

塩による DNA 損傷誘導と細胞応答機構, その癌化への関与に関する研究

楊 其駿, 正井 久雄

東京都医学総合研究所ゲノム動態プロジェクト

概要

複製ストレスはがん細胞の特徴の一つであり, がん遺伝子活性化, 熱, 浸透圧, 酸化ストレス, 低酸素など様々な生物学的ストレスによって誘発される。これらのストレスは, 複製チェックポイントにおいて中心的な役割を担うキナーゼである Chk1 を活性化する。Chk1 の活性化には, DNA 複製制御因子として知られる Claspin が関与する。

本研究は, Claspin が細胞ストレス応答において新たな役割を果たすことを明らかにした。Claspin は様々なストレスに反応して Chk1 の活性化を媒介するが, そのメカニズムは DNA 複製阻害を伴う場合と伴わない場合がある。

DNA 複製が活発な S 期における Chk1 の活性化は, Claspin に強く依存する一方, G1 期における活性化は Claspin 非依存的である。この結果は, Claspin が主に DNA 複製と関連した Chk1 活性化経路において機能することを示唆する。興味深いことに, 熱ストレスは Claspin の過剰リン酸化を引き起こす。eIF2 α キナーゼ (PERK, GCN2, PKR, HRI) 欠損細胞を用いた実験から, GCN2 と HRI が Claspin-Chk1 活性化と細胞の熱ストレス応答に必須であることが明らかになった。

質量分析により, 熱ストレス下でリン酸化される Claspin の C 末端領域に 5 つのリン酸化部位が同定された。生化学的解析により, GCN2 と HRI がこのリン酸化に関与することが確認された。これらのリン酸化部位に変異を持つ細胞株は, 熱ストレス下でチェックポイント活性化や DNA 複製停止ができず, DNA 損傷の蓄積と生存率の低下を示した。このことから, eIF2 α キナーゼを介した Claspin のリン酸化が, 熱ストレス下での細胞生存に極めて重要であることが示された。

本研究は, 複製ストレスチェックポイントと様々な生物学的ストレスとの新たな関連性を提示し, Claspin の多面的機能を明らかにした。Claspin は DNA 複製制御だけでなく, ストレス応答経路にも関与しており, Chk1 活性化と細胞ストレス応答の複雑なメカニズム解明に貢献する。これらの知見は, がん研究や治療法開発に新たな視点をもたらす可能性がある。

1. 研究目的

ストレス応答は細胞の増殖, 生存において最も重要な生体反応の一つである。各種のストレスにより誘導される細胞応答に関して, これらの細胞応答がどのように連結し, 統合的に細胞増殖, 生存を制御するかは未解明である。研究代表者は Claspin という複製ストレス応答のメディエーター (仲介分子) が, 他のストレスからのシグナルも仲介する可能性を見出した。Claspin を介したストレス応答機構の詳細な解析により, 生体ストレスが誘導する既知のストレス応答経路が, 複製ストレスチェックポイント経路とどのようなメカニズムでクロストークするかを解明する。生体ストレ

スが, Claspin を介して細胞の増殖, 生存を統合的, 協調的に制御するメカニズムの解明が期待される。また, 生体ストレス応答の不全により, ゲノム不安定性が誘導され, 癌の発生の原因になる可能性が想定され, 発癌のメカニズムの新しい原理の発見につながる可能性がある。

2. 研究方法

2.1 種々の生体ストレス応答における Claspin の仲介分子としての未知の機能解明

実験 1: 酸化, 浸透圧, pH など種々のストレスを細胞に与えた条件下で Chk1 活性化を指標に, どの細胞周期で Chk1 の活性化が起こるか。また, ストレスを与えた後,

EdU を取り込ませ、どの生体ストレスが DNA 合成を直接阻害するかを決定する。

2. 2 高温ストレス応答における複製ストレスチェックポイントとISR経路とのクロストークのメカニズムの解明

実験 1: 高温処理の後に、DNA 複製の停止、DNA 損傷、Claspin 活性化、ISR/eIF2 α キナーゼ、熱ショックタンパク質誘導などがどのようなタイムコースで誘導されるかを詳細に解析する。

実験 2: PERK, GCN2, PKR, HRI の 4 つの ISR/eIF2 α キナーゼによる Claspin と Chk1 のリン酸化を *in vitro* で検証する。リン酸化される場合リン酸化部位を決定し、その変異体の高温ストレス応答での機能(細胞レベルでのリン酸化, Chk1 活性化, 高温感受性など)を測定する。

実験 3: 高温ストレスにより特異的に誘導される Claspin 上のリン酸化部位を網羅的に決定する。その変異体の高温ストレス応答を測定。これらのリン酸化の責任キナーゼを同定する。上記の 4 種類の ISR/eIF2 α キナーゼがリン酸化するかを検証する。

3. 研究結果

3. 1 種々の生体ストレス応答における Claspin の仲介分子としての未知の機能解明

3. 1. 1 様々な生物学的ストレスが Chk1 を活性化し、DNA 損傷を誘発する

異なる細胞ストレスが、異なる程度で Chk1 のリン酸化と DNA 損傷信号を活性化し、その応答は細胞周期中にも異なるように調節されている。注目すべき結論は、すべてのストレスが細胞周期全体を通じて Chk1 を活性化できることである。一般的に、G1 細胞での Chk1 の活性化の強度は、G1/S/G2 細胞よりも低い(図 1)。

3. 1. 2 生物学的ストレスは DNA 複製フォークの進行に異なる影響を与える

HU, ヒ素, 熱, および H₂O₂ 処理を 3 時間行くと、BrdU の取り込みが大幅に減少したが、他のストレスでは BrdU の取り込みに有意な影響は見られなかった。一方、HU, LPS, NaCl, および熱処理では細胞周期プロファイルは大きく変化しなかった(図 2)。

