

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月18日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710052

研究課題名（和文）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

研究課題名（英文）Activation mechanism and physiological role of the ATM checkpoint kinase in response to oxidative stress

研究代表者

小林 昌彦（KOBAYASHI MASAHIKO）

金沢大学・がん進展制御研究所・助教

研究者番号：70285633

研究成果の概要（和文）：SH 基反応性の酸化ストレス物質 15d-PGJ<sub>2</sub>, ONE, 8-nitro-cGMP は、DNA 損傷応答を引き起こすことなく、ATM 依存的な p53 のリン酸化と蓄積、アポトーシスを誘導する。過酸化水素の場合と異なり、15d-PGJ<sub>2</sub> による ATM の活性化では ATM 間でのジスルフィド結合の形成を必要としない。15d-PGJ<sub>2</sub> は ATM に依存した代謝系の制御機構に影響を及ぼす。以上のことを本研究では明らかにし、ATM の DNA 損傷応答とは異なる酸化ストレス応答機構とそれが代謝系の制御に関与するという生理学的意義を示した。

研究成果の概要（英文）：The sulfhydryl-reactive oxidative stress agents 15d-PGJ<sub>2</sub>, ONE and 8-nitro-cGMP induce phosphorylation and accumulation of p53 and apoptosis but DNA damage response. The ATM activation by 15d-PGJ<sub>2</sub> does not require a disulfide-cross-linked dimer formation of ATM, unlike the case by hydrogen peroxide. 15d-PGJ<sub>2</sub> affects the ATM-dependent metabolic regulation. These results obtained in this study characterize the mechanism of the ATM-dependent oxidative stress response that is different from DNA damage response and indicate involvement of the oxidative stress response in regulation of the metabolic system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：細胞分子生物学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：応答, ATM

## 1. 研究開始当初の背景

毛細血管拡張性運動失調症 (ataxia telangiectasia, AT) は、早老症状、小脳変性、免疫不全、リンパ系腫瘍の高発などを主症状とする、ATM が原因遺伝子の遺伝性疾患である。ATM は DNA 損傷チェックポイント因

子として細胞周期やアポトーシスを制御している。ATM は DNA 二重鎖切断等の DNA 構造のゆがみのシグナルを受け、不活性型二量体から単量体へと分離し、活性化する。この DNA 二重鎖切断のシグナルが ATM に伝達されるためには、ナイミーヘン症候群の原因因子であ

る NBS1 を含む MRE11-RAD50-NBS1 複合体が必須である。AT には、早老症状や神経細胞のアポトーシス、毛細血管拡張症など、DNA 二重鎖切断だけが原因とは考えにくい特徴も見られる。これらの原因として注目を浴びているのが酸化ストレスであり、AT 細胞では酸化ストレスに対する防御機構の一部が機能せず、細胞傷害や細胞死が起こると考えられている。実際に、AT 細胞では多くのレドックス状態異常が見られ、さらに、ATM の酸化ストレス制御機能は、造血幹細胞の自己増殖においても重要であることが報告されている。また、酸化ストレスは細胞老化とも密接に関係している。近年、細胞老化は腫瘍などの退縮に有用であると注目されると同時に、iPS 細胞産生の効率を下げる要因の一つが細胞老化である可能性も報告されている。細胞老化では p53 の活性化が見られるため、ATM と酸化ストレスを結びつける機構を明らかにすることは、個体の老化機構や神経疾患の分野のみならず、再生医療や細胞老化を利用したがん抑制の面からも大変重要な課題である。しかし、ATM が酸化ストレスを感知する機構はわかっていない。一般的にこの機構として考えられているのは、活性酸素種が DNA を損傷した時に、その損傷部位の修復や複製を介して DNA 二重鎖切断が生じ、それによって ATM が活性化するというものである。しかし、ATM が細胞質にも局在していることなどから、当研究室では、ATM 依存的な酸化ストレス応答には DNA 二重鎖切断を必要としない経路があると考え、DNA 二重鎖切断を介さない ATM の活性化機構を解析してきた。その過程で、未刺激の細胞から分離した ATM 免疫沈降体をインビトロでアルキル化剤 N-methyl-N'-nitronitrosoguanidine (MNNG) や酸化ストレス剤 15-deoxy- $\Delta$ 12,14-prostaglandin  $J_2$  (15d-PG $J_2$ ) で刺激することによって、ATM が活性化することを見出した。クロマチン DNA が存在していない ATM 免疫沈降体を刺激することによって ATM が活性化することは、当然、その機構には DNA は関与せず、単に ATM 免疫沈降体に含まれる因子の損傷、修飾によって ATM の活性化が起こっていると推測される。また、15d-PG $J_2$  はタンパク質の特定システインの SH 基に共有結合することが知られているが、15d-PG $J_2$  は ATM とも共有結合することを明らかにした。MNNG もタンパク質の SH 基を修飾することが知られているので、

