of the BRCA2 protein. *Genes to Cells*, in press, 2008 .

- ⑬ Oka, H., Sakai, W., Eiichiro Sonoda, E., Nakamura, J., Asagoshi, K., Wilson, S.H., Heierhorst, J., Masahiko Kobayashi, M., Kenichi Yamamoto, K., Takeda, S., and Taniguchi, N. DNA damage response protein ASCIZ links base excision repair with immunoglobulin gene conversion. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, in press, 2008

(2) 学 会 発 表

- ① 清水弘子, 山本健一, 「Rad51 フォーカス形成におけるチロシン磷酸化の役割」, 第65回日本癌学会, 平成18年9月28-30日, 横浜
- ② 小林昌彦, 山本健一, 「酸化ストレスに対する細胞応答における高等動物 ATM の役割」, 第65回日本癌学会, 平成18年9月28-30日, 横浜
- ③ 山本健一, 小林昌彦, 塩谷文章, 若林敬二, 「DNA 損傷シグナリングにおける DNA 修復因子の機能解析」, 第65回日本癌学会, 平成18年9月28-30日, 横浜
- ④ Hayashi N, Nishimoto T, Murakami S. Ran system regulates silencing at subtelomere in *Saccharomyces cerevisiae*. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 2006, Kyoto
- ⑤ 清水弘子, 山本健一, 「A role for Tyr-315 in Rad51

- functions」, 第 66 回日本癌学会, 平成 19 年 10 月 3 - 5 日, 横浜
- ⑥ 小林昌彦, 山本健一, 「Activation mechanisms for ATM checkpoint kinase by oxidative stress」, 第 66 回日本癌学会, 平成 19 年 10 月 3 - 5 日, 横浜
- ⑦ 山本健一, 小林昌彦, 塩谷文章, 若林敬二, 「A critical role for NBS1 in DNA replication checkpoint activation」, 第 66 回日本癌学会, 平成 19 年 10 月 3 - 5 日, 横浜
- ⑧ 小林昌彦, 山本健一, 「SH 基反応性プロスタグランジンによる ATM の活性化」, 日本分子生物学会・日本生化学会合同年会ワークショップ, 平成 19 年 12 月 11 - 15 日, 横浜
- ⑨ 林直之, 西本毅治, 村上清史, 山本健一, 「テロメアサイレンシングにおける出芽酵母 Ran 系遺伝子群の機能」, 日本分子生物学会・日本生化学会合同年会, 平成 19 年 12 月 11 - 15 日, 横浜
- ⑩ Kobayashi, M., Yamamoto, K. Activation mechanisms for ATM kinase by oxidative stress. International AT Workshop 2008, Otu