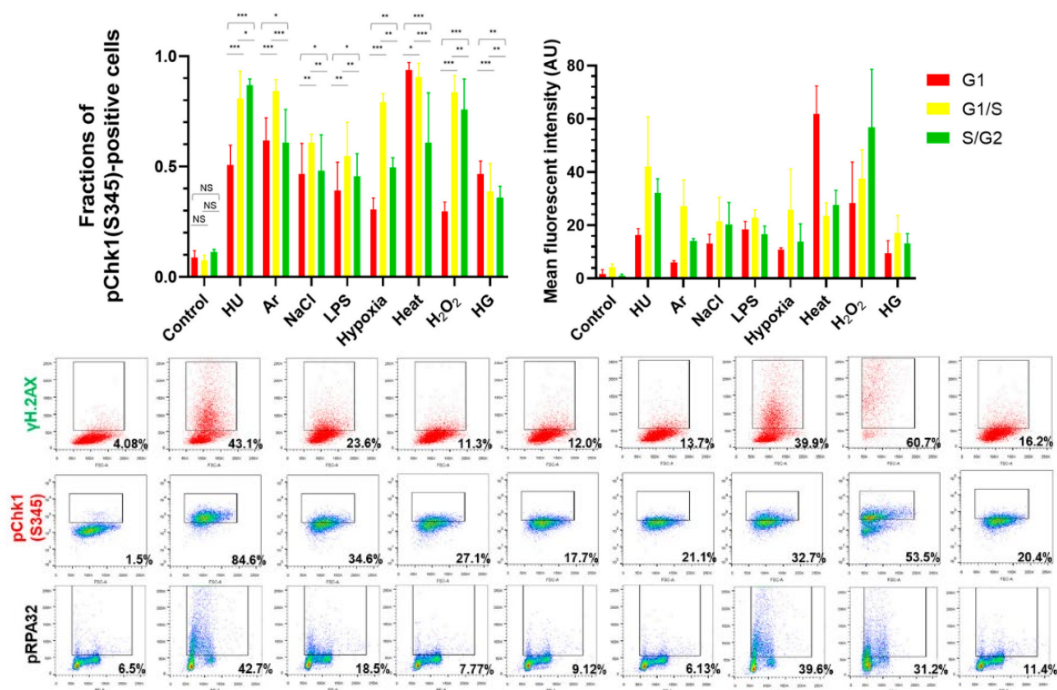


図 1 様々な細胞ストレスによる細胞周期段階依存の DNA 複製と DNA 損傷、および複製チェックポイントへの異なる影響 (上) U2OS Fucci 細胞に示された細胞ストレスを 3 時間与え、免疫染色を行い、その後、細胞を共焦点顕微鏡で解析した。各細胞周期集団において、pChk1(S345)を含む U2OS Fucci 細胞の割合を定量化した。(下) U2OS 細胞を様々なストレスに 3 時間曝露した後、 γ -H2AX(緑), pChk1(S345)(赤), および pRPA32(S4/8)(DNA 損傷を示すリン酸化一本鎖 DNA 結合タンパク質)の染色を行い、フローサイトメトリー解析を行った。 γ -H2AX(緑)と pChk1(S345)(赤)については、共焦点顕微鏡で観察した。代表的なデータと画像を示した。

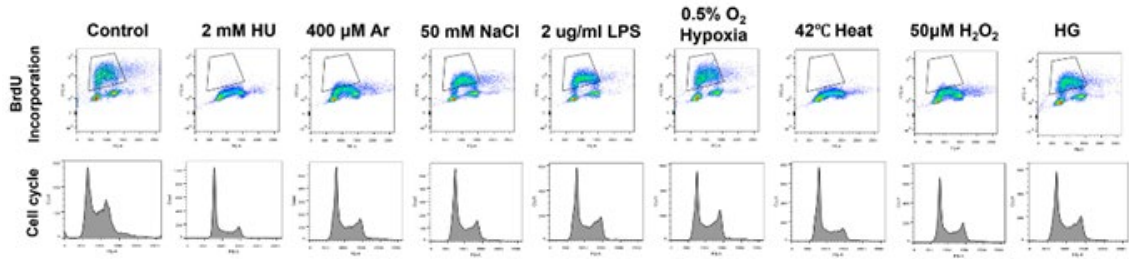


図 2 様々な生物学的ストレスは、異なる程度で DNA 複製に影響を与える。U2OS 細胞を、示した生物学的ストレスで 3 時間処理し、ヌクレオチド類似体 BrdU を細胞採取前に 15 分間添加した。次に、細胞を抗 BrdU 抗体と PI で染色して、フローサイトメトリーで分析した。代表的な画像を示した。
(上) BrdU の取り込み(DNA 合成)
(下) 細胞周期(DNA 含有量)

HU, 熱, ヒ素, および H_2O_2 は、FACS と BrdU の取り込みによって示される DNA 合成の減少と一致するように、複製フォークの進行を有意に遅らせた。一方、他のストレスは複製フォークの進行を有意に妨げなかったが、BrdU の取り込みの結果と一致した。これらの結果は、HU, ヒ素, 熱, および H_2O_2 の他にも、DNA 複製鎖の伸長を急激に阻害することを示している(図 3)。

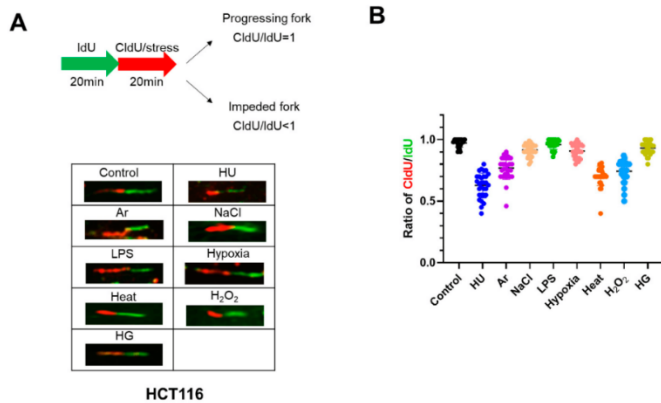


図 3 異なるストレス条件は、複製フォークの進行を異なる程度で影響する。
(A) 複製フォーク進行をモニターするための実験計画。簡単に言うと、HCT116 細胞を IdU で 20 分間標識した後、ストレス状態で CldU でさらに 20 分間標識した。ストレスへの暴露時間は、DNA の複製に対するストレスの急性効果を検出するために短く設定した。HU への 20 分間の暴露により、Chk1 の活性化が起こることが知られている。CldU/IdU の比が 1 未満の場合、複製フォークの進行がストレスにより妨げられていることが示される。様々なストレス処理下における代表的な DNA ファイバーを図の下部に示した。
(B) 示されたストレス存在下での CldU/IdU 比を決定し、提示した。すべての統計分析は、2 つの独立した実験における平均値 \pm SEM を表した。

3. 1. 3 様々なストレスが複製/チェックポイント因子に与える影響

様々なストレスにより Claspin は異なるリン酸化を受けることが、電気泳動移動度シフトの違いから示唆される。RPA は熱ストレスおよび過酸化水素により 24 時間後にリン酸化されており、これらのストレスによって DNA 損傷が誘導されることが示唆される(図 4)。

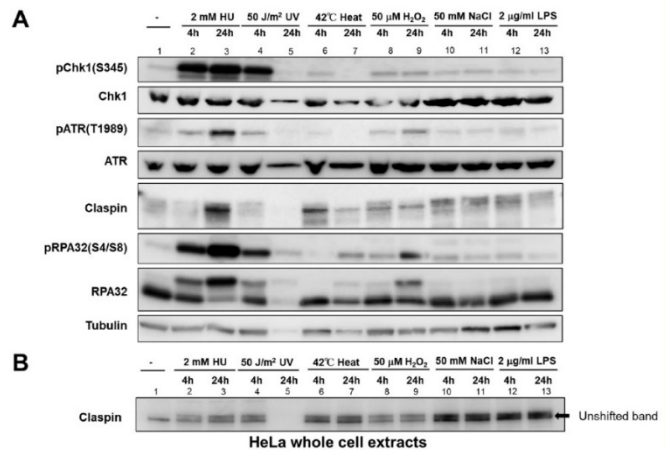


図 4 HeLa 細胞における様々な生物学的ストレスがチェックポイントおよび DNA 損傷関連因子に与える影響。HeLa 細胞に示されたストレスを指定された時間処理した。
(A) 全細胞抽出物を、指示された抗体を用いたウェスタンブロットティングで分析。
(B) リン酸化タンパク質の分離を改善するため、サンプルを低濃度ゲルで分析した。シフトしていない Claspin は矢印で示す。レーン 5 では、UV 照射による細胞死のためタンパク質が検出されなかった。

3. 1. 4 様々な生物学的ストレスによる Claspin 依存的および非依存的な Chk1 の活性化

ヒト子宮頸癌細胞株である HeLa 細胞において、様々なストレスによる Chk1 活性化に対する Claspin siRNA の影響を調べた。同一の生物学的ストレス群が、HU や UV 処理による活性化レベルには及ばないものの、Claspin 依存的に Chk1 を活性化した(図 5)。

様々な生物学的ストレスは細胞周期全体を通じて Chk1 を活性化するが、Claspin は主に S 期における Chk1 の活性化に必要とされる(図 6)。

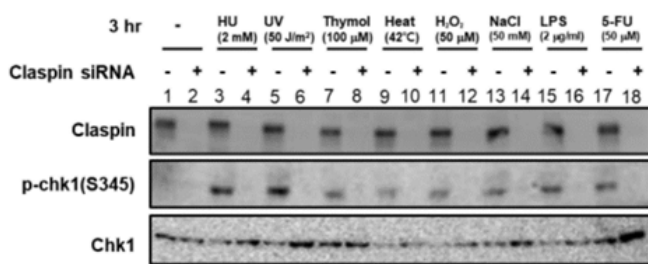


図 5 様々な生物学的ストレスによる Chk1 活性化に対する Claspin 欠乏の影響。

HeLa 細胞に、Claspin siRNA またはコントロール siRNA を 48 時間トランスフェクトし、細胞回収の 3 時間前に様々なストレスに曝露した。細胞の一部から全細胞抽出物を調製し、ウェスタンブロッティングにより Claspin および Tubulin を検出した。

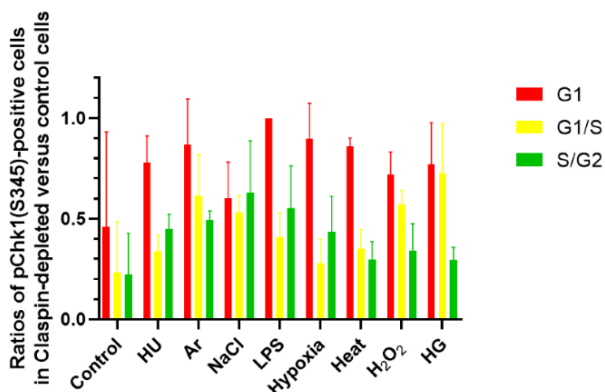


図 6 Claspin の枯渇は、主に S 期における様々なストレスによる Chk1 活性化を抑制する。

U2OS Fucci 細胞に、Claspin siRNA またはコントロール siRNA を 48 時間トランスフェクトし、細胞回収の 3 時間前に様々なストレスに曝露した。特定の細胞周期ステージにおける、Claspin 枯渇細胞とコントロール細胞での pChk1(S345)陽性細胞の比率を示した。値が高いほど、pChk1 シグナルの Claspin 機能への依存度が低い。すべての統計分析は、2 回の独立した実験(それぞれ 3 回の反復を含む)における平均値±SEM で表した。

3. 2 高温ストレス応答における複製ストレスチェックポイントと ISR 経路とのクロストークのメカニズムの解明

3. 2. 1 Chk1 活性化メカニズム

4 つの eIF2α キナーゼ(PERK, GCN2, PKR, HRI)を欠損させた MEF 細胞株を用いて、Chk1 活性化メカニズムをさらに調べた。その結果、GCN2 と HRI の発現が Chk1 活性化に必須であること、eIF2α キナーゼが Chk1 の活性化状態の維持に必要であることが明らかになった(図 7)。これらの結果から、eIF2α キナーゼは、Chk1 活性化と細胞の熱ストレス応答に重要な役割を果たしていると考えられる。

3. 2. 2 高温処理による Claspin のリン酸化

高温処理により、Claspin の C 末端に存在する 5 つのリン酸化サイトがリン酸化されることを、質量分析にて確認した(図 8)。

生化学的解析(図 9 左段)とキナーゼ阻害剤(図 9 右段)を用いて、これらのリン酸化サイトが GCN2 と HRI によってリン酸化されることを検証した。これらの結果から、Claspin と eIF2α キナーゼの相互作用は、細胞の熱ストレス応答に重要な影響を及ぼしていると考えられた。

Claspin の C 末端のリン酸化部位に変異を持つ細胞株は、熱ストレス下でのチェックポイント活性化(図 10A)や DNA 複製停止ができず(図 10B)、DNA 損傷の蓄積(図 10C)と生存率の低下(図 10D)を示した。このことから、eIF2α キナーゼを介した Claspin のリン酸化が、熱ストレス下での細胞生存に極めて重要であることが示された。

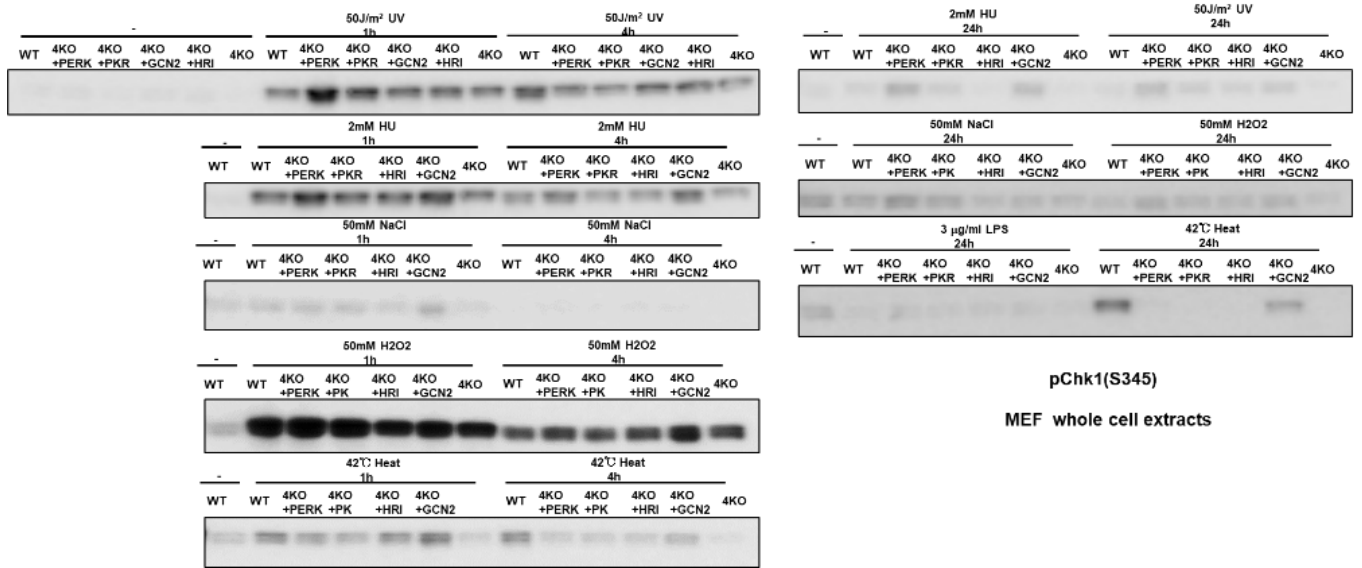


図7 E1f2 α キナーゼは熱ショックストレス下で Chk1 を促進する。

4 種類の E1f2 α キナーゼノックアウト MEF 細胞と回復細胞 (WT, 4KO, 4KO+PERK, 4KO + PKR, 4KO + HRI, 4KO + GCN2) を 1 時間または 4 時間処理し、全細胞抽出物を抗 pChk1(S345)抗体を用いたウエスタンブロッティングで分析した。

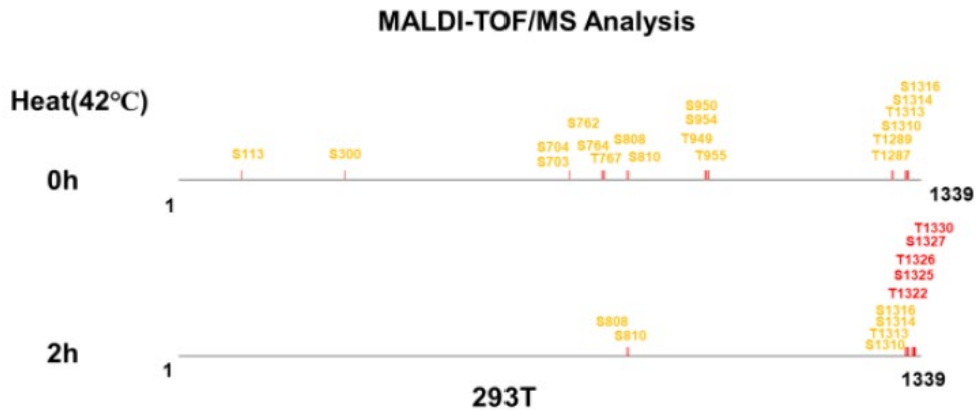


図8 高温処理による Claspin のリン酸化

Claspin-Flag を安定発現させた 293T 細胞を 42°C で 0 時間または 2 時間培養し、精製した Claspin を MALDI-TOF で分析し、リン酸化部位を黄色および赤色の文字で示した。赤色の文字は 2 時間 42°C 培養でのみリン酸化された部位を示す。

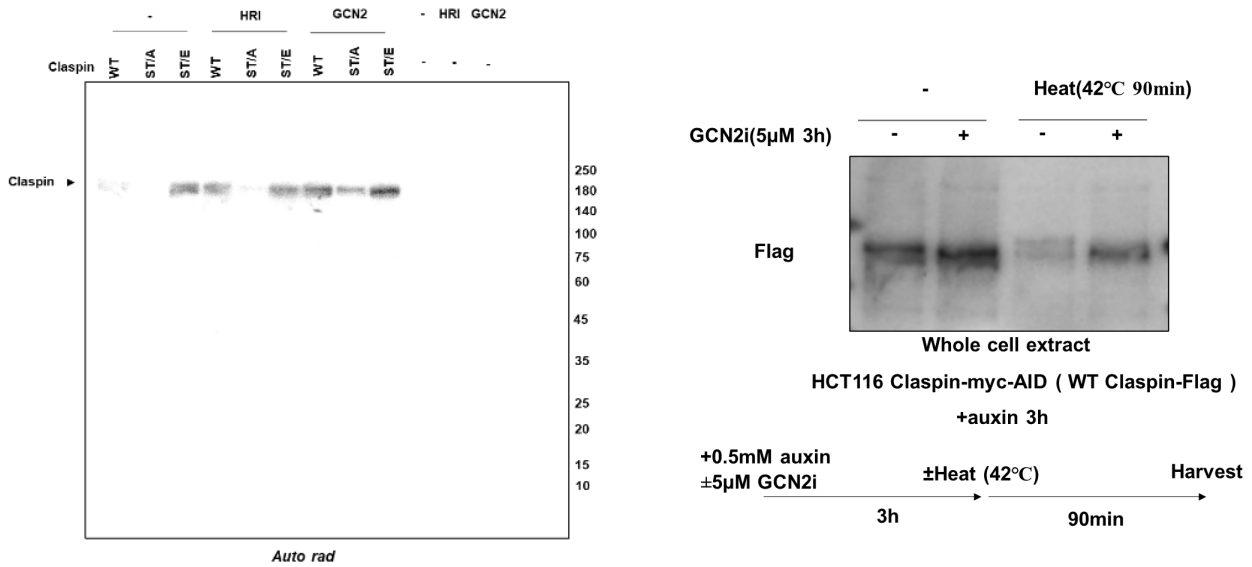
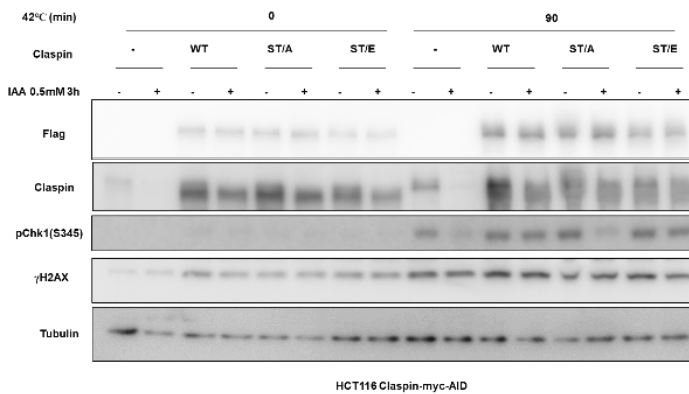


図 9 Claspin のリン酸化サイトは GCN2 と HRI によってリン酸化される。

(left) 精製した野生型または Claspin C 末端 ST 変異体 (ST/A および ST/E) と精製した HRI または GCN2 混合し、 $\gamma^{32}\text{P}$ を含むキナーゼバッファー中で反応させた。サンプルにサンプルバッファーを加えて煮沸し、SDS-PAGE に供した。CBB 染色後、ゲルをオートラジオグラフィーにかけた。

(right) 3 時間オーキシシン処理した HCT116 Claspin-myc-AID 細胞 (Claspin-Flag 安定発現) を 37°C または 42°C で 90 分培養した。全細胞抽出物を抗 Flag 抗体によるウエスタンブロットティングで分析した。

(A)



(B)

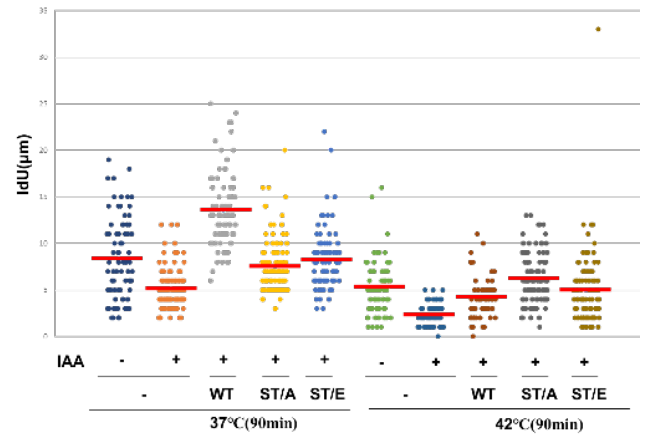


図 10A, B Claspin の C 末端リン酸化部位は熱ショックストレスの調節に関与する。

3 時間±オーキシシン処理した HCT116 Claspin-myc-AID 安定発現細胞 (非発現, 野生型 (WT), 1322-1330aa ST/A (ST/A), 1322-1330aa ST/E (ST/E)) を 42°C で 0 分または 90 分培養した。

(A) 全細胞抽出物を、示した抗体を用いたウエスタンブロットティングで分析した。

(B) DNA ファイバー法による DNA 複製の検討。ファイバーの IdU 長をグラフに示す。赤線は平均値を示す。

ns: not significant, *: p 値 ≤ 0.05 , **: p 値 ≤ 0.01 , ***: p 値 ≤ 0.001

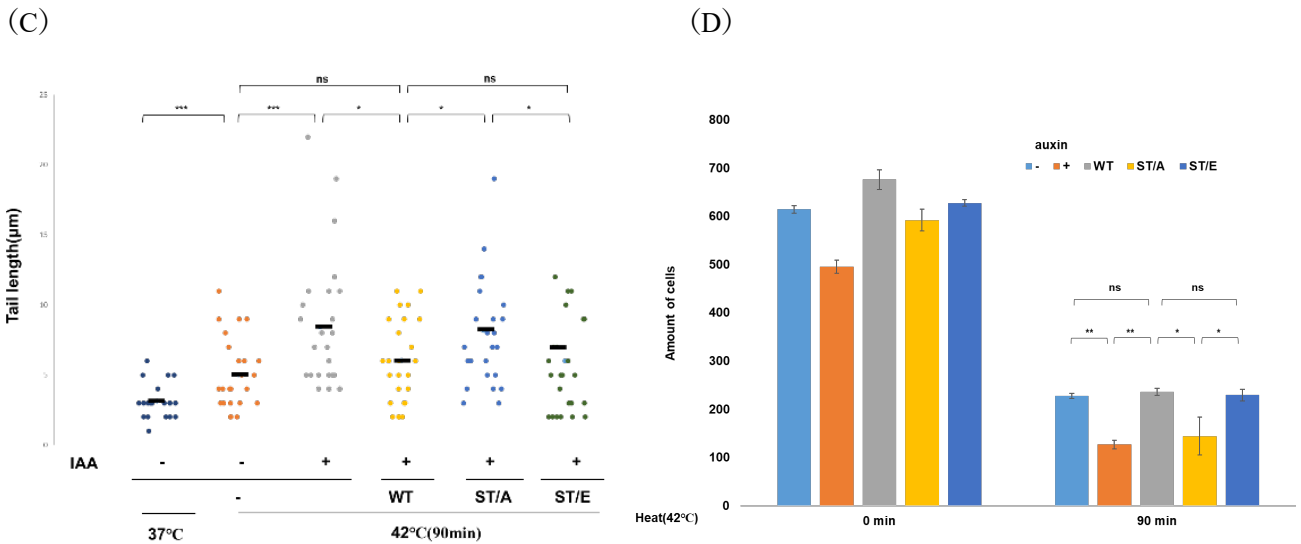


図 10C, D Claspin の C 末端リン酸化部位は熱ショックストレスの調節に関与する。
 3 時間土オーキシン処理した HCT116 Claspin-myc-AID 安定発現細胞 (非発現, 野生型 (WT), 1322-1330aa ST/A (ST/A), 1322-1330aa ST/E (ST/E)) を 42°C で 0 分または 90 分培養した。
 (C) ストレス下における Claspin 変異細胞株のコメットアッセイ。各細胞の尾の長さをグラフに示す。
 (D) ストレス下における Claspin 変異細胞株のコロニー形成アッセイ。細胞を土オーキシン含有培地に 1000 個播種し, 3 週間培養後, コロニーを CBB 染色し, 細胞数をカウントしてグラフに表示。
 ns: not significant, *: p 値 ≤ 0.05, **: p 値 ≤ 0.01, ***: p ≤ 0.001

4. 考察

細胞は様々なストレス応答経路を備えており, これらは様々な環境ストレスから細胞や生物種を保護する。その中でも, 複製ストレスは, 様々な処置によって S 期中に主に観察され, 複製フォークの進行を妨げる。以前の研究では, 「癌原性ストレス」が複製ストレスを誘発し, 癌細胞の形成を促進することが示されている。癌原性ストレスによって引き起こされた複製フォークの停止は, DNA 損傷を引き起こし, 最終的には遺伝子病変の蓄積をもたらし, 腫瘍形成を引き起こす。

4.1 生物学的ストレス, DNA 複製, Chk1 活性化, ATR-Claspin, およびその他のシグナル経路

私たちはここで, 過酸化水素 (H₂O₂), ヒートショック, 浸透圧ストレス (高塩分), および LPS, それにヒ素, 高濃度ブドウ糖, 低酸素など, 多様なストレスが Chk1 を活性化することの証拠を提供する。これらのストレスは, 一部が複製フォークを停止し, また他の部分が複製の進行を明らかに妨害しないように分類されることがある。前者は複製チェックポイントを直接活性化する可能性があるが, 後者は間接的に活性化される可能性がある。私たちは, どちらの場合も, Claspin が一般に細胞集団のウェスタン

解析において Chk1 の活性化に必要であることを示した。また, これらのシグナルによる Chk1 のリン酸化には ATR が必要である可能性があるが, 他の PIKKs が役割を果たす可能性も排除できない。注目すべきは, 私たちの結果と他の以前発表された研究との間にいくつかの不一致があることである⁽¹⁻⁷⁾。たとえば, 低酸素状態が S 相進行を著しく遅らせることを示した研究に対して, 私たちの発見である低酸素状態が複製フォークの進行を著しく妨げなかったことは, いくらか矛盾している。以前の報告によると, 低酸素処理によって RKO 細胞 (不分化の大腸癌細胞系) での DNA 複製が阻害されるという結果が得られているが, 私たちの実験においては U2OS または HCT116 の DNA ファイバーおよび FACS 解析により, 複製フォークの進行や DNA 合成に著しい影響は見られなかった。これは, 低酸素条件の違いが影響している可能性が考えられる。私たちの実験では, DNA ファイバーの分析で酸素濃度を 20 分間 0.5% に保ち, また, FACS 解析では 3 時間を行った。それに対し, 以前の報告では酸素濃度は 0.1% であり, 8 時間要されていた。そのため, 低酸素状態による DNA 複製の阻害が発生するには, 3 時間以上の低酸素状態が必要であると推測できる。

私たちの実験では、一部のストレス(HU, ヒ素, 熱, および H_2O_2)が効果的に複製フォークを停止する一方で、他のストレス(NaCl, LPS, 低酸素, および HG)は停止しない。一般的に、DNA の複製を妨げるストレスが DNA 損傷信号(γ -H2AX および pRPA32)も誘発する。以前の研究では、HeLa 細胞に 2 時間の熱処理を施したところ、有意な RPA32 のリン酸化を示す結果は得られなかった。また、私たちのウェスタンブロット解析では、熱処理後 24 時間ではリン酸化 RPA32 が検出されたが、4 時間後には検出されなかった。したがって、様々なストレスが DNA 複製と DNA 損傷に与える影響は、その強度と持続時間、および研究に使用される細胞型によって影響を受ける可能性があると言える。

4. 2 S 期中の Chk1 活性化は Claspin に依存し、G1 期では Claspin への依存が少ない

私たちは、幅広いスペクトルの細胞ストレスが Chk1 を Claspin 依存的に活性化することを示した。現在、Claspin が分子レベルでストレス誘発応答中の Chk1 の活性化にどのように関与しているのかは明確ではない。一部のストレス(ヒ素, 熱, および H_2O_2)は急激に複製フォークの進行を妨げ、これにより ATR-Claspin-Chk1 が直接的に活性化される可能性がある。他のストレスは直接的に DNA の複製を阻害しないかもしれないが、Chk1 を間接的に活性化する可能性がある。イメージングおよび FACS ベースの解析によれば、S 期中の Chk1 の活性化は Claspin に依存し、G1 期中の活性化は Claspin に比べてほとんど依存しないことが示されている。酵母では、Claspin のホモログである Mrc1 と Rad9 は、2 つのメディエーター因子であり、チェックポイントの活性化(Rad53 のリン酸化)に必要なが、両方とも Rad53 のリン酸化に作用する^(8,9)。酵母で Mrc1 は特に S 期複製チェックポイントに必要であり、Rad9 は細胞周期全体のチェックポイントを調節する。潜在的な哺乳動物の Rad9 ホモログ、53BP1 または Mdc1 の役割を評価する必要がある。一部のストレスでは、S 期中の Chk1 活性化に Claspin への依存性が低いという単一細胞解析にもかかわらず、細胞集団のウェスタン解析では、Claspin に依存した pChk1 (S345) がストレス下で圧倒的な部分であることが示されている。これは、G1 期中の Chk1 活性化のレベルが一般的に S 期で観察されるレベルよりも低いためである可能性がある。

熱ストレスは DNA の複製を強く阻害し、また、私たちの実験系では γ -H2AX 信号を誘導する。この発見から、pChk1 および γ -H2AX 信号が主に S 期中に現れると予測される。実際、DNA 複製を阻害する HU, ヒ素, または H_2O_2 は、これらの信号を主に S 期細胞で誘導する。対照的に、熱処理は Claspin に依存しない方法で 90%以上の G1 細胞でそれらを誘導する。同様に、HG は S 期細胞よりも G1 期細胞で Chk1 および γ -H2AX をより効率的に活性化する。G1 期での γ -H2AX-pChk1 の活性化は、DNA 損傷ではなく、ストレスによって誘導された染色体の構造またはエピジェノム状態の変化を反映するかもしれない。あるいは、ストレスによって誘導された異常な転写が、RNA-DNA ハイブリッドを生成し、これが DNA 損傷を引き起こす可能性がある。

以前の研究では、酵母の Claspin ホモログである Mrc1 が、酵母の異なるストレスに特異的に反応するそれぞれ異なる SAPK を介してリン酸化されることが示されている。これには、浸透圧, 熱, 酸化ストレス, および低グルコースなど、様々なストレスが含まれる^(10, 11)。哺乳動物細胞でも、様々なストレスが Claspin を異なる SAPK を介して活性化する可能性がある^(12, 13)。実際、最近の報告書では、浸透圧ストレスが活性化された SAPK p38 によって Claspin リン酸化を誘導し、ヒト細胞での損傷修復を促進したことが示されている⁽¹⁴⁾。私たちの研究では、様々なストレスに応答して Claspin が過度にリン酸化されることが示されており、異なるストレスが Claspin の異なるリン酸化を誘導する可能性が示唆されている。

私たちの研究結果は、様々な生物学的ストレスが Claspin 依存的および Claspin 非依存的な方法で Chk1 を活性化することを示している⁽¹⁵⁾。これらのストレスは、直接的に DNA 複製機構やテンプレート DNA の整合性に干渉したり、転写プロファイルや染色体状態に影響を与えたりして、最終的にはゲノム不安定性の源となる。エフェクターキナーゼ Chk1 の活性化は、複製と細胞周期の進行を調節することによって、ゲノムをストレス誘発性のレジオンから保護するために役立つかもしれない。様々な生物学的ストレスへの細胞応答と複製チェックポイント経路との相互作用に関するさらなる研究は、細胞が様々な環境ストレスに直面してゲノムの整合性をどのように維持し、ストレス

への細胞応答の失敗が発癌性につながるかについての新しい分子機構を明らかにするだろう。

5. 今後の課題

TurboID 法を用いた解析の最適化: TurboID 法による Claspin 相互作用分子の網羅的解析において、適切な対照実験を設定し、偽陽性を排除するための方法を検討する。変異体との結合解析において、変異体の安定性や機能性を確認し、結合特異性を高めるための条件検討を行う。

同定された分子の機能解析の深化: 高温ストレス応答に関与する Claspin 相互作用分子の変異体を用いた実験において、表現型解析だけではなく、詳細な分子メカニズムの解明を目指す。変異体の影響を評価する際には、細胞周期や DNA 損傷応答など、関連する細胞プロセスへの影響も合わせて解析する。

多様なストレス応答における Claspin の役割の解明: Chk1 の活性化を指標とした細胞周期の解析に加えて、Claspin のリン酸化状態や局在の変化など、他の分子マーカーも用いて、ストレス応答における Claspin の役割を多角的に評価する。DNA 合成を阻害しないストレスに対する Claspin 結合タンパク質の網羅的な解析において、ストレスの種類や時間経過に応じた変化を捉えて、より詳細な相互作用のネットワークを明らかにする。また、同定された PIKK が Claspin のリン酸化を直接制御するのか、間接的に関与するのかを検証し、Claspin 活性化の分子メカニズムを解明する。

Claspin リン酸化の機能解析: Claspin のリン酸化部位を同定するだけではなく、リン酸化のタイミングやストレス特異性も明らかにする。リン酸化に関与するキナーゼの同定後、キナーゼ阻害剤を用いた実験などにより、リン酸化とストレス応答との因果関係を検証する。

腫瘍形成におけるストレスと Claspin の役割解明: Claspin WT および KO 細胞を用いた腫瘍形成実験において、ストレスの種類や強度、暴露時間を変更し、Claspin の有無による腫瘍形成への影響を詳細に比較検討する。そのために、腫瘍形成における Claspin の役割を分子レベルで解明するため、遺伝子発現解析やシグナル伝達経路解析などの手法を組み合わせる。

研究成果の臨床応用に向けた展望: 本研究で得られた知見を基に、Claspin を標的とした癌治療法開発の可能性

を探る。Claspin の複製と修復機能を制御する化合物を探索し、その効果を細胞レベルおよび動物モデルで評価する。

6. 文献

1. Ramachandran, S.; Ma, T.S.; Griffin, J.; Ng, N.; Foskolou, I.P.; Hwang, M.-S.; Victori, P.; Cheng, W.-C.; Buffa, F.M.; Leszczynska, K.B.; et al. Hypoxia-induced SETX links replication stress with the unfolded protein response. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 3986.
2. Martin, L.; Rainey, M.; Santocanale, C.; Gardner, L.B. Hypoxic activation of ATR and the suppression of the initiation of DNA replication through cdc6 degradation. *Oncogene* **2011**, *31*, 4076–4084.
3. Pires, I.M.; Bencokova, Z.; McGurk, C.; Hammond, E.M. Exposure to acute hypoxia induces a transient DNA damage response which includes Chk1 and TLK1. *Cell Cycle* **2010**, *9*, 2502–2507.
4. Pires, I.M.; Bencokova, Z.; Milani, M.; Folkes, L.K.; Li, J.-L.; Stratford, M.R.; Harris, A.L.; Hammond, E.M. Effects of Acute versus Chronic Hypoxia on DNA Damage Responses and Genomic Instability. *Cancer Res* **2010**, *70*, 925–935.
5. Foskolou, I.P.; Jorgensen, C.; Leszczynska, K.B.; Olcina, M.M.; Tarhonskaya, H.; Haisma, B.; D'Angiolella, V.; Myers, W.K.; Domene, C.; Flashman, E.; et al. Ribonucleotide Reductase Requires Subunit Switching in Hypoxia to Maintain DNA Replication. *Mol. Cell* **2017**, *66*, 206–220.e9.
6. Ng, N.; Purshouse, K.; Foskolou, I.P.; Olcina, M.M.; Hammond, E.M. Challenges to DNA replication in hypoxic conditions. *FEBS J.* **2018**, *285*, 1563–1571.
7. Bolland, H.; Ma, T.S.; Ramlee, S.; Ramadan, K.; Hammond, E.M. Links between the unfolded protein response and the DNA damage response in hypoxia: A systematic review. *Biochem. Soc. Trans.* **2021**, *49*, 1251–1263.
8. Bacal, J.; Moriel-Carretero, M.; Pardo, B.; Barthe, A.; Sharma, S.; Chabes, A.; Lengronne, A.; Pasero, P. Mrc1 and Rad9 cooperate to regulate initiation and elongation of DNA replication in response to DNA damage. *EMBO J.* **2018**, *37*, e99319.

9. McClure, A.W.; Diffley, J.F. Rad53 checkpoint kinase regulation of DNA replication fork rate via Mrc1 phosphorylation. *eLife* **2021**, *10*, 69726.
10. Tuul, M.; Kitao, H.; Iimori, M.; Matsuoka, K.; Kiyonari, S.; Saeki, H.; Oki, E.; Morita, M.; Machara, Y. Rad9, Rad17, TopBP1 and Claspin Play Essential Roles in Heat-Induced Activation of ATR Kinase and Heat Tolerance. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e55361.
11. Duch, A.; Canal, B.; Barroso, S.I.; García-Rubio, M.; Seisenbacher, G.; Aguilera, A.; de Nadal, E.; Posas, F. Multiple signaling kinases target Mrc1 to prevent genomic instability triggered by transcription-replication conflicts. *Nat. Commun* **2018**, *9*, 379 .
12. Llopis, A.; Salvador, N.; Ercilla, A.; Guaita-Esteruelas, S.; Barrantes, I.D.B.; Gupta, J.; Gaestel, M.; Davis, R.J.; Nebreda, A.R.; Agell, N. The stress-activated protein kinases p38 α/β and JNK1/2 cooperate with Chk1 to inhibit mitotic entry upon DNA replication arrest. *Cell Cycle* **2012**, *11*, 3627–3637.
13. Canovas, B.; Nebreda, A.R. Diversity and versatility of p38 kinase signalling in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2021**, *22*, 346–366.
14. Ulsamer, A.; Martínez-Limón, A.; Bader, S.; Rodríguez-Acebes, S.; Freire, R.; Méndez, J.; de Nadal, E.; Posas, F. Regulation of Claspin by the p38 stress-activated protein kinase protects cells from DNA damage. *Cell Rep.* **2022**, *40*, 111375.
15. Hsiao H-W, Yang C-C, Masai H. Claspin-Dependent and -Independent Chk1 Activation by a Panel of Biological Stresses. *Biomolecules.* **2023**; *13*(1):125.

Research on DNA Damage Induction by Salt, Cell Response Mechanism, and Its Involvement in Carcinogenesis

Chi-Chun Yang, Hisao Masai

Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science, Genome dynamics project

Summary

Replication stress, a hallmark of cancer, can be triggered by oncogenes and various biological stresses like heat, osmotic stress, oxidative stress, and hypoxia. These stresses activate Chk1, a crucial kinase in the replication checkpoint, through Claspin.

Claspin, known for regulating DNA replication, plays a novel role in cellular stress responses. It mediates Chk1 activation in response to various stresses, some of which directly inhibit DNA replication while others activate Chk1 through replication-independent mechanisms.

The activation of Chk1 during S phase, when DNA replication occurs, is Claspin-dependent, while activation in G1 phase is mostly independent of Claspin. This suggests that Claspin primarily acts as a mediator in the DNA replication-related Chk1 activation pathway.

Interestingly, heat stress induces hyperphosphorylation of Claspin. Experiments with cells deficient in eIF2 α kinases (PERK, GCN2, PKR, and HRI) showed that GCN2 and HRI are required for Claspin-Chk1 activation and the cellular heat stress response.

Mass spectrometry identified five phosphorylation sites at the C-terminus of Claspin that are phosphorylated under heat stress. Biochemical analysis confirmed that GCN2 and HRI are responsible for this phosphorylation.

Furthermore, mutant cell lines lacking these phosphorylation sites were unable to activate the checkpoint or stop DNA replication under heat stress. These cells experienced high DNA damage and low viability, highlighting the importance of eIF2 α kinase-mediated Claspin phosphorylation in cellular survival under heat stress.

In conclusion, this study reveals new connections between the replication stress checkpoint and various biological stresses. It also uncovers Claspin's multifaceted roles, highlighting its involvement in both DNA replication and stress response pathways. The findings provide insights into the complex mechanisms of Chk1 activation and cellular response to stress, with potential implications for cancer research and therapy development.