ATM に存在する SH 基のどれかが酸化ストレスセンサーとして機能し、ATM がその SH 基の修飾を感知して活性化している可能性は非常に高い。

## 2. 研究の目的

細胞には酸化ストレスを感知し、酸化還元状態のバランスを保つための仕組みが存在する。その中の一つとして毛細血管拡張性運動失調症の原因因子 ATM の関与が考えられている。実際に、AT や AT 細胞では様々な酸化ストレス応答異常が観察されている。しかし、酸化ストレスと ATM を結びつける機構はわかっていない。当研究室ではこれまで、酸化ストレスの一つであり、タンパク質の SH 基の修飾を引き起こす物質 15d-PG $J_2$  が ATM に結合し、ATM を活性化し、p53 のリン酸化と蓄積を誘導することを明らかにした。このことから、ATM は SH 基を修飾するような酸化ストレスを認識して、酸化ストレスの防御を促進させる働きがあるのではないかと考えている。その中で本研究では、ATM の酸化ストレスセンサーとしての機能とこれまで良く研究されてきた DNA 二重鎖切断の修復、チェックポイントに関わる機能を解析し、その機構の違いを明らかにすること、また、ATM の酸化ストレスセンサーとして働く SH 基を同定し、そのアミノ酸を変異させた ATM を作製して、ATM の酸化ストレスセンサーとしての機能を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

これまでの研究で、特定のタンパク質の SH 基に共有結合する 15d-PG $J_2$  が ATM にも結合することを見出した。この結合部位は ATM の酸化ストレスセンサー機能に重要であると考えられるため、同定を試みた。350 kDa の巨大タンパク質である ATM の cDNA の全長を 8 断片化し、GST タグ発現ベクターにつなぎ、それぞれを大腸菌で発現させ、GST タグを利用して精製した。精製 ATM 断片をビオチン化 15d-PG $J_2$  と反応させ、ウエスタンブロッティング法で ATM と 15d-PG $J_2$  の結合を解析した。その結果、GST のみのコントロール断片との結合はみられなかったが、ATM の 8 断片全てにおいて 15d-PG $J_2$  との結合が確認できた。

ATM の DNA 損傷チェックポイントにおける上流因子のノックアウト細胞を用いて、DNA 損傷チェックポイントと酸化ストレスセン

サー機構との関連性を、DNA 損傷処理、15d-PGJ<sub>2</sub> 刺激による細胞応答を基に解析した。ATM の DNA 損傷チェックポイントにおける必須上流因子である Nbs1 のノックアウト DT40 細胞では、DNA 二重鎖切断による ATM の活性化は起こらないが、15d-PGJ<sub>2</sub> による ATM の活性化は野生型と同様に起こり、DNA 複製阻害処理では DNA 複製障害チェックポイント因子である ATR の活性化が起こらないことがわかった。Nbs1 は ATM 経路のみならず、ATR 経路にも必要であり、幅広い DNA 損傷応答に関与していることを明らかにした。

15d-PGJ<sub>2</sub>、および、他の類似 SH 基反応性代謝産物である 4-oxo-2-nonenal (ONE) や 8-nitro-cGMP 刺激に対する細胞応答をウエスタンブロットング法や FACS を用いて解析した。その結果、15d-PGJ<sub>2</sub> や ONE、8-nitro-cGMP は Chk2、H2AX のリン酸化等の DNA 損傷応答は引き起こさず、p53 のリン酸化と蓄積、アポトーシスを誘導することを明らかにした。また、15d-PGJ<sub>2</sub> においては、低濃度で長時間刺激することによって細胞老化を誘導することを SA-β-galactosidase 染色の解析によって明らかにした。

