

ATRX が関与するゲノム維持機能の分子ネットワークの解明と疾患理解への応用

## ATRX and its molecular network for the maintenance of genomic integrity

(日本分子生物学会推薦)

代表研究者 東京理科大学 定家 真人 Tokyo University of Science Mahito SADAIE

ATRX forms a complex with DAXX to remodel nucleosome structure in DNA replication-independent manner. Previous reports suggest an ATRX's role in the maintenance of genomic integrity and its inhibitory function in G-quadruplex formation. However, it remains to be known how the genome becomes unstable under the condition where ATRX lacks its function. The current study aims to unveil a molecular network surrounding ATRX. To this end, we have isolated a natural compound that inhibits the growth of cells lacking ATRX expression. Our analyses suggest that the cells lacking ATRX may upregulate the oxidase of the compound and therefore show higher sensitivity to the compound. To identify any genes that are involved in the compound sensitivity, we conducted CRISPR guide RNA (gRNA) screening and found several gRNA hits that cancel the sensitivity. We will examine how the function of the identified genes and ATRX are inter-connected to clarify a molecular network associated with ATRX in the maintenance of genomic integrity.

### 研究目的

ATRX は、クロマチンリモデリング蛋白質として知られており、ヒストン H3.3 と結合する DAXX 蛋白質と複合体を形成して、DNA 複製非依存的にヌクレオソームの構築を行う。先行研究から、ATRX はゲノム完全性の維持や、転写調節に関わることが明らかにされている。ATRX は、グアニン四重鎖 (G4) と呼ばれる、複製や転写の障害となり DNA 損傷発生の原因になりうる DNA 高次構造に結合できることから、ATRX 複合体は H3.3 を含むヌクレオソームを構築することで G4 構造を解消し、ゲノム維持や転写調節に関わると考えられている。しかし、ATRX は G4 解消活性を持たないため、ATRX が関わるゲノムの維持や転写調節の分子機構の理解は不完全である。本研究では、ゲノム完全性やクロマチン構造の維持に関わる ATRX の作用分子機構および分子ネットワークを明らかにすることを目的とする。

### 研究経過

ゲノム完全性やクロマチン構造の維持に関わる ATRX の作用分子機構を明らかにするという目的を達成するため、第一に、ATRX 欠損がん細胞に高い

特異性を持つ増殖阻害剤の作用機序の解明を行なった。本増殖阻害剤の作用機序を明らかにし、なぜ本剤が ATRX 欠損がん細胞に高い特異性を示すかを知ることで、ATRX の機能の理解につながると考えた。

染色体の末端には、テロメアと呼ばれる一定の配列 (ヒトでは TTAGGG) が繰り返した DNA と複数の蛋白質からなる複合体が存在する。テロメアは染色体末端を保護するキャップのような機能を持ち、染色体の維持に必須の構造体である。我々のほとんどの正常体細胞ではテロメア長の維持機構が抑制されていて、テロメアは細胞分裂のたびに徐々に短小化し、やがて細胞増殖を停止させる。一方で、がん細胞はテロメア維持機構を活性化させることで、テロメアの短小化を回避し無限増殖を維持する。全臨床がん症例のうち 90%はテロメア伸長酵素テロメラゼを活性化しており、残りの 10%は主にテロメア相同組換えを活性化させて (ALT: alternative lengthening of telomeres と呼ばれる) テロメア長を維持している。

比較的最近になって、ALT がんでは ATRX の欠損や機能不全が高率で認められることが明らかにされた。ATRX は、ヒストン H3.3 と結合する DAXX と

複合体を作って、DNA 複製非依存的にヘテロクロマチンへの H3.3 の取り込みを行い、テロメアやセントロメア周辺などのヘテロクロマチン維持に関わる。また、ATRX はグアニンに富む DNA 領域に局在して G4 を解消する機能をもつのではないかと考えられている。ATRX を抑制すると、テロメアのヌクレオソームや H3.3 の密度が低下したり、転写が亢進したり、G4 の蓄積と DNA 損傷が誘導されたりする。したがって、ALT がんは、ATRX の欠損を介してテロメアヘテロクロマチンを不完全にし、繰り返し DNA を露出させたり、不必要な転写を活性化させたりして、DNA 損傷を誘発し、相同組換えが起きやすい環境を作出しているのではないかと考えられている。

本研究を始めるにあたって、共同研究により、骨肉腫由来の ALT がん細胞の増殖を抑制する小分子化合物を探索することで、AusD という天然化合物を見出していた。この化合物は、細胞内で酸化されて DNA と共有結合する活性を持つようになると考えられている。我々が保有する複数の骨肉腫細胞株の AusD 感受性を調べたところ、ALT がん細胞の方が AusD に高い感受性を示すことが確認された (Figure 1)。また、AusD 処理した細胞では DNA 損傷の蓄積が認められることもわかった (Figure 2)。その後、AusD 高感受性を示す細胞と感受性の低い細胞の違いを探る過程で、AusD 高感受性と関連のある高発現遺伝子の中に、AusD の酸化酵素の候補が見出された。

