

## 123. DNA 修復因子 PNKP の活性抑制による細胞死の誘導

島田 幹男

\*東京工業大学 原子炉工学研究所 システム安全・工学部門

Key words : PNKP, DNA 修復, 乳がん, 抗がん剤

### 緒言

細胞内ゲノム DNA は放射線や紫外線、細胞内代謝物などのストレスに常に晒されており、DNA 損傷が恒常的に生じている。DNA 損傷は塩基損傷、一本鎖切断、二本鎖切断など様々な種類があり、それらに対する生体防御機構として DNA 修復機構が細胞内には存在する。とりわけ二本鎖切断は重篤で細胞死につながるために直ちに修復されなければならない。

一方で抗がん剤の分野では人工的に DNA 損傷を誘発し、がん細胞を殺傷するという目的のためにシスプラチンのように DNA 架橋を誘導する DNA 損傷剤が頻繁に使用されてきた。また、近年では BRCA1/2 に変異を持つ家族性乳がんに対して効果を持つ阻害剤として PARP1 阻害剤が注目を集めている。PARP1 は一本鎖切断修復に作用する DNA 修復酵素であるが、これを阻害することにより DNA 複製の阻害と連携した二本鎖切断が生じることが知られている<sup>1, 2)</sup>。BRCA1 の機能が正常ではない乳がん細胞では PARP1 阻害により生じた二本鎖切断が修復できずに細胞死に至るために PARP1 阻害剤の BRCA1/2 変異家族性乳がんへの効果は期待が大きい。

我々はこれらの知見を踏まえ、さらに効率の高い抗がん剤として DNA 修復酵素 PNKP に着目した。PNKP は DNA 損傷末端を直接リン酸化、および脱リン酸化する酵素で DNA 修復経路では一本鎖切断と二本鎖切断修復経路に関与していると考えられている。そのために乳がん細胞に PNKP の阻害剤を添加した際には PARP1 より効率的な細胞死の誘導が期待できるのではと考えた。

本研究は PNKP の DNA 修復における分子機能を詳細に解析することでより効率の高い抗がん剤の開発に寄与することが目的である。

### 方法および結果

#### 1. siRNA による PNKP ノックダウン時の DNA 複製ストレス応答

以前の我々の研究によりコンディショナルノックアウトマウスにおける PNKP の脳特異的な欠損は胎児期において高頻度で細胞死を誘導することがわかっていた。特に神経幹細胞および神経前駆細胞において細胞死が誘導されていたので PNKP は特にがん細胞や細胞分裂が盛んな細胞において活性が高いと思われた<sup>3)</sup>。細胞分裂が盛んな細胞はすなわち、DNA 複製の活性も高いために PNKP の欠損は DNA 複製にも影響する可能性が示唆されたために、DNA 複製ストレス時での PNKP の分子的な役割を検討した。最初に U2OS (ヒト骨肉腫細胞)、HCT116 (ヒト大腸癌細胞)、HeLa (ヒト子宮頸がん細胞) において siRNA により PNKP のノックダウンを試みて、ウエスタンブロッティング法により PNKP 発現量の低下を確認した (図 1)。

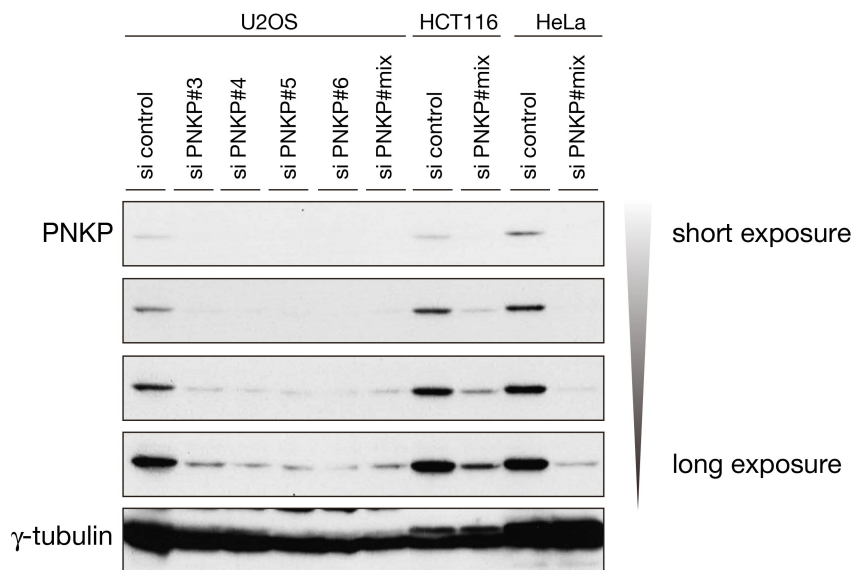


図1. siRNAによるPNKPのノックダウンをウエスタンブロッティングにより検出  
 U2OS、HCT116、HeLaのそれぞれの細胞でsiRNAによるPNKPの発現量の減少をPNKP抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検出。gamma-tubulinはローディングコントロールとして使用。

次にU2OS細胞を用いてPNKPのノックダウン状況下で細胞周期チェックポイントタンパク質であるChk1のリン酸化が影響を受けるかをChk1のセリン317番目のリン酸化特異認識抗体を用いて確認した(図2)。その結果、Hydroxyurea (HU)及びChk1の阻害剤(UCN-01)で処理した細胞ではDNA複製ストレスによりChk1のリン酸化が増加するのに対し、PNKPをノックダウンした細胞ではそれが半分以下に抑制されていた。これらの結果はPNKPが他のリン酸化酵素を介してChk1のリン酸化に関与しているか、あるいはChk1のリン酸化が活性化されるDNA複製ストレスの発生そのものを抑制する可能性を示唆している。

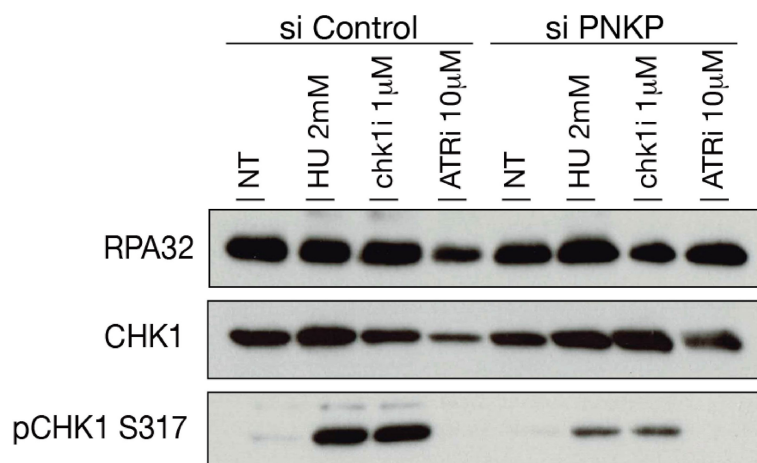


図2. U2OS細胞におけるPNKPノックダウン条件下でのDNA複製ストレスに対するChk1のリン酸化レベルの減少

U2OS細胞においてsiRNAノックダウンによりPNKPの発現量低下条件下で複製ストレスに対して細胞周期チェックポイントタンパク質Chk1のセリン317のリン酸化レベルが減少した。DNA複製ストレスとしてHU、Chk1阻害剤、ATR阻害剤を使用。

## 2. A12B4C3 (PNKP阻害剤) 添加によるDNA複製ストレス応答への影響

上記の結果よりPNKPの減少がDNA複製ストレス時の細胞周期チェックポイントへ影響を与えていることがわかったために、PNKPの阻害剤を用いて同様の結果が得られるかを検討した。PNKPの阻害剤としてA12B4C3を使用し<sup>4)</sup>、上記実験と同様にU2OS細胞でHU処理によりDNA複製ストレスを誘導した。A12B4C3 (10 $\mu$ M) とHU (2mM) を4時間処理後、タンパクを回収し、ウエスタンブロッティングによりChk1とRPAのリン酸化レベルを解析した(図3)。RPAは一本鎖DNAに結合するタンパク質でDNA複製や、損傷時に一本鎖DNAに結合しDNAを保護する機能を持つ。また、DNA複製ストレス時にはATRキナーゼによりリン酸化され、シグナル伝達系の一端を担う。PNKPの阻害剤を添加した細胞ではPNKPのノックダウンを行った実験と同様、Chk1のリン酸化が抑制されたがRPAのリン酸化が増加する結果となった。

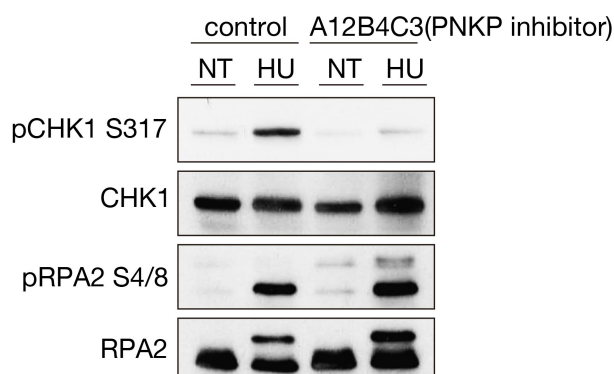


図3. 薬剤によるPNKP阻害時におけるDNA複製ストレス応答

PNKP阻害剤であるA12B4C3とDNA複製ストレス誘導剤であるHUをU2OSに添加し、DNA複製ストレス応答タンパク質であるChk1のリン酸化とRPAのリン酸化をウエスタンブロッティングにより検出した結果、PNKP阻害時にはChk1のリン酸化が減少していたが、RPAのリン酸化は増加していた。

さらに上記と同様の実験を免疫染色法により解析した（図4）。すると興味深いことにウエスタンブロットの結果とは対照的に免疫染色法ではRPAのリン酸化が核内では減少していることがわかった。リン酸化されたRPAは通常はDNA付近のクロマチン画分から検出されるが、これらの結果はPNKPがリン酸化RPAのクロマチンへの結合に必要である可能性を示唆している。図3で示したウエスタンブロットの結果は全タンパク質を抽出したサンプルを使用しており、リン酸化RPAそのものの量を示しているが、核内に存在するリン酸化RPAの量を示してはいない。今後はクロマチン画分と細胞質画分をわけて解析することによりPNKPがリン酸化RPAの挙動にいかに関与するかを調べたい。

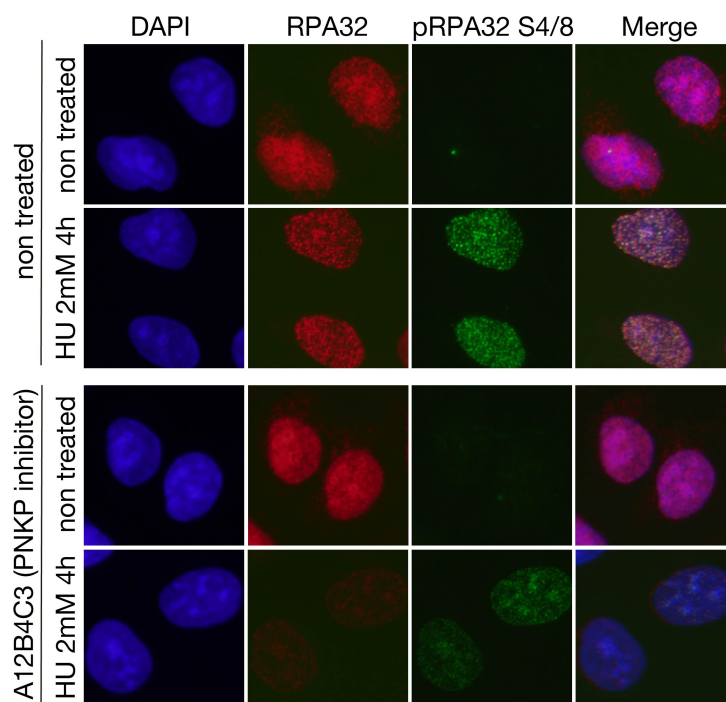


図4. 免疫染色法によるPNKP阻害剤添加時におけるリン酸化RPAの挙動変化の解析  
免疫染色法によりPNKP阻害剤(A12B4C3)処理時のRPAおよびリン酸化RPAの挙動を観察した結果、それぞれの核内の局在が減少していた。

## 考 察

本研究によりPNKPのタンパク質発現の抑制および阻害剤による抑制がDNA複製ストレス応答に影響することがわかった。しかし、詳細な分子機構はまだ不明な点が多く、さらなる研究を必要とする。一方でこれらの知見はPNKPが抗がん剤として有用である可能性を示唆しており、今後も本テーマでの研究を継続していきたい。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は、東京工業大学科学技術創成研究院先端原子力研究所の松本義久、加瀬直也、塚田海馬である。本稿を終えるにあたり、本研究を御支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, Kyle S, Meuth M, Curtin NJ, Helleday T. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*. 2005 Apr 14;434(7035):913-7. Erratum in: *Nature*. 2007 May 17;447(7142):346. DOI: 10.1038/nature03443 PubMed PMID: 15829966

- 2) Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, Santarosa M, Dillon KJ, Hickson I, Knights C, Martin NM, Jackson SP, Smith GC, Ashworth A. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*. 2005 Apr 14;434(7035):917-21. DOI: 10.1038/nature03445 PubMed PMID: 15829967
- 3) Shimada M, Dumitrache LC, Russell HR, McKinnon PJ. Polynucleotide kinase-phosphatase enables neurogenesis via multiple DNA repair pathways to maintain genome stability. *EMBO J*. 2015 Oct 1;34(19):2465-80. Epub 2015 Aug 19. PMCID: PMC4601665 DOI: 10.15252/embj.201591363 PubMed PMID: 26290337
- 4) Freschauf GK, Karimi-Busheri F, Ulaczyk-Lesanko A, Mereniuk TR, Ahrens A, Koshy JM, Rasouli-Nia A, Pasarj P, Holmes CF, Rininsland F, Hall DG, Weinfeld M. Identification of a small molecule inhibitor of the human DNA repair enzyme polynucleotide kinase/phosphatase. *Cancer Res*. 2009 Oct 1;69(19):7739-46. Epub 2009 Sep 22. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1805. PubMed PMID: 19773431