本研究の途中で、ATM が DNA 損傷非依存的に酸化ストレス物質である過酸化水素によって活性化し、その活性化には二つの ATM がアミノ酸残基 2991 番目のシステイン残基でジスルフィド結合することが必要であると報告された。この過酸化水素による ATM の活性化機構には、本研究で使用している酸化ストレス物質 15d-PGJ<sub>2</sub> による ATM の活性化にも該当するような部分があるため、過酸化水素刺激と比較して、15d-PGJ<sub>2</sub> 刺激による ATM のジスルフィド結合の形成を調べた。その結果、過酸化水素では ATM のジスルフィド結合の形成が確認できたが、15d-PGJ<sub>2</sub> ではジスルフィド結合の形成はみられなかった。さらに、ATM の 2991 番目のシステイン残基が酸化ストレスによる ATM の活性化に重要であるという報告を基に、ATM の cDNA に PCR 法を用いた部位特異的な変異導入を行い、ATM の過酸化水素反応性システイン残基 2991 をアラニンに変異させた変異型 ATM を作製し、その発現ベクターを ATM ノックアウト DT40 細胞に安定的に組み込んだ細胞を作製した。

また、ATM は糖尿病などで異常となる代謝系の制御機構にも関係していることが報告されたため、15d-PGJ<sub>2</sub> や糖尿病治療薬の一つ

であるメトホルミン処理による ATM を介した代謝系への影響を解析した。その結果、15d-PGJ<sub>2</sub>、過酸化水素、メトホルミン処理のいずれにおいても、代謝制御機構の一つである S6K の脱リン酸化反応が ATM 依存的に起こることを見出した。

#### 4. 研究成果

8 断片化した ATM を用いて 15d-PGJ<sub>2</sub> との結合実験を行い、8 断片全てが 15d-PGJ<sub>2</sub> と結合することを明らかにした。ATM には 89 個のシステイン残基があり、断片化したことによる影響も考えられるが、ATM の全長に渡って 15d-PGJ<sub>2</sub> との結合部位が分布していることがわかった。結合部位全てが酸化ストレスセンサー機能と関連しているとは限らないが、このように結合部位が多数存在することは、酸化ストレス物質の ATM への結合の誘引、センサー感度の向上に作用している可能性が考えられる。

これまでも酸化ストレスにより ATM が活性化するという報告は多数存在するが、ほとんどが、酸化ストレスにより DNA が損傷され、それによって ATM が活性化すると結論付けるものである。本研究で 15d-PGJ<sub>2</sub>、および、それに類似した SH 基反応性代謝産物である ONE や 8-nitro-cGMP を用いて細胞応答を解析し明らかにした、SH 基反応性代謝産物は Chk2 や H2AX のリン酸化等の DNA 損傷応答を起こさず、p53 のリン酸化や蓄積、アポトーシス等の ATM 経路を活性化するという結果は、DNA 二重鎖切断による ATM の活性化には Nbs1 が必須であるが、15d-PGJ<sub>2</sub> による ATM の活性化には Nbs1 は必要ないという結果とあわせて、ATM は DNA 損傷非依存的に、DNA 損傷経路とは別の機構で、酸化ストレスにより活性化することを示すものである。さらに、15d-PGJ<sub>2</sub> 刺激では、DNA 損傷応答を引き起こすことなく、細胞老化を誘導することも明らかにした。細胞老化には DNA 損傷応答が必要であると考えられているため、この結果は、DNA 損傷チェックポイントによる細胞周期停止と不可逆的細胞老化の機構を正確に区別して理解するために重要であると考えられる。加えて、この結果は、酸化ストレスと細胞老化を DNA 損傷非依存的に直接的に結びつけるものであり、酸化ストレスによる細胞老化の誘導機構を明らかにする上で意義あるものである。

また、Nbs1 の解析結果から派生して、DNA 二重鎖切断応答における ATM の上流因子として広く認識されている Nbs1 が、DNA 複製障害時の ATR チェックポイント因子の上流因子としても働くことも明らかにした。このことは、Nbs1 変異が原因のナイミーヘン症候群では ATM 欠損が原因の毛細血管拡張性運動失調症と ATR 変異が原因の ATR セッケル症候群の両方の特徴がみられることと一致し、これらの関連性と Nbs1 と ATM、ATR の機能を解析することは、それぞれの症状の原因機構の解明に役立つものである。

