

15 - 12 発がんにおける染色体動態異常に関する研究

主任研究者 国立がんセンター 中 釜 齊

研究成果の要旨

(GGGCA)反復配列により形成される4重鎖構造が大腸菌内で複製阻害を起こす要因となった。sacB(+)のminiFプラスミドに(GGGCA)反復配列を挿入したプラスミドpFSを野生型大腸菌およびrecA破壊株に導入したところ、反復配列を含まないpFSと比較して2-3倍の頻度でプラスミドの脱落を生じた。Parp-1欠損による染色体倍化現象などのゲノム不安定化が、p53の機能低下と関連することが示唆された。MYCN高発現の神経芽腫では、DNA損傷刺激下において中心体複製とDNA複製のカップリングの障害により中心体数の異常複製を起こすことが分かった。乳がん等で認められるAurora-Aの過剰発現によるがん化には、p53変異などの分裂期チェックポイント機能の障害によるアポトーシス誘導の解除が必要であることが分かった。Aurora-Aの働きを阻害することで、がん細胞選択的に細胞死や細胞分化を誘導できる可能性が示唆された。DNA修復関連遺伝子群では、NBS1が二本鎖切断修復の"場"の形成に重要な役割を果たしていること、損傷乗越え修復に関わるREV1L遺伝子のアミノ酸置換を伴う多型が肺扁平上皮がんの易罹患性と相関することなどが明らかになった。出芽酵母を用いた解析では、高度に反復したrDNA領域の特殊構造が複製開始制御異常を鋭敏に検知し、ゲノム上の様々な部位での染色体異常を未然に防ぐ役割を果たしていると考えられた。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
中 釜 齊	国立がんセンター研究所 部長	反復配列を介した染色体不安定化機構、及びParp-1欠失と染色体多倍体化
三 輪 正 直	筑波大学基礎医学系生化学 教授	発がんにおける染色体動態、細胞周期異常の研究
丸 本 朋 稔	* ¹ 熊本大学大学院医学薬学研究部 助手	分裂期キナーゼの機能異常に伴う染色体不安定化と発がんとの関連に関する研究
三 森 龍 之	* ² 熊本大学大学院医学薬学研究部 助手	
小 松 賢 志	京都大学放射線生物研究センター 教授	NBS1によるゲノム安定化機構
太 田 力	国立がんセンター研究所 室長	発がんにおけるDNA修復因子に関する研究
真 木 寿 治	奈良先端科学技術大学院大学 教授	染色体複製開始制御異常による染色体異常の誘発

*¹: 平成15年4月1日～平成16年3月31日

*²: 平成16年4月1日～平成17年3月31日

総括研究報告

1 研究目的

本研究の目的は、染色体の安定性維持機構のための分子機構の包括的解明を目指し、その破綻とがん化との関

連を明らかにすることである。染色体の安定性維持には、DNA複製の制御機構、組み換え修復機構、細胞分裂の際の種々のチェックポイント機構が複雑に絡んでいる。特に、DNA損傷のチェックポイント機構による染色体安定化機構の解明は、内在性及び外的環境要因によるDNA損

傷がもたらす複製フォークの進行阻害による染色体不安定化と、そのがん化における意義を解明する上で極めて重要である。最終的には、染色体不安定化に関わる分子種の構造および機能異常を高感度に検出するための診断法を開発し、がんの早期診断或いは予防への応用やがんの薬物治療におけるあらたな分子標的としての可能性についても追究していきたい。

2 研究成果

(1) G-rich な short tandem repeat 反復配列の DNA 高次構造の形成と不安定化の分子機構

マウス short tandem repeat (STR) Pc-1 の G-rich リピート配列 (GGGCA) が分子内 4 重鎖構造 (G4 構造) をとること、(GGGCA) 配列に結合する蛋白質として同定した UP1/hnRNP A1 が G4 構造における DNA 合成阻害を解消することを見出した。(GGGCA) 配列の 8 回或いは 12 回の繰返し配列を leading 鎖及び lagging 鎖に有するプラスミド pYA4/6 (leading 鎖), pYA5/7 (lagging 鎖) を大腸菌に導入し、増殖期の大腸菌からプラスミドを回収して 2 次元ゲル電気泳動で解析した結果、反復配列をもつプラスミドでは leading 鎖或いは lagging 鎖に依らず、G-rich 配列の位置で複製フォークの停止像が認められた。

(2) (GGGCA) 反復配列の大腸菌内における複製阻害の定量的評価

sacB(+) の miniF プラスミド (pFS) に (GGGCA) の 8 回ないし 12 回の繰返し配列を挿入したプラスミドを大腸菌野生株および recA 破壊株に導入し、蔗糖添加培地での pFS プラスミドの脱落の割合 (loss rate; LR) を測定した。(GGGCA)₈₋₁₂ のリピート配列を有する pFS の LR は、野生株では 0.42 ~ 0.44 % となり、リピート配列を有しない場合 (対照群) に比べて 1.82 ~ 1.92 倍に上昇した。ランダムな 40mer または 60mer を導入した pFS の LR は対照群と有意な差を認めなかったことから、(GGGCA) のリピート配列が挿入されたことにより、pFS の LR が上昇したものと結論された。recA 遺伝子の破壊株を用いた場合の LR は 0.52 (8 回反復 pFS) 及び 0.76% (12 回反復 pFS) と対照群に比較して 2.16 倍及び 3.14 倍に上昇した。

(3) (GGGCA) 配列の哺乳動物細胞の *in vitro* DNA 複製系での複製阻害の検討

哺乳動物細胞の DNA 複製における G-rich リピートの意義を明らかにするため、SV40-ori プラスミドの DNA 複製 (*in vitro*) に及ぼす (GGGCA) 反復配列の影響について 2 次元ゲル電気泳動法で検討した。8 回及び 12 回繰返しの場合においても、明らかな複製フォークの停止を示すスポットは観察されなかったことから、正常の哺

乳動物細胞においては、DNA 高次構造の存在による DNA 複製阻害を解消する仕組みが存在することが示唆された。

(4) hnRNP A3 のテロメア配列 (GGGTTA)_n への結合

UP1/hnRNP A1 とともに一本鎖 (GGGCA) 配列に結合する蛋白質として同定された hnRNP A3 が、(GGGCA) 配列よりもテロメア配列 (GGGTTA) により特異的に結合することが分かった。(GGGTTA) 配列を有する template DNA の *in vitro* での複製が、hnRNP A3 蛋白質の量依存的に阻害された。

(5) RNA 結合蛋白質 LRP130 のゲノム安定化への関与

Pc-1 の C-rich 鎖に配列特異的に結合する蛋白質として同定した LRP130 は、間期では細胞質、特に核膜周囲に強く局在し、分裂期ではクロマチン周囲に局在することが分かった。LRP130 の過剰発現細胞ではダンベル様像や、核内ラミンの核外染色等の核の形態異常が高頻度に誘導されることから、LRP130 が細胞の分裂期にクロマチンと相互作用することにより、染色体分配を正常に維持している可能性が示唆された。

(6) ポリ (ADP-リボース) 合成酵素 (Parp-1) の染色体不安定化への関与

Parp-1 遺伝子のノックアウトマウス由来の不死化線維芽細胞では、高頻度に polyploidy が観測されることから、Parp-1 遺伝子の染色体倍化現象への関与が示唆された。さらに、ガンマ線 8 Gy 照射 2.5 時間後、Parp-1^{-/-} 細胞では Mdm2 および p21^{Waf1} mRNA 誘導の顕著な低下がみられ、Parp-1^{-/-} 細胞では自然不死化後の p53 の機能が低下していることが示された。即ち、Parp-1 欠損下における染色体倍加が p53 の機能低下と関連する可能性がある。

(7) 神経芽腫細胞での MYCN 発現亢進と中心体複製過剰

MYCN 蛋白質を発現せず中心体の数の正常な神経芽腫由来の SH-EP 細胞株に、MYCN を導入した細胞株 (MYCN-EGFP 細胞) と空ベクターを導入した細胞株 (vector-EGFP 細胞) を樹立した。10 グレイの γ 線照射 24 時間後の中心体数を計測したところ、MYCN-EGFP 細胞では照射後 72 時間で分裂細胞の 39% (14/36) で異常多極分裂を示したのに対し、vector-EGFP 細胞では 9% (3/32) であった。DNA 障害性薬剤の aphidicolin (0.5 μg/ml) でも同様の現象が認められたことから、MYCN の高発現状態で DNA 障害を伴った場合に、細胞分裂時の中心体複製と DNA 複製とのカップリングの解除により中心体数異常が発生する可能性がある。

(8) 分裂期前期における Aurora-A キナーゼの役割:

siRNA により内在性 Aurora-A の機能を阻害したところ、染色体の赤道面上への整列が障害された。整列に失敗した染色体では微小管と動原体との結合が正常に行なわれないことから、分裂期中期において染色体が赤道面上へ整列するために必要である微小管と動原体との結合に

Aurora-A が機能していることが明らかとなった。さらに、分裂期後期においても、正常な細胞質分裂の進行に Aurora-A の機能が必須であることがわかった。

(9) Aurora-A キナーゼの高発現と発がんとの関連

乳がん等の多くのがん細胞で、Aurora A が全細胞周期に亘って高発現している。Aurora-A-トランスジェニックマウスの乳腺では、過形成性変化及び二核細胞の出現など見られたが、悪性腫瘍形成は確認されなかった。

Aurora-A 発現マウスと p53 不活化マウスを交配したところ、細胞死が有意に抑制され腫瘍性変化も一部に観察されたことから、Aurora-A の過剰発現によるがん化の誘導には p53 変異など分裂期後チェックポイントの障害が必要であることが示唆された。また、がん細胞で高発現している Aurora-A は、がん細胞が生きるために不可欠になっていることが考えられ、Aurora-A の機能を阻害することで正常細胞よりはるかに高い感受性で細胞死や分化を誘導できる可能性が期待される。

(10) ナイミーヘン症候群原因遺伝子 NBS1 のテロメア維持機構およびゲノム安定化機構への関与

染色体不安定性遺伝病に分類されるナイミーヘン症候群は患者の約 40% に腫瘍の発生をみる高発がん性疾患でもある。NBS1 はテロメア複製期にテロメア結合蛋白 TRF2 と共局在し、テロメア長の維持機構に関与していることが分かった。また、放射線抵抗性 NBS 細胞および AT 細胞では SMC1 の Ser-957 および Ser-966 のリン酸化の低下が見られることから、放射線照射後の S 期チェックポイントは NBS1 および SMC1 リン酸化経路を介して起こることが示唆された。NBS1 及び AT 遺伝子の変異細胞では、放射線照射後の染色体異常が高頻度に誘発されることから、これら遺伝子の機能異常による S 期チェックポイントの異常がゲノム不安定化の原因と考えられた。さらに NBS 蛋白質は、MRE11, RAD50, WRN 蛋白質と相互作用し、DNA 二本鎖切断の修復の“場”を形成する上で重要な役割を果たしていることが分かった。

(11) がんにおける NBS1 の変異

がん患者から見つかった変異型 NBS1 と野生型 NBS1 を恒常的に発現する細胞株を樹立した。NBS1 蛋白質と Mre11 蛋白質との相互作用は変異型と野生型で差がなかったが、放射線障害に対する感受性では変異型が有意に高い致死感受性を示した。がん患者から見つかった NBS1 遺伝子の変異は、Nbs1 蛋白質の組換え修復活性に重篤な障害を与える変異であることがわかった。

(12) 発がんに関わる DNA 修復遺伝子の網羅的 SNPs 解析

約 150 個の DNA 修復系遺伝子の全てのエクソン領域とイントロン-エクソン境界領域の塩基配列の解読し、一塩

基多型 (SNP) を多数検出した。アミノ酸に変化を与える 1562 個の SNPs から 50 個を選別し、肺がん患者数 1,000 名を用いた相関解析を行った。その結果、3 種類の遺伝子の 4 つの SNPs が、扁平上皮がん患者 (約 200 名) の易罹患性と相関した。この内、REV1L 遺伝子の SNP 型がコードする蛋白質は、野生型に比べて約 70% の損傷乗越え修復活性しかないことがわかった。この結果は、REV1L 遺伝子の多型解析ががんの治療薬選択の一つの指標になることを大いに期待させるものである。

(11) 複製開始制御異常のセンサーとしての rDNA の役割

orc1-4 二倍体の出芽酵母細胞の rDNA 領域の短縮株は非許容温度でも十分に生育できること、rDNA 領域のコピー数を減少させるとコピー数の長さに応じて非許容温度での増殖阻害の抑制が観察されることから、rDNA 領域が非許容温度での細胞周期停止や損傷チェックポイント制御の抑制に関与することが分かった。即ち、rDNA 領域が複製開始制御異常のセンサーとして働いていることが明確に示され、rDNA 単位配列のコピー数がセンサーの感度を規定していることが明らかになった。

(8) rDNA 領域短縮株の DNA 損傷感受性

出芽酵母の rDNA 領域が、複製開始制御異常以外の化学変異原などによる DNA 損傷の感知にも関与しているかについて検討した。rDNA 短縮株はアルキル化剤や紫外線に感受性を示すことが見いだされたが、損傷チェックポイント制御の発動そのものには rDNA 短縮株と野生株の間で差がなかった。興味深いことに、rDNA 短縮株で rDNA 領域での転写を抑制した場合に、変異原に対する高感受性が強く抑制されることや、野生株においても rDNA 領域での転写抑制により変異原に対する感受性が通常よりも低下したことから、rDNA 領域の転写の強度が変異原による DNA 損傷の細胞致死性に大きな影響を与えていることを発見した。

3 倫理面への配慮

本研究で行う動物実験については、各研究機関および大学において定められた「動物実験に関する指針」を遵守し、実験に用いる動物も統計学的検定に必要な最小限の個体数を用いた。動物遺伝子からヒトの原因遺伝子に到達した場合や、ヒト腫瘍サンプルを用いる解析の実施に当たっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、指針適用範囲内に該当する研究計画については、各機関の遺伝子解析研究倫理審査委員会において研究計画に対する審査を受け、承認を得た上で実施した。