

がん分子標的探索プログラム ゲノム分子病態研究分野

1. 研究スタッフ

常勤

教授	山 本 健 一	1987年12月～現在
助教	清 水 弘 子	1979年10月～2011年3月
	林 直 之	1997年4月～現在
	小 林 昌 彦	2000年1月～現在

非常勤

研究支援推進員 武 紀 代 子 1984年9月～現在

2. 研究概要

DNA二重鎖切斷に対する応答に中心的な役割を果たしているATMキナーゼが、酸化ストレス等に対する応答にも重要であり、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、あるいは発がんと関連している。我々は、酸化ストレスによるATM活性化が、DNA損傷を介さない、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ことを明らかにした。我々はまたATMによって活性化されたc-Ab1チロシンキナーゼが、相同組み替え修復に必須のRad51の315番目のチロシン残基を磷酸化することにより、そのクロマチンへの集積に重要な役割を果たしていることを明らかにした。一方、DNA複製異常を伴う様々なDNA損傷によるATRキナーゼの活性化には、Rad17-RFC複合体、Rad9-Rad1-Hus1複合体、ATR-ATRIP複合体以外に、DNA修復因子Nbs1が一種のMediatorとして直接関与し、Nbs1がATRと直接相互作用することによりATR活性化を促進することを明らかにした。NBS1はまた、主要なCpGメチル化酵素であるDNA(cytosine-5)-methyltransferase 1(DNMT1)と相互作用し、epigeneticな制御にも関与していることを明らかにした。以上我々は、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が、酵母では見られない、高等動物に特異な活性化の機序を示すことを明らかにした。

3. 主な研究成果

当研究分野では、DNA損傷・複製異常を検知し、そのシグナルを伝えることによって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と考えられているATM/ATRファミリーの高等動物における活性化機構と役割・機能について、以下の4つの研究を進めている。

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、あるいは発がんと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、ATM が DNA 二重鎖切断以外に、プロスタグランдин、脂質、核酸由来の代謝産物により活性化され、その ATM 活性化が DNA 塩基の修飾を介さない、ATM 蛋白に対する直接作用であることを見出した。さらに、このような DNA 損傷を介さない ATM の活性化は、Chk1 や Chk2 などの活性化は起こさないが、p53 の活性化や、代謝ストレスセンサーである AMPK のリン酸化と、mTOR 活性化の指標である S6K リン酸化の抑制も引き起こすことを明らかにした。

- 2) ATM の相同組み替え DNA 修復機能に、c-Abl ファミリーによる Rad51 のチロシン磷酸化が関与している。我々は最近、Rad51 の機能に必須の役割を果たしている BRCA2 との結合の後起こる、X 線照射後のフォーカス形成として認められる安定なポリマー形成とクロマチンへの集合に、c-Abl ファミリーによる Rad51 の 315 番目のチロシン残基の磷酸化が重要な役割を果たしていることを明らかにした。
- 3) 我々は、DNA 2 重鎖切断のセンサー因子 NBS1 が、DNA 複製損傷チェックポイント因子 ATR の下流の Chk1 のリン酸化や FancD2 のユビキチン化に必要であるを見出した。さらに、NBS1 の BRCT と FHA ドメインを含む N 末端と相互作用する ATR の部位を同定し、この ATR 部位の過剰発現により、NBS1 と ATR の結合を阻害した結果、Chk1 のリン酸化が抑制されることを示した。また NBS1 の N 端が *in vitro* で ATR を直接活性化することや、PCNA と融合した NBS1 の N 端の Rad17 ノックアウト細胞における強制発現により Chk1 のリン酸化が起こることなど、NBS1 が TOPBP1 とは独立して ATR を活性化できることを明らかにした。
(投稿中)。
- 4) NBS1 の相互作用因子として主要な CpG メチル化酵素である DNA(cytosine-5-)methyltransferase 1(DNMT1)を分離した。NBS1 は、DNMT1 の活性領域中の Target Recognition Domain で結合しており、NBS1 では N 末端にある FHA Domain が結合領域であった。DNMT1 は p53 に依存して Apoptosis 阻害因子 *survivin* の発現を DNA 複製異常の条件下で抑制する。我々はこの機能が NBS1 に依存していることを示した。

4. 今後の研究目標

様々な代謝ストレスによる ATM の活性化に関するシスティン残基の同定と、その生理的意義、特に代謝ストレス応答異常とがん化における役割との関連について細胞レベルで検討すると共に、最近その抗がん作用が注目されている糖尿病治療薬のメトフォルミンによる ATM 活性化とその活性化機序について検討する。また、NBS1 については、ATR 活性化における役割を生化学的に明らかにすると共に、NBS1 の複製停止部位への集積の機序を明らかにする。さらに、NBS1-DNMT1 相互作用については、今後、NBS1 による DNMT1 のメチル化活性制御の詳細な解析とさらに NBS1 と相互作用する他の因子の分析と機能解析を行うと共に、その生理的意義、特に、複製停止と DNA メチル化制御との関連、さらには INK4a/ARF 遺伝子のメチル化との関連について解析する。

5. 共同利用・共同研究拠点としての役割を果たすことに関連しての活動について
相同組み換え修復に必須の役割を果たしている Rad51 の機能に、c-Abl ファミリーによる Rad51 のチロシンリン酸化が重要な役割を果たしていることを明らかにした。この結果を踏まえ、慢性骨髓性白血病患者の治療に使われている分子標的薬イマチニブの、細胞の相同組み換え DNA 修復能に対する影響、さらにその臨床研究への応用として既存の抗がん剤と併用のについての、共同研究を推進する。

6. 研究業績

原著論文

1. Shigechi, T., Tomida, J., Sato, K., Kobayashi, M., Eykelenboom, J., Pessina, F., Zhang, Y., Uchida, E., Lowndes, N. F., Yamamoto, K., Kurumizaka, H., Maehara, Y., & Takata, M. ATR-ATRIP kinase complex is responsible for triggering the FA pathway activation. *Cancer Res.*, 72: 1149-56, 2012
2. Yoshimura, A., Akita, M., Hosono, Y., Abe, T., Kobayashi, M., Yamamoto, K., Tada, S., Seki, M., and Takemi Enomoto, T. Functional relationship between Claspin and Rad17. *BBRC*, 414: 298-303, 2011
3. Fujinaka, Y., Matsuoka, K., Iimori, M., Tuul, M., Yoshinaga, K., Saeki, H., Gillespie, D.A., Yamamoto, K., Masaru Morita, M., Kakeji, Y., Hiroyuki Kitao, H., and Yoshihiko Maehara, Y. Rad9/Rad17-dependent and -independent activation of Chk1 kinase protects cells from 5-fluorouracil by suppressing cytotoxic DNA double-strand breaks. *DNA Repair*, 11: 247-58, 2011
4. Jurado, S., Smyth, I., van Denderen, B., Tenis1, N., Hammet, A., Hewitt, K., Ng, J., McNees, C.J., Kozlov, S.V., Oka, H., Kobayashi, M., Conlan, L.A., Cole, T.J., Yamamoto, K., Taniguchi, Y., Takeda, S., Lavin, M.F., and Heierhorst, J. Dual functions of murine ATM-substrate Chk2-interacting Zn²⁺-finger protein (ASCIZ/ATMIN/ZNF822) in the DNA base damage response and pulmonary organogenesis. *PLoS Genet.*, 6(10): e1001170, 2010
5. Popova, M., Shimizu, H., Yamamoto, K., Lebechec, 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
6. 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
7. Shimizu, H., Popova, 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
8. 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*, 13, 471-481, 2008
9. 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.*, 371, 225-229, 2008
 10. Saberi, A., Nakahara, M., Sale, J.E., Kikiti, K., Arakawa, H., Buerstedde, J-M., Yamamoto, K., Takeda, S., and Sonoda, E. 9-1-1 required for Ig gene conversion. *Mol. Cell. Biol.*, 28, 6113-6122, 2008
 11. Nishino, K., Inoue, E., Takada, S., Abe, T., Akita, M., Yoshimura, A., Tada, S., Kobayashi, M., Yamamoto, K., Seki, M., and Enomoto, T. A novel role for Rad17 in homologous recombination. *Genes Genet. Syst.*, 83, 427-431, 2008
 12. Sekiguchi, T., Hayashi, N., Wang, Y., and Kobayashi H. Genetic evidence that Ras-like GTPases, Gtr1p and Gtr2p, are involved in epigenetic control of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 368:748-754, 2008

著書・総説など

1. 山本健一「がんのゲノム研究と分子標的治療」、日本臨床増刊号「分子標的薬」、2012年

主な学会発表など

2012年度

1. 小林昌彦, 林直之, 山本健一「DNA複製異常時のATR活性化におけるNBS1の直接的役割」第71回日本癌学会学術総会, 北海道札幌市, 2012年9月19-21日, ロイトン札幌・ホテルさっぽろ芸文館・札幌市教育文化会館
2. 林直之、小林昌彦、山本健一「エピジェネティック制御におけるNBS1とDNAメチル化酵素DNMT1の機能」第71回日本癌学会学術総会, 北海道札幌市, 2012年9月19-21日, ロイトン札幌・ホテルさっぽろ芸文館・札幌市教育文化会館

2011年度

1. Masahiko Kobayashi, Naoyuki Hayashi, Ken-ichi Yamamoto 「A role for NBS1 in ATR activation」日本分子生物学会, 第11回春季シンポジウム, 金沢国際がん生物学シンポジウム, 石川県金沢市, 2011年5月25-26日
2. Naoyuki Hayashi, Masahiko Kobayashi, Yoko Morimura, Ken-ichi Yamamoto 「The checkpoint regulatory protein, NBS1 interacts with DNA methyltransferase 1, DNMT1」(ポスター) 日本分子生物学会第11回春季シンポジウム、金沢国際がん生物学シンポ

ジウム 2011、石川県金沢市, 2011年5月25-26日

3. 塩谷裕司, 小林昌彦, 松郷誠一, 山本健一「親電子性代謝産物による ATM 活性化経路の解析」日本分子生物学会, 第11回春季シンポジウム, 金沢国際がん生物学シンポジウム, 石川県金沢市, 2011年5月25-26日
4. 林直之, 小林昌彦, 山本健一「チェックポイント制御因子 NBS1 と DNA メチル化酵素 DNMT1 の相互作用の解析」第70回日本癌学会学術総会, 愛知県名古屋市, 2011年10月3-5日, 名古屋国際会議場
5. 小林昌彦, 林直之, 山本健一「DNA 複製チェックポイントにおける NBS1 の役割」第70回日本癌学会学術総会, 愛知県名古屋市, 2011年10月3-5日, 名古屋国際会議場
6. Tomoko Shigechi, Junya Tomida, Koichi Sato, Masahiko Kobayashi, John Eykelenboom, Pessina Fabio, Zhang Yanbin, Emi Uchida, Masamichi Ishiai, Noel Lowndes, Ken-ichi Yamamoto, Hitoshi Kurumizaka, Yoshihiko Mehara, Minoru Takata 「ATR-ATRIP kinase complex is responsible for triggering activation of the FA pathway」第34回日本分子生物学会年会, 神奈川県横浜市, 2011年12月13-16日, パシフィコ横浜

2010年度

1. Masahiko Kobayashi, Naoyuki Hayashi, Ken-ichi Yamamoto 「A role for NBS1 in ATR activation」 The Joint Symposium of the 5th International Symposium of Institute Network and The International Symposium Commemorating Inauguration of Kanazawa University Cancer Research Institute, Molecular and Cellular Targets for Cancer, Infectious Diseases and Regeneration, 2010年6月24-25日, KKR Hotel Kanazawa
2. 小林昌彦, 林直之, 山本健一「SH 基反応性代謝産物による ATM の活性化」第69回日本癌学会学術総会, 大阪府大阪市, 2010年9月22-24日, 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル
3. 林直之, 小林昌彦, 山本健一「DNA 複製チェックポイントにおける制御因子 NBS1 と DNA メチル化酵素 DNMT1 の相互作用」第69回日本癌学会学術総会, 大阪府大阪市, 2010年9月22-24日, 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル
4. Naoyuki Hayashi, Masahiko Kobayashi, Takeshi Sekiguchi, Ken-ichi Yamamoto 「Nuclear GTPase Ran system is involved in the telomere silencing regulation in *Saccharomyces cerevisiae*」 The 3R (Replication, recombination and repair) meeting of 2010, The 7th 3R (replication, recombination and repair) Symposium of 2010, 2010-3R Symposium, 富山県富山市, 2010年10月26-30日, Toyama Conference Center
5. Junya Tomida, Akiko Itaya, Emi Uchida, Tomoko Shigechi, Masahiko Kobayashi, Ken-ichi Yamamoto, Masaë Ikura, Tsuyoshi Ikura, Agata Smogorzewska, Masamichi Ishiai, Minoru Takata 「FANCI phosphorylation by ATR kinase proceeds in a Rad17/TopBP1-independent

manner」第33回日本分子生物学会年会，兵庫県神戸市，2010年12月7-10日，
神戸ポートアイランド

2009年度

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回日本癌学会学術総会，神奈川県横浜市，2009年10月1-3日，パシフィコ横浜
2. 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32回日本分子生物学会年会，神奈川県横浜市，2009年12月9-12日，パシフィコ横浜
3. 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 兵庫県神戸市，2009年10月21日
- 24年 神戸ポートアイランド

2008年度

1. 山本健一，小林昌彦，塩谷文章，若林敬二「DNA複製チェックポイントにおける NBS1 の役割」第67回日本癌学会学術総会，愛知県名古屋市，2008年10月28-30日
2. 小林昌彦，塩谷文章，高田穣，若林敬二，山本健一「A critical role for NBS1 in DNA replication checkpoint activation」第31回日本分子生物学会年会，第81回日本生化学会大会 合同大会，兵庫県神戸市，2008年12月9-12日神戸ポートアイランド
3. 富田純也，内田亜希子，北尾洋之，木下英司，内田恵美，小林昌彦，山本健一，小池透，石合正道，高田穣「ファンコニ貧血経路の制御と FANCI タンパク質のリン酸化メカニズム」第31回日本分子生物学会年会，第81回日本生化学会大会 合同大会，兵庫県神戸市，2008年12月9-12日 神戸ポートアイランド
4. 林直之，関口猛，山本健一「テロメアサイレンシングに対する出芽酵母の Ran 系遺伝子突然変異の影響」第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会兵庫県神戸市，
2008年12月9-12日 神戸ポートアイランド

7. 外部資金受け入れ状況

2011年度

小林昌彦：科学研究費補助金 基盤研究（若手研究B）「酸化ストレスによるATMチェックポイントキナーゼの活性化機構と生理学的意義」2200千円

2010年度

小林昌彦：科学研究費補助金 基盤研究（若手研究B）「酸化ストレスによるATMチェックポイントキナーゼの活性化機構と生理学的意義」900千円

2009年度

山本健一 : AstraZeneca Research Grant 「DNA Repair Mechanisms as Targets for inhibitors of c-Abl tyrosine kinase family」 2000千円

8. 特記事項

日本学術振興会・特別研究員等審査員（平成15年4月～現在）

日本学術振興会・産学協力研究委員会学界委員（平成12年1月～現在）