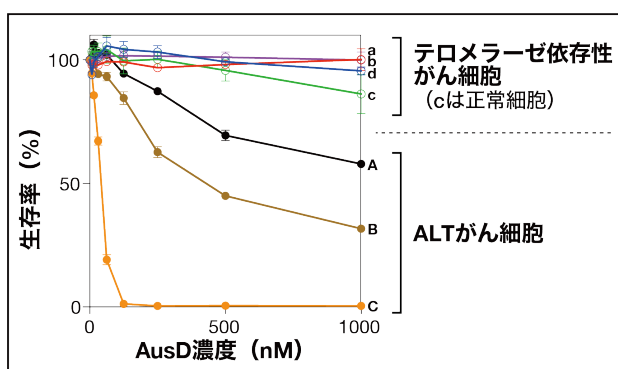


Figure 1 Osteosarcoma ALT cells show higher sensitivity to AusD.

AusD による ALT がん細胞の増殖阻害効果は、AusD の酸化酵素を阻害剤 (Figure 2)、または遺伝子ノックアウト (Figure 3) で抑制することにより減弱された。AusD による DNA 損傷の誘導も、本阻害剤

により減弱された (Figure 2)。逆に、この AusD による ALT がん細胞の増殖阻害効果は、本酸化酵素を過剰発現させることにより増強された。AusD 高感受性を示す ALT がん細胞ではこの酸化酵素の発現量が亢進していたこと、ALT がんでの欠損が高率で認められる ATRX 遺伝子の欠損細胞でもその酵素の発現量の亢進が認められたことから、骨肉腫由来の ALT がん細胞では、ATRX の欠損や機能不全により AusD 酸化酵素の発現が亢進し、AusD に対する感受性が高まっていることが示唆された。

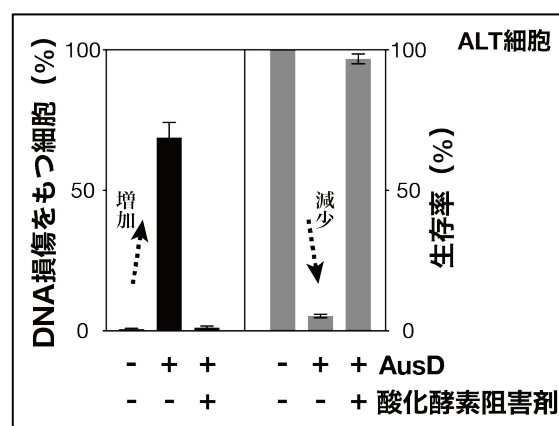


Figure 2 Inhibition of AusD oxidases cancels the growth inhibition by AusD in ALT cells.

しかし、ATRX の単独欠損細胞は、AusD に対して感受性が増強されることがわかった。このことから、ATRX の欠損や機能不全が AusD の高感受性に関わっていると仮定した場合、ATRX の機能欠損による AusD 高感受性が、別の因子がもつ機能により打ち消される可能性が考えられた。

この可能性について検証するために、ALT がん細胞が示す AusD 高感受性に関わる因子を網羅的に探索することにした。この実験では、CRISPR-Cas9 システムを利用した、ガイド RNA 発現ライブラリーのスクリーニングを行い、ALT がん細胞の AusD 高感受性を打ち消すガイド RNA の取得を目指した。このスクリーニングで得られるガイド RNA の標的は、AusD による ALT 細胞の増殖抑制に深く関わる因子 (例えば AusD を毒性のある化合物に変換する酵素) であることが期待された。

本実験では、ヒトの 19,052 遺伝子を標的としたガイド RNA (1 つの遺伝子に対して 3 つのガイド RNA

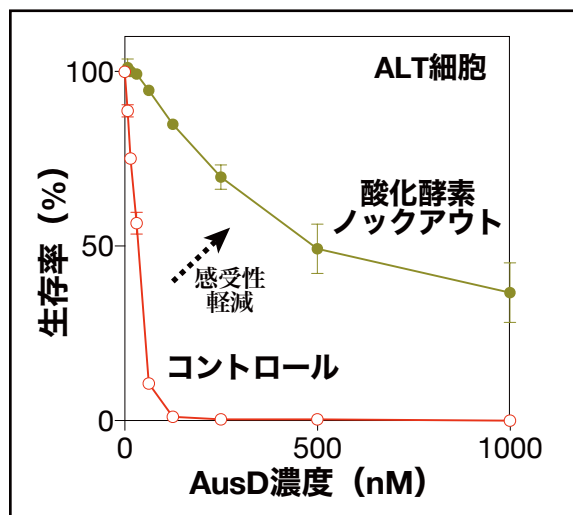


Figure 3 Knockout of AusD oxidase gene cancels the growth inhibition by AusD in ALT cells.

が設計されている) のライブラリーを用いた。Cas9 遺伝子とともにこれらのガイド RNA の遺伝子をゲノム DNA に挿入した ALT がん細胞を作製し、この細胞集団を 2 つのグループに分けた。一方のグループは AusD の存在下で 14 日間培養し、もう一方のグループは AusD を加えずに 14 日間培養した。その後、それぞれの細胞グループから、まとめてゲノム DNA を抽出し、これを鋳型として、ガイド RNA 遺伝子の部分を PCR で増幅させた。

最後に、この PCR 産物の塩基配列を次世代シーケンサーで解読し、検出されたガイド RNA 遺伝子の配列と、ライブラリーに含まれるガイド RNA 遺伝子の配列としてすでに公開されている配列を照合した。検出され同定されたガイド RNA 遺伝子について、それぞれの検出頻度を計算し、AusD で処理しない細胞グループに比べて、明らかに AusD で処理した細胞のグループで検出頻度の高かったガイド RNA を見出し、ヒットガイド RNA とした。その結果、ヒットガイド RNA の中に Figure 3 で対象にした AusD 酸化酵素を標的とするガイド RNA が含まれていたことから、本ガイド RNA スクリーニングの有効性は高いと考えられた。

STRING データベースを利用して、ヒットガイド RNA の標的遺伝子のパスウェイ解析を行ったところ、複数の経路が見出された。この中には、酸化酵素の遺伝子発現や活性調節の経路、シグナル伝達経路、転写調節に関わるクロマチン修飾酵素の経路が

含まれることがわかった。

以上のように、ATRX を欠損するがん細胞が示す AusD 高感受性の分子機構解明を通じて、ATRX が関与するゲノム維持機能の分子ネットワークの解明を行うことと並行して、遺伝学的スクリーニングによる ATRX 欠損がん細胞の増殖に必須な新規遺伝子の同定についても研究を行なった。本研究では、ATRX を欠損する細胞の増殖には関与するが、正常な ATRX をもつ細胞の増殖には影響を与えない遺伝子を探索するため、まずは ATRX 遺伝子をノックアウトした細胞の樹立を目指した。ATRX 遺伝子をノックアウトした細胞と当該遺伝子が正常である細胞を直接比較することによって、ATRX 欠損細胞の増殖に必須な新規遺伝子の同定を精度高く行えることが期待される。

本研究では、遺伝子ノックアウトの解析で汎用される HCT-116 細胞と骨肉腫細胞のそれぞれについて、CRISPR-Cas9 システムを用いて ATRX 遺伝子のノックアウト細胞を得た。ノックアウト細胞については、コロニー単離により複数のクローンを得た。これらのクローンの中から、ウエスタンブロットィングにより ATRX 蛋白質の発現が認められないものを選抜したのち (Figure 4)、ATRX 遺伝子への変異導入も確認した。このようにして ATRX 欠損細胞が得られたので、ATRX 欠損細胞の増殖に必要な遺伝子の同定を目的とした、CRISPR-Cas9 システムを用いたガイド RNA 発現ライブラリーのスクリーニングを開始した。ガイド RNA のスクリーニングと並行して、ATRX 欠損細胞の増殖を特異的に阻害する既知薬化合物のスクリーニングにも着手した。化合物のスクリーニングについては複数のヒット化合物が得られたので、ヒット同定の確認を行い、化合物の標的蛋白質の同定につなげる。

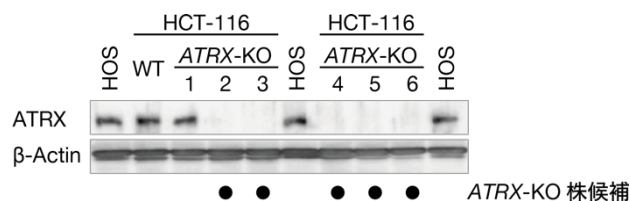


Figure 4 Isolation of the cells lacking ATRX gene.

## 考察

これまでの研究で、骨肉腫由来の ALT がん細胞では、ATR<sub>X</sub> の欠損や機能不全により AusD 酸化酵素の発現が亢進し、AusD に対する感受性が高まっていることが示唆された。しかし同時に、ATR<sub>X</sub> の欠損による不都合を解消する機構の存在も示唆された。今後さらに本研究を発展させまとめることで、ATR<sub>X</sub> が関与するゲノム維持機能の分子ネットワークの解明と疾患理解への応用につなげたい。

## 参考文献

1. Apte, M.S., and Cooper, J.P. (2017). Life and cancer without telomerase: ALT and other strategies for making sure ends (don't) meet. *Crit Rev Biochem Mol*

*Biol* 52, 57-73.

2. Clynes, D., Higgs, D.R., and Gibbons, R.J. (2013). The chromatin remodeller ATR<sub>X</sub>: a repeat offender in human disease. *Trends Biochem Sci* 38, 461-466.
3. Shay, J.W., and Wright, W.E. (2019). Telomeres and telomerase: three decades of progress. *Nat Rev Genet* 20, 299-309.

## 研究の発表

口頭発表

1. 小島由紀子、定家真人：天然化合物 AusD に高い感受性を示すがん細胞の分子遺伝学的特徴の解明. 第6回北陸エピジェネティクス研究会. 福井 (2019年10月)