本研究の途中で、2 型糖尿病の治療薬メトホルミンによる代謝制御に ATM が関与していることが報告された。本研究でも、ATM の DNA 損傷応答とは異なるこの代謝制御における機能が ATM の酸化ストレス応答機構と関係している可能性を考え、酸化ストレス刺激における代謝制御応答を解析した。その結果、メトホルミンも 15d-PGJ<sub>2</sub> も ATM 依存的代謝制御に影響を与えることが明らかになった。メトホルミンが ATM を活性化作用については今後の解析を必要とするが、この結果は、メトホルミンの作用がなんらかの過程を経て、酸化ストレス応答機構とつながっている可能性を示すものであり、DNA 損傷応答機構とは異なる、ATM の酸化ストレス応答機構の生理的な面における重要性を示すものである。

さらに本研究の途中で、他のグループが、ATM は過酸化水素刺激によって DNA 損傷非依存的に活性化し、その活性化には二つの ATM がシステイン残基 2991 でジスルフィド結合を形成することが重要であると報告した。本研究でも 15d-PGJ<sub>2</sub> による ATM のジスルフィド結合の形成を解析し、15d-PGJ<sub>2</sub> の場合は過酸化水素の場合と異なり、ジスルフィド結合の形成は起こらないことを確認した。過酸化水素と 15d-PGJ<sub>2</sub> はどちらも SH 基に作用するので、過酸化水素と 15d-PGJ<sub>2</sub> が異なる機構によって ATM を活性化している可能性よりは、酸化ストレスによる ATM の活性化には二つの ATM がジスルフィド結合を形成することが必要なのではなく、システイン残基 2991 がある特定の性質を持った物質、ATM や 15d-PGJ<sub>2</sub> 等、によって修飾されることが重要である可能性の方が高いと考えられる。本研究では ATM のシステイン残基 2991 をアラニンに変異させた変異体を作製し、その変異型 ATM を組み込んだ細胞の作製も行ったので、今後はこ

の細胞を用いてより詳細に、ATM の酸化ストレス応答機構を解析する予定である。

DNA 損傷のチェックポイント因子として広く認識されてきた ATM が、酸化ストレスに対しても応答し、DNA 損傷応答機構とは別経路で、細胞老化、代謝系の制御機構に関与していることを明らかにしたことは、ATM が原因で起こる毛細血管拡張性運動失調症で見られる小脳変性や毛細血管拡張、老化、発がんなどの機構の詳細な解明のために貢献するものである。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

①Shigechi T, Tomida J, Sato K, Kobayashi M, Eykelenboom JK, Pessina F, Zhang Y, Uchida E, Ishiai M, Lowndes NF, Yamamoto K, Kurumizaka H, Maehara Y, Takata M, ATR-ATRIP kinase complex triggers activation of the Fanconi anemia DNA repair pathway, *Cancer Res*, 72(2012), 1149-1156, 査読有

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2904

②Yoshimura A, Akita M, Hosono Y, Abe T, Kobayashi M, Yamamoto K, Tada S, Seki M, Enomoto T, Functional relationship between Claspin and Rad17, *Biochem Biophys Res Commun*, 414(2011), 298-303, 査読有

DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.09.037

③Jurado S, Smyth I, van Denderen B, Tennis N, Hammet A, Hewitt K, Ng JL, McNeese CJ, Kozlov SV, Oka H, Kobayashi M, Conlan LA, Cole TJ, Yamamoto K, Taniguchi Y, Takeda S, Lavin MF, and Heierhorst J, Dual Functions of ASCIZ in the DNA Base Damage Response and Pulmonary Organogenesis, *PLoS Genetics* 6(2010), e1001170, 査読有

DOI:10.1371/journal.pgen.1001170

[学会発表] (計 4 件)

①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, 2011 年 10 月 3 日, 名古屋国際会議場 (愛知県)

②Kobayashi M, Hayashi N, Yamamoto K, 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, 2011年5月26日, KKRホテル金沢(石川県)

③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, 2010年9月22日, 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル(大阪府)

④Kobayashi M, Hayashi N, Yamamoto K, 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日, KKRホテル金沢(石川県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 昌彦 (KOBAYASHI MASAHIKO)  
金沢大学・がん進展制御研究所・助教  
研究者番号: 70285633

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし