

北里大学大学院理学研究科

2024 年度博士論文

ATR-PrimPol 経路は発がん性 KRAS が誘導する
ヘテロクロマチン関連性 DNA 複製ストレスへの耐性機構に関与する

五十嵐 太一 （ DS-22901 ）

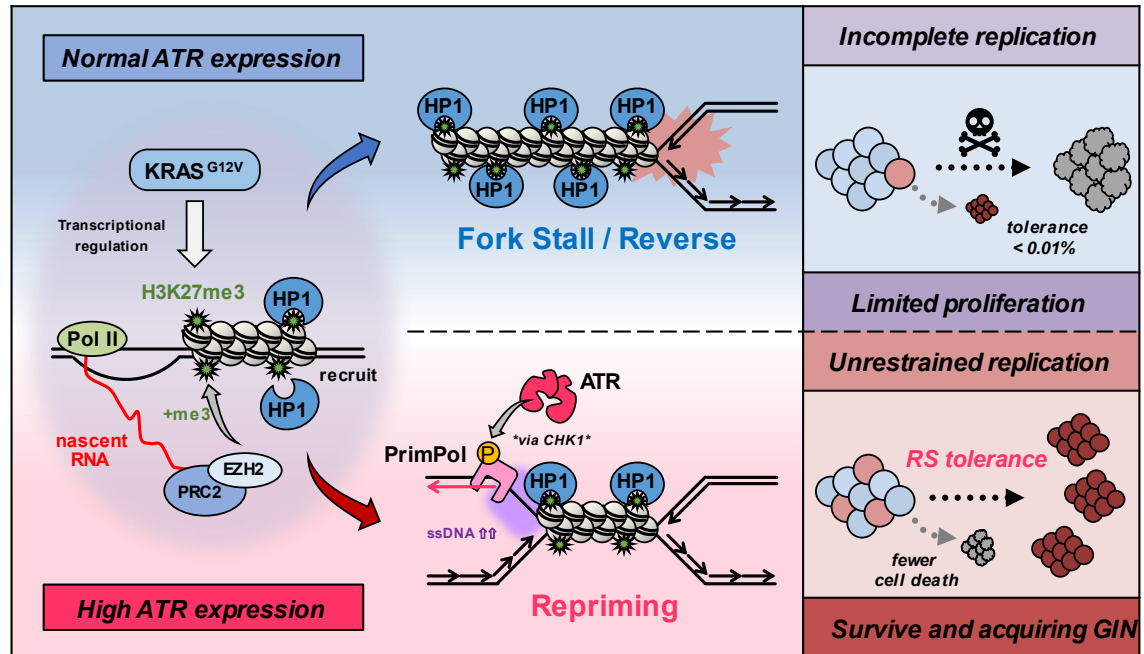
指導教授 遺伝子機能発現学 吉見 昭秀

研究指導 国立がん研究センター研究所 塩谷 文章

目次

目次.....	1
要旨.....	1
序論.....	2
がん遺伝子とがん抑制遺伝子の均衡	2
がんの特質としてのゲノム不安定性	2
複製ストレスはゲノム不安定性を促進する	3
発がん性 KRAS 遺伝子は複製ストレスの内因である	3
ATR キナーゼは複製ストレス応答に必要である.....	4
本研究の目的.....	4
結果.....	5
ATR の発現量は LUAD の予後不良に相関する.....	5
ATR の高発現は KRAS ^{G12V} 発現下の細胞生存を保証する	5
ATR の高発現は PrimPol 依存的 repriming によるフォーク速度を調節する	7
PrimPol 依存的 repriming は ATR-Chk1 経路を必要とする	9
KRAS ^{G12V} 誘導性の転写依存的クロマチン再構成が複製ストレスを誘導する.....	11
PrimPol 依存的 repriming は局所的に凝縮したクロマチン領域で起きる.....	13
ATR を高発現する細胞は KRAS ^{G12V} 発現が促進するゲノム不安定性へ適応する	15
考察.....	17
発がんにおける ATR キナーゼ依存性モジュールのもつ影響	17
複製ストレス応答における PrimPol の役割.....	17
発がん性 RAS 誘導性複製ストレスの原因	18
治療標的としての ATR-PrimPol 経路とヘテロクロマチン関連性複製ストレス	19
加齢依存的なゲノム不安定性の亢進機構解明への展望	20
略語集	22
材料と実験方法.....	22
抗体一覧	22
オリゴ配列一覧	24
実験方法	25
謝辞.....	37
参考文献.....	38
図	45

要旨



発がん性 KRAS 遺伝子の活性化は複製ストレスの原因であるが、このストレスがどのように発生し、がん細胞はどのようにこれに適応しているのか、まだ十分に理解されていない。

本論文では、形質転換していないヒト正常細胞における KRAS^{G12V} の発現誘導は、RNA 転写依存的に H3K27me3 と HP1 を伴うクロマチンの凝縮を誘導し、その結果、複製フォークの進行を妨害することで、細胞死を惹起することを示す。さらに、KRAS^{G12V} 誘導性複製ストレスに耐性を獲得した複製ストレス耐性細胞 (RSTC) の生存には、ATR 発現の上昇が必要かつ十分であることを報告する。KRAS^{G12V} 誘導性複製ストレスに応答した ATR は、Chk1 依存的にその基質部位と目される PrimPol の Ser255 のリン酸化を促進し、フォークの進行と細胞生存を可能にする repriming 機構を活性化する。しかし一方で、PrimPol 依存的な repriming によってヘテロクロマチン領域周辺に ssDNA ギャップが生じるため、ゲノム不安定性が亢進することがわかった。

これらの結果は、前がん状態の細胞が KRAS 誘導性複製ストレスを生き延び、ゲノム不安定性を蓄積しながら、クローン的に増殖することを可能にする ATR-PrimPol の新たな役割を明らかにした。

序論

がん遺伝子とがん抑制遺伝子の均衡

がんを取り巻く様々な研究が、過去 100 年間に於いて活発になされてきた。特に、20 世紀初頭に始まる腫瘍ウイルスの研究は、細胞の形質転換ひいては腫瘍形成を促進する遺伝子（がん遺伝子）の前駆体（原がん遺伝子）が正常細胞にも潜在している、というアイデアをもたらした。腫瘍ウイルスの感染だけでなく、がん原遺伝子の活性化変異（がん遺伝子の獲得）が内因的にがん化を促進する可能性を提示した。だが、ゲノムの変異は多くの場合は不利な形質であるため、ある遺伝子を変異によって活性化するよりも、不活化の方が容易である。こうした指摘は、がん抑制遺伝子（tumor suppressor gene : TSG）の存在と、その機能不全もがんの一因となりうることを示唆した[1]。

現在、正常細胞における TSG の機能は、がん原遺伝子が促進する細胞増殖シグナルのような正のシグナルを、適切な限度内に保つ負の制御因子として理解されている。すなわち、多段階的な TSG への不活化変異または、がん原遺伝子の活性化変異がこの調節バランスを不安定化させた結果として、細胞のがん化が進行すると考えられる[2]。

がんの起源をある遺伝子の変異と、活性バランスの調節不全に求めるこうした見解は mutator hypothesis として知られている。この説は、家族性（遺伝性）がんの遺伝と発症の過程を明快に説明するように思われた[3]。

では、遺伝的要素とは独立して発症する散発性がんはどのような起源をもつのだろうか？この問いに対して、21 世紀以降に活発に行われている high-throughput sequencing によるゲノム解析が新たな見解を示した。

がんの特質としてのゲノム不安定性

1994 年に同定された BRCA1 遺伝子は、その不活化変異が家族性乳がんに関与することが判明した。だが、2006 年と 2007 年に報告された Vogelstein による 35 例の散発性の乳がんのゲノム解析からは、わずか 2 例の BRCA1 変異体しか検出されなかった。同様の傾向は、BRCA2 やその他の DNA 修復遺伝子においても観察されただけでなく、大腸がんや肺がんなどの他臓器においても顕著な TSG の不活化変異は発見されなかったのである。

2010 年に発表された Halazonetis によるこれらの解析結果の総括は、散発性がんの原因を家族性がんと同じく、ある遺伝子の変異のみでは説明しきれないというものであった[4]。

同上の総括では、家族性がんと散発性がんの双方に見られる特徴であるゲノム不安定性に注目している。ゲノム不安定性とは、がん原遺伝子の活性化変異や TSG の不活化変異を引き起こす可能性がある DNA の構造異常や、機能的には中立的な変異を含む脆弱性の総称である[5]。Halazonetis の新たに提示したモデルは、mutator hypothesis にそぐわない TSG の

不活化が低頻度の散発性がんにおいても、ゲノム不安定性を指標とすることで、それらの細胞が家族性がんと同様の特徴を獲得する背景を説明した。

複製ストレスはゲノム不安定性を促進する

では、内在的にゲノム不安定性を促進しうる原因はなんだろうか？

Vogelstein の 2015 年の総括では、DNA 複製（細胞分裂）の回数が多い細胞ほど、発がんのリスクが高いことについて議論されている[6]。偶発的な DNA 複製の失敗、すなわち DNA 複製中のストレスがゲノム不安定性を亢進させるとする彼の bad luck model は、散発性がんの発生機序解明に新たな切り口を提示した。このような、DNA 複製の生理的調節不全は広義に「複製ストレス（replication stress : RS）」と呼称されている。

散発性がんにおける RS の原因として、がん遺伝子の発現が想定される。腫瘍形成の初期段階において、がん遺伝子のような細胞増殖を促進する遺伝子がひとたび発現すると、細胞の恒常性を混乱させてストレスを引き起こし、ゲノム不安定性を加速度的に促進させることが、数多くの研究から示されてきたからである[7]。このような RS を抱える細胞の大部分は DNA 複製を完了させることができず、発がんバリアの一環としてプログラムされた細胞死や細胞老化により集団から排除されていく[8]。しかし、少数の細胞群はこのバリアを突破し、クローン的に増殖を続け、がんの祖型となると考えられる[9]。

これらの知見は、がん遺伝子発現に伴う RS の発生と、それに対する適応及び、ゲノム不安定性の亢進が、発癌の初期過程においてどのように並行して調節されるのかという疑問を提起した。

発がん性 KRAS 遺伝子は複製ストレスの内因である

ヒトのがんで頻繁に変異が発見される上位 20 遺伝子のうち半分以上は、細胞増殖の促進機構に関与するがん遺伝子としての側面を持つ。KRAS はヒトのがんにおいて頻繁に発がん性変異が検出されるがん原遺伝子の一つであり、多くの腫瘍の初期発生過程に関与すると考えられている。発がん性 KRAS によってドライブされた肺腺がんの予後は非常に悪く、年間の死亡者の割合は突出しており[10]、本邦においても、肺腺癌の約 10%において発がん性 KRAS が認められるため、重要な研究対象である[11]。

KRAS の発がん性変異は、12 番目グリシン (G12) 及び 13 番目グリシン (G13) , 61 番目のグルタミン (Q61) が他のアミノ酸に置換される場合がほとんどを占めており、ホットスポットとして知られている[12]。特に G12 の変異が臨床では頻繁に検出されるため、その KRAS^{G12mut} タンパク質に対する分子標的薬の開発も目覚ましい[10]。これらの変異が下流の RAS シグナル伝達カスケードの恒常的な活性化を引き起こし、正常な増殖抑制機構の喪失や、細胞恒常性の生理的調節不全を誘導する[13]。その結果、発がん性 KRAS をもつ細胞は、RS のようなストレスに暴露されやすくなると考えられる。

先行研究にて、正常繊維芽細胞で発がん性 HRAS を過剰発現させると、RNA 合成が増加し、DNA:RNA がアニールした異常構造である R-loop を伴う transcription-replication conflict (TRC) を頻発させ、フォークの進行を阻害して RS を引き起こすことが報告された[7], [14].

しかしながら、ヒトの発がんにおいて頻繁に見られる、発がん性 KRAS 変異体を発現している正常ヒト上皮細胞で、フォーク進行を阻害する障害の実態は完全には解明されておらず、前述と同様のメカニズムが働いているのかも不明である。

ATR キナーゼは複製ストレス応答に必要である

RS の主要応答因子である Ataxia Telangiectasia and Rad3-related kinase (ATR) と、その重要な基質である Checkpoint Kinase 1 (Chk1) は、薬剤・放射線などの急性的ストレスに応答して細胞周期のチェックポイントを制御し、その基質リン酸化を介して DNA 修復を促進する[15][16]. そのため、ATR と Chk1 は長い間、腫瘍抑制因子と考えられてきた[17]–[19]. しかし、最近の研究では、ATR と Chk1 が腫瘍形成時の発がん性 RAS 発現後の細胞生存に必要であることが示されており、持続的ながん遺伝子活性化に応答する ATR-Chk1 経路が、有害で慢性的な RS から細胞を保護し、RS 耐性 (replication stress tolerance : RST) を促進していることが示唆されている[20], [21].

ヒト細胞における RST 機構として、停止したフォークの周辺における DNA 合成の再プライミング (repriming) が、近年注目されている[22], [23]. ヒトの primase-polymerase (PrimPol) は、RS 応答において repriming を担う主要な酵素であるが、リーディング鎖での DNA 不連続合成を促進し、一本鎖 DNA (ssDNA) の露出を惹起する側面を持つ[24]–[27]. この ssDNA 露出に伴うゲノム不安定性の亢進を防ぐために、PrimPol は DNA 複製中に厳密に制御される必要があるが[27], [28], その制御機構は未だ不明である。

がん遺伝子によって誘導される慢性的な RS から細胞を保護する ATR の機構と、repriming を制御する PrimPol の潜在的な役割を踏まえ、ATR がどのように発がん初期過程における RST を制御し、その進展にどのような影響を与えるのかを理解する必要がある。

本研究の目的

上述のように、ATR の活性には薬剤・放射線などの急性的ストレスと、がん遺伝子発現などの慢性的ストレスへの応答に対して、二面性が認められる。では、多くのヒト上皮細胞由来のがんにおいて認められる、発がん性 KRAS 発現に伴う散発性の発がん、そのゲノム不安定性の亢進に、ATR はどのように関与するのだろうか。

これを検証するために私は、ATR はどのように KRAS^{G12V} 誘導性複製ストレスに応答し、ゲノム不安定性を惹起するのか、また、KRAS^{G12V} が誘導する複製ストレスの実体はどのようなものかを調査した。ここから、ATR による複製ストレス応答がどのようにゲノムの不安定性を促進して発がんに寄与するのか、分子生物学的な観点から議論する。

結果

ATR の発現量は LUAD の予後不良に相関する

ATR-Chk1 経路は、発がん性 RAS 発現による初期発がん過程の細胞生存に必要であり、マウスモデルでは ATR 発現抑制がその進展を抑制する[20]. しかし、この経路が発がん性 KRAS 誘導性 RS を伴うヒト肺腺がん (LUAD) の表現型にどのように影響するのかは、ほとんどわかっていない. ATR の過剰発現が発がん性 KRAS をもつ腫瘍に与える影響を検証するため、米国 The Cancer Genome Atlas (TCGA) の LUAD 患者コホートに注目し、ATR の発現量が全生存期間 (OS) に影響を及ぼすかどうか調査した.

驚くべきことに、KRAS 変異型腫瘍群において、ATR の発現量が高い症例 (KRAS 変異型患者群の 55.4%, LUAD コホート全体の 17.4%) は、ATR の発現量が低い症例よりも OS 率が有意に低かった (Fig. 1). この差は KRAS 野生型患者群では見られなかったことから、発がん性 KRAS を伴う LUAD に特異的な形質と考えられる. 統計学的に有意ではなかったが、同様の傾向は膵臓腺がん (PAAD) と結腸腺がん (COAD) でも観察された (Fig. 2). 興味深いことに、全腫瘍を対象としたコホート解析では、KRAS 変異型患者群のうち ATR 高発現の患者 (389/907, 42.9%) は、ATR 低発現の患者よりも OS 率が有意に低いことが示された (Fig. 3).

以上の結果は、RS に暴露されて遺伝毒性が増強されているにもかかわらず、ATR の高発現が KRAS 変異型腫瘍の細胞生存と進展を促進することで、がんの悪性化を招き、OS 率の低下に関連する有害な表現型を引き起こしていることを示唆する.

ATR の高発現は KRAS^{G12V} 発現下の細胞生存を保証する

上皮細胞に発がん性 KRAS が発現した場合の RS 応答機構を調べるために、h-TERT, CyclinD1, および細胞老化を制御する p16INK4A との結合/活性化機能を喪失した CDK4^{R24C} 変異体を導入して不死化した小気道上皮細胞 (small airway epithelial cell: SAEC) を利用した. この不死化/不老化 SAEC は肺分化マーカーを発現し、機能的 TP53 を有することから、初代培養 SAEC の特徴を保持していることが確認されている[29]. ここから、KRAS^{G12V} を 4-hydroxytamoxifen (4OHT) で誘導発現可能な SAEC (以下コントロール細胞と表記) を、レトロウイルスを用いて樹立した (Fig. 4, 5).

KRAS^{G12V} を発現したコントロール細胞の大部分で、マクロピノサイトーシスが誘導され、細胞質には大型の液胞が蓄積し、それに伴ってカスパーゼ非依存的な methuosis と呼ばれる細胞死が起こった (Fig. 4, 6, 7) [30]. しかし、少数の細胞は生き残り、ゆっくりと増殖した (Fig. 8). 興味深いことに、ATR の発現が 14 日目に顕著に増加し始めることがわかった. この過程では Chk1 リン酸化をバロメータとする ATR-Chk1 経路の活性化はほとんど観察

されず、28 日目まで ATR の発現量は基準値より相対的に高いままであった (Fig. 9) . 最大 35 日間の平面培養後、KRAS^{G12V} を発現するコントロール細胞は、限定的なコロニー数ではあるが、足場非依存性増殖の有意な向上を示した (Fig. 10) . これらの個々のクローンを単離し、RS 耐性細胞 (replication stress tolerant cell : RSTC) と名付け、以降の解析対象とした (Fig. 11) . これらの細胞は、クローン進化の過程における発がん性ドライバー遺伝子をもつ前がん状態の細胞を模倣していると思われる [9].

興味深いことに、すべてのクローン (RSTC#2, #5, #7) で、コントロール細胞と比較して、ATR タンパク質の高発現が誘導され (Fig.12) , ATR mRNA 発現も 2 倍以上増加した (Fig. 13) . 最近の研究では、発がん性 KRAS が全体的な miRNA のダウンレギュレーションを引き起こし、RNA 転写量を活性化することで肺の発がんを誘導すること [31], および miR-185 が ATR mRNA の 3'非翻訳領域 (3'-UTR) に結合し、RNA 転写後制御によって ATR 発現を抑制することが報告されている [32]. ここから、KRAS^{G12V} 発現に伴う miRNA 制御の変化によって、ATR mRNA 発現が上昇している可能性を検証した. すべての RSTC で miR185 発現が減少していたことから、ATR 発現の増加は、miR185 のダウンレギュレーションに部分的に依存すると考えられる (Fig. 14) . 他にも、全ゲノム配列解析 (WGS) により、ATR 遺伝子がコードされる Chr3 のコピー数が RSTC において増加していることが明らかになった (Fig. 15) . さらに、S 期細胞の割合がほぼ同じであるにもかかわらず、RSTC では ATR タンパク質が高発現し、その半減期が長くなっていたことから、タンパク質の安定性も ATR 高発現に少なからず関与していると考えられる (Fig. 16, 17) . CDK 阻害剤 (Roscovitine : Rosc.) 処理による細胞周期の停止は、RSTC における ATR タンパク質の発現量を低下させたが、Rosc.未処理のコントロール細胞と同程度のレベルに維持されたことから (Fig. 18) , 細胞周期非依存的な発現制御も関与すると示唆された. このような多岐にわたる ATR 高発現維持のメカニズムは、KRAS^{G12V} 誘導の解除後の RSTC における不可逆的な ATR の高発現維持に寄与していると考えられる (Fig. 19) .

次に、SAEC における ATR の強制発現が KRAS^{G12V} 発現下での細胞生存を促進するかを検証するため、ATR を恒常的に高発現する SAEC 細胞 (以下、ATR-1 および ATR-2 細胞とする) をレンチウイルスで樹立した (Fig. 20) . KRAS^{G12V} を発現している ATR-1/-2 細胞は、コントロール細胞よりも多くの足場非依存性コロニーを形成した (Fig. 21) . また、KRAS^{G12V} 発現直後の細胞死も、ATR 高発現により回復することを確認した (Fig. 22) .

さらに、KRAS^{G12V} 発現は、平面培養 (Fig. 23) および単離した RSTC (Fig. 24) において、E-cadherin 発現の減少および Vimentin 発現の増加といった上皮間葉転移 (EMT) 様の表現型を誘導したことから、KRAS^{G12V} 発現後の細胞生存および足場非依存性増殖には EMT が必要なことが示唆された. だが、KRAS^{G12V} を発現していない ATR-1 細胞も EMT 様の表現型を示すものの、コロニー形成の亢進は示さなかったことから (Fig. 24) , EMT 様の表現型は足場非依存性増殖の促進には十分ではないことが示唆される.

これらの結果を総合し, SAEC における ATR の高発現は, 発がん性 KRAS^{G12V} の致死的作用を寛容し, RSTC の進展を促進するのに必要かつ十分であることが示された.

ATR の高発現は PrimPol 依存的 repriming によるフォーク速度を調節する

KRAS^{G12V} 誘導性の急性的および慢性的 RS に暴露された細胞の生存を, ATR がどのように維持するのかを明らかにするため, DNA fiber 法を用いてフォークの進行を可視化した (Fig. 25) . 本手法は, 5-iodo-2'-deoxyuridine (IdU) に引き続いて 5-chloro-2'-deoxyuridine (CldU) で細胞を一過的に処理し, 複製中の新生鎖 DNA に取り込まれたチミジンアナログを HCl による変性プロトコルで免疫染色することで可視化し, その軌跡から単位時間あたりの進行距離 (kbp) または速度 (kbp/min) を測定するものである [33], [34]. KRAS^{G12V} 発現を 3 日間誘導した後に DNA fiber 法を行ったところ, KRAS^{G12V} の発現はコントロール細胞のファイバーの長さを著しく短縮させた (Fig. 25, 26) [14]. 一方で, KRAS^{G12V} 発現によりフォークの減速を伴うコントロール細胞でも, フォークの対称性には顕著な差異が観察されなかった (Fig. 27) .

RS は Replication protein A (RPA) で覆われた ssDNA を, 停滞中のフォーク, または DNA 複製後の娘鎖へ蓄積させる可能性がある. これを評価するため, ゲノム DNA 内に取り込まれた 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) を非変性プロトコルによって検出し [26], ssDNA の露出を解析した. すると, KRAS^{G12V} 誘導 3 日後に, 露出した ssDNA が微弱ながらも有意に増加することがわかった (Fig. 28) . クロマチン結合 RPA32 のレベルは顕著には増加しなかったものの, RPA32 の Ser33 リン酸化レベルは KRAS^{G12V} 誘導後 3 日目に増加し, Ser4/Ser8 リン酸化は KRAS^{G12V} 誘導後 7 日目に増加した (Fig. 29, 30) . KRAS^{G12V} はフォークを減速させるか, 停止させることによって RS を誘導するが, RPA リン酸化の解析から, フォークを急性的に崩壊させるほど十分ではないと考えられる. そのため, γ H2AX レベルはほとんど変化を認めなかった (Fig. 31) . 慢性的にストレスのかかったフォークが時間の経過とともに徐々に崩壊すると, 細胞死の原因となる可能性がある.

これとは対照的に, ATR-1/-2 細胞において, ATR 高発現自体は正常なフォーク速度には影響しない一方で, KRAS^{G12V} 発現下でのフォークの減速を回避した (Fig. 25, 26) . また, コントロール細胞と同様に, フォークの対称性には顕著な差異が観察されなかった (Fig. 27) .

ATR キナーゼ活性が KRAS^{G12V} 発現下でのフォークの進行に必要なかを検証するために, ATR 阻害剤 (ATRi : Berzosertib) を処理した. 高濃度の ATRi を短期間使用すると, 予定外の複製起点活性化 (origin firing) を誘導し, フォーク速度が低下するため [35], [36], 以下の解析では, 正常な細胞周期とフォークの進行に影響を与えない低濃度の ATRi (1 nM) を使用した. 1 nM の ATRi で 24 時間処理したところ, KRAS^{G12V} 非発現 ATR-1 細胞の ATR 発現量に影響はなく (Fig. 32) , フォーク進行も阻害されなかった (Fig. 33) . しかし, KRAS^{G12V} 発現下では特異的にフォーク速度が低下したことから, KRAS^{G12V} を発現する ATR-1 細胞では, ATR キナーゼ活性がフォークの減速回避に必要であることが示唆された

(Fig. 33) .

これらの結果は, KRAS^{G12V} が誘導する急性的な RS に応答して DNA 複製を継続するためには, ATR タンパク質発現の増加と, そのキナーゼ活性が必要であることを示している.

最近の研究で, DNA 損傷耐性 (DNA damage tolerance : DDT) 機構によって, 細胞がフォークの停止を回避し, DNA 複製中の障害を寛容することが示されている [27]. DDT 機構には, DNA 損傷乗り越え合成 (trans lesion synthesis : TLS), 鋳型交換 (template switch : TS), 再プライミング (repriming) などの機構が含まれる. プライマーゼとポリメラーゼの両方の活性を持つ PrimPol は, 哺乳類細胞における repriming を司る酵素として注目されている [22], [23]. PrimPol が制御する repriming は DNA 複製を不連続にし, 複製されなかった ssDNA ギャップは TLS か TS によって DNA 複製後から G2/M 期にかけて埋められる [24]–[26].

Repriming が ATR-1 細胞におけるフォークの減速回避に関与しているかどうかを調べるため, S1 ヌクレアーゼ処理と組み合わせた改良型 DNA fiber 法を行った [37]. IdU および CldU 標識後, 細胞を透過処理し, S1 ヌクレアーゼで処理した. DNA 複製中に ssDNA ギャップが形成されると, ssDNA 領域が S1 ヌクレアーゼによって切断され, より短いファイバーが生成される (Fig. 34) . 実験では, KRAS^{G12V} 非発現の細胞でファイバーを切断しないことを確認した 10 U/ml の S1 ヌクレアーゼを用いた (Fig. 35) . KRAS^{G12V} を発現しているコントロール細胞では, すでに短縮したファイバーは S1 ヌクレアーゼ処理に非感受だったが, KRAS^{G12V} 発現下でフォーク速度の減速を回避している ATR-1 細胞では, ファイバーは S1 ヌクレアーゼ処理に感受性を示した (Fig. 35) .

次に, ssDNA への RPA32 の結合を蛍光免疫染色により解析し, ssDNA ギャップの生成を評価した. クロマチンに結合した RPA32 のレベルは, KRAS^{G12V} の発現の有無にかかわらず, ATR-1 細胞では細胞周期を通じて同程度であった. ここから, クロマチン結合 RPA32 のレベルは, 複製ゲノム中に露出した ssDNA のため, repriming 依存的な ssDNA ギャップを評価するバロメータとしては不適であることが示唆された (Fig. 36) . 一方で, ATR-1 細胞で KRAS^{G12V} が誘導されると, RPA32 の Ser33 リン酸化レベルが有意に増加した. この結果は, KRAS^{G12V} 誘導性 RS が ATR を活性化して repriming を可能にし, それによって生じた ssDNA ギャップが ATR の活性化をもたらすという正のフィードバック機構を示唆している (Fig. 36) . これらの結果から, KRAS^{G12V} 発現 ATR-1 細胞では, PrimPol を介した repriming に依存して, リン酸化 RPA32 で覆われた ssDNA ギャップが蓄積することが示唆される.

また, KRAS^{G12V} を誘導した ATR-1 細胞で PrimPol をノックダウンすると, ファイバーはコントロール細胞と同様の長さまで短くなるため, PrimPol がフォーク速度の維持に必要であることが分かった (Fig. 37-39) . ノックダウンにより PrimPol を消失した KRAS^{G12V} 発現 ATR-1 細胞では, KRAS^{G12V} 発現コントロール細胞と同様に, フォークの減速や逆転が起き

ている可能性がある (Fig. 38) . 重要なことは、これらの短縮したファイバーは S1 ヌクレアーゼ処理にはもはや感受性がないことから、ATR-1 細胞における KRAS^{G12V} 発現が誘導する ssDNA ギャップ蓄積は PrimPol が担うことが明らかとなった点である (Fig. 39) .

同様の観察結果 (ATR を高発現する細胞では、KRAS^{G12V} 誘導性 RS に応答して PrimPol 依存的にフォークの進行を維持する) は、h-TERT を導入して不死化したヒト網膜色素上皮細胞 (Retinal pigment epithelial cell : RPE) でも得られた (Fig. 40-43) . これらの結果は、RS 応答性 repriming が SAEC における CDK4 変異体と CyclinD1 の導入に起因するものではないことを示唆している.

次に、慢性的な KRAS^{G12V} 誘導性 RS に適応した RSTC におけるフォークの進行を解析した (Fig. 6-12) . 4-OHT の持続的処理により KRAS^{G12V} は恒常的に発現していたが (Fig. 12) , そのフォーク速度は KRAS^{G12V} 非発現のコントロール細胞のそれと同程度にまで回復していた (Fig. 44) . また、KRAS^{G12V} を発現した ATR-1 細胞と同様に、RSTC のフォークの対称性にも影響は見られなかった (Fig. 27, 45) . 注目すべきは、PrimPol mRNA 発現がすべての RSTC で増加傾向にあり (Fig. 46) , PrimPol の消失は RSTC のフォーク速度を低下させたことである (Fig. 44) . ここから、PrimPol は慢性的な RS への耐性獲得後のフォーク速度維持にも必要であることが示唆された.

これらの結果は、ATR が PrimPol 依存的な repriming を促進してフォーク速度を維持し、それによって KRAS^{G12V} 誘導性の急性的および慢性的な RS に対する耐性獲得に寄与していることを強く示唆する (Fig. 47) .

PrimPol 依存的 repriming は ATR-Chk1 経路を必要とする

PrimPol が ATR-1 細胞における repriming に関与しているかどうかを評価するために、myc-tag 標識 PrimPol タンパク質の C 末端 Zinc-finger ドメインに C419G/H426Y 変異を導入し (以降 CH 変異体とする) [38], そのプライマーゼ活性を欠損した cDNA 配列を作成した (myc-PrimPol^{CH}) . レンチウイルスを用いて、myc-PrimPol^{WT} または myc-PrimPol^{CH} を Doxycyclin (Dox) で発現誘導が可能な細胞を樹立した (Fig. 48) .

PrimPol の非翻訳領域 (untranslated region : UTR) を標的とする siRNA (siPPol#4) により内在性 PrimPol を消失させた ATR 細胞 (Fig. 49) では、前述の結果と同じく、フォーク速度が減速した (Fig. 50, 38, 39) . ここに myc-PrimPol^{WT} を誘導すると、フォーク速度の減速は回復したが、この効果は myc-PrimPol^{CH} 変異体の発現では観察されなかったことから、ATR-1 細胞での repriming には PrimPol のプライマーゼ活性が必要であることが判明した (Fig. 50) .

興味深いことに、コントロール細胞でも、myc-PrimPol^{WT} の高発現は、KRAS^{G12V} 誘導性 RS に応答して ATR キナーゼ依存的にフォーク速度の減速を十分に回避する (Fig. 51, 52) .

ATRi 処理は, KRAS^{G12V} 発現下での myc-PrimPol^{WT} の発現量や, そのクロマチンへのリクルートには影響を与えなかったことから (Fig. 51, 53), ATR キナーゼ活性は, PrimPol 発現制御に加えて[37], PrimPol 依存性 repriming のレギュレーターとして重要であることが示唆された. さらに, KRAS^{G12V} を発現していないコントロール細胞では, myc-PrimPol^{WT} の高発現自体はフォークの加速を引き起こさなかったことから, PrimPol を介した repriming は RS の存在下でのみ活性化されることが示唆された (Fig. 52) .

次に, ATR キナーゼのカスケードが PrimPol の制御に関与している可能性を評価するために, Chk1 の Ser345 リン酸化を解析した. Chk1 の Ser345 リン酸化は, コントロール細胞では 1 日目にのみ検出され, 2 日目以降はほぼ完全に消失した. 対して, ATR-1 細胞では 2 日目までシグナルが継続して検出された (Fig. 54) . これに関連して, 高濃度 (1 μ M) の ATRi で短時間処理すると, 予定外の複製起点活性化 (origin firing) が起こり, KRAS^{G12V} を発現していないコントロール細胞と ATR-1 細胞の両方でフォーク速度が減速したが, ATR-1 細胞における PrimPol 依存性の repriming を介したフォーク速度はこの影響を受けなかった (Fig. 55) . これらの結果は, KRAS^{G12V} 誘導性 RS に応答した repriming の開始に, ATR を介した Chk1 の長期間の活性化に関与している可能性を示唆している^{注1}.

さらに, KRAS^{G12V} を発現している ATR-1 細胞を 1 nM の Chk1 阻害剤 (Chk1i: Rabusertib) で処理すると, 1 nM の ATRi 処理と同程度までフォーク速度が減速した (Fig. 56) . RSTC では, これらの阻害剤も PrimPol を消失させた細胞 (Fig. 44) と同程度にフォーク速度が減速した (Fig. 57) . 一方で, Chk1 のリン酸化について, 同じ条件下でこれらの阻害剤は RSTC における Chk1 の Ser345 または Ser317 のリン酸化レベルを変化させなかった (Fig. 58) . このことは, 低濃度の薬剤による非常に弱い ATR 阻害と Chk1 阻害でも, PrimPol 依存性の repriming を抑制するのに十分であることを示唆している. 重要なことに, ATRi と Chk1i を同時に投与してもフォークの進行はそれ以上抑制されなかったことから, ATR と Chk1 は同軸経路で PrimPol 依存性 repriming を制御していることが示された (Fig. 56, 57) . 加えて, ATRi と Chk1i の両方が, 濃度依存的に RSTC の足場非依存性コロニーの再形成を阻害したことから, ATR と Chk1 の両方の活性が, RSTC のフォーク進行と足場非依存性増殖の維持に必要であることが示唆された (Fig. 59) .

次に, RS に応答した ATR-Chk1 経路の活性化に応じて PrimPol がリン酸化されるかどうか

^{注1} 加えて, repriming 機構が活性化している細胞では origin firing が抑制されている可能性について補足する. PrimPol 依存的な repriming が十分に機能しない場合, origin firing が DNA 複製を完了させるバックアップとして機能すると考えられている [79]. Repriming と origin firing は相互排他的な制御関係にあると考えられるが, その分子生物学的な相互作用機構は未だ不明である.

かを調べるため、KRAS^{G12V} 発現 ATR-1 細胞から精製した myc-PrimPol^{WT} を質量分析法 (LC-MS/MS) で分析した (Fig. 60) . KRAS^{G12V} 誘導性 RS に応答し, PrimPol の Ser26, Ser33, Ser255 がリン酸化され, Ser207 とおそらく Ser489 と Ser499 では脱リン酸化された (Fig. 61) . Ser255 は archaeal eukaryotic primase (AEP) モチーフ II と III にまたがる非構造配列の基部にあり, 他の研究によって活性との関与が示唆されていることから [39], [40], このリン酸化部位に注目した (Fig. 62) . Ser255 リン酸化が PrimPol の活性化に関与しているかどうかを調べるために, リン酸化されない S255A 変異体とリン酸化を模倣した S255D 変異体の cDNA 配列を作製し, レンチウイルスを用いて Dox 誘導性細胞を樹立した (Fig. 63) . PrimPol^{WT} とは異なり, PrimPol^{S255A} は KRAS^{G12V} 誘導性 RS 下でのフォークの減速を回復させなかったが, PrimPol^{S255D} は効率的に回復させた. さらに, PrimPol^{S255D} が介在するフォーク速度は, もはや ATRi 感受性ではなかったことから, PrimPol の Ser255 でのリン酸化は, その repriming 活性にとって重要であることが示唆された (Fig. 64) .

以上より, KRAS^{G12V} によって誘導された RS は, PrimPol の Ser255 でのリン酸化を誘導し, ATR-Chk1 制御下で PrimPol 依存的なフォーク進行を維持する repriming を促進すると分かった.

KRAS^{G12V} 誘導性の転写依存的クロマチン再構成が複製ストレスを誘導する

次に, KRAS^{G12V} が誘導する RS の原因の解明に取り組んだ. 正常上皮細胞を用いた本研究結果と一致して, 発がん性 KRAS および HRAS の正常繊維芽細胞における強制発現は, RS を誘導し, 複製速度を減速させる [14], [41]. 発がん性 HRAS を過剰発現させると, 全体的な RNA 合成が増加し, DNA:RNA がアニールした異常構造である R-loop を頻発させ, フォークの進行を阻害して RS を引き起こすことから, 発がん性 RAS の誘導する RS は RNA 転写に依存的であると考えられている [7], [14]. こうした RNA 依存性 RS を解消するには, RNA 転写を司る RNA ポリメラーゼ II の活性抑制および, DNA:RNA ハイブリダイゼーションを解消する RNaseH1 の高発現 [14], または Topoisomerase1 の高発現が必要である [42].

これらの知見に基づき, RNA ポリメラーゼ II の活性化リン酸化 (リン酸化 Ser2) 制御に必要な CDK9 の阻害剤である 5,6-dichloro-1- β -D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) が, KRAS^{G12V} が誘導するフォークの減速を回復させるか検証した. 興味深いことに, DRB の短時間処理は, フォークの減速を回復させるのに十分だった (Fig. 65) . さらに, ウリジンアナログの 5-ethynyluridine (EU) で細胞を 1 時間処理し, その核内取り込み量を評価することで, 新生 RNA の合成量を評価した. KRAS^{G12V} 発現は, コントロール細胞と ATR-1 細胞において RNA 転写活性をわずかに増加させることが判明し, DRB 処理は RNA 合成を大幅に減少させた (Fig. 66) . このことから, RNA 転写の阻害はフォークの減速を回復させるのに十分であることが示唆された. さらに, ATR-1 細胞では全体的な RNA 転写量は低下していなかったことから, KRAS^{G12V} 発現 ATR-1 細胞においてフォークが減速しないのは, ATR

高発現に伴い RNA 転写量が低下することに起因するものではないことが示唆された (Fig. 65, 66, 26) .

加えて, KRAS^{G12V} 発現細胞で, フォーク進行の障害物となりうる R-loop が形成されているかどうかを検証した[43]. DNA:RNA ハイブリッドを認識する S9.6 モノクローナル抗体を用いたゲノム DNA の Slot Blot 解析から[44], コントロール細胞と ATR-1 細胞では, KRAS^{G12V} の発現によって R-loop 量が増加しないことを確認した (Fig. 67) . さらに, レンチウイルスで RNaseH1 を一過性発現する SAEC を樹立し, これを解析したところ, RNaseH1 発現により R-loop 量はわずかに減少したものの, フォークの減速は回復しなかった (Fig. 68-70) . 以上の S9.6 シグナルは, 細胞内での RNaseH1 発現で減少し (Fig. 68) , in vitro にて RNaseH1 (exRNH) で抽出 DNA を消化すると消失したことから, これらの実験は, うまくコントロールされていることが確認された (Fig. 67, 68) .

RNA 転写活性の亢進によって引き起こされるフォークの進行に対する, もう一つの障害物である transcription-replication conflict (TRC) についても解析したところ, TRC は KRAS^{G12V} を発現しているコントロール細胞と ATR-1 細胞で上昇していなかった (Fig. 71) . さらに, フォークの減速を回復する DRB は, R-loop 量や TRC を有意に減少させなかった (Fig. 67, 71) .

これらの結果を総合すると, KRAS^{G12V} 発現に伴う RNA 転写はフォークの減速を引き起こすが, 結果として生じる R-loop と TRC はその原因ではなく, ATR の高発現も RNA に関連した障害に影響しないことが示された.

KRAS^{G12V} が誘導する RS の原因に RNA 転写がどのように関与しているかを, さらに明らかにするため, 細胞を EU 含有培地で 23 時間培養した後, DRB 存在下の EU 非含有培地で 1 時間培養することにより, 新生 RNA 転写が全体的な RNA の安定性にどのように影響するかを調べた. DRB 処理により, KRAS^{G12V} を発現するコントロール細胞で特異的に, 全体的な RNA 量が有意に減少し, KRAS^{G12V} を発現する ATR-1 細胞でも同様の傾向が観察されたことから, KRAS^{G12V} 発現細胞における全体的な RNA の安定化には, 新生 RNA 転写が必要であることが示唆された (Fig. 72, 73) .

興味深いことに, RNA シーケンス (RNA-seq) 解析により, KRAS^{G12V} を発現するコントロール細胞において, DRB 処理により RS の原因が解消される条件で発現が低下した遺伝子群は, クロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) 解析において, より高い H3K27me3 シグナルを示した (Fig. 74, 75) [45]. 全体的な RNA を安定化する転写産物が, KRAS^{G12V} 発現下で特異的に, こうした H3K27me3 に富む遺伝子から漏出して転写されていると考えられる. ここから, KRAS^{G12V} 発現に伴って H3K27me3 に富む遺伝子から漏出した RNA 転写に応答して, ポリコーン抑制複合体 2 (PRC2) が活性化され, そこに偶発的ヘテロクロマチン (facultative heterochromatin) のマーカーである H3K27me3 修飾を増強するという仮説

を立てた[46], [47].

これを検証するため, KRAS^{G12V} 発現に伴う H3K27me3 のレベルを免疫染色により測定した. KRAS^{G12V} 発現は H3K27me3 のレベルを上昇させ (Fig. 76, 77), 同時に H3K9me3 のレベルも上昇させた (Fig. 78, 79). しかし, H3K9me3 ではなく H3K27me3 が DRB によって阻害されたことから, KRAS^{G12V} の発現によって誘導される RS には, H3K27me3 を介したクロマチン再構成が関与していることが示唆された (Fig. 76-79). 上記の仮説と一致して, H3K27me3 を阻害する Enhancer of zeste 2 (EZH2) 阻害剤 (GSK126) は (Fig. 76, 77), KRAS^{G12V} によって誘導されたフォークの減速を回復させた (Fig. 80).

これらの結果は, KRAS^{G12V} が H3K27me3 に富む遺伝子からの予定外の RNA 転写の漏出を誘導して, 全体的な RNA を安定化させ, 核内の空間的区画形成を促進し[48], PRC2 複合体のクロマチンへのリクルートを促進した結果[46], [47], ヒストン H3 のメチル化を増強することを示唆している^{注2}.

ヘテロクロマチン構造が DNA 複製の進行を妨げ, RS を引き起こすことが複数報告されている[49]–[52]. 興味深いことに, DNA にインターカレーション (intercalation) し[53], クロマチンを弛緩させる, H3K27me3 のエピジェネティック制御因子でもある chloroquine (CQ) の処理は[54], 新生 RNA 合成を阻害せずにフォークの減速を回復させた (Fig. 65, 66). また, DRB と CQ はともに, PrimPol を消失させた ATR-1 細胞でフォークの減速を回復させたことから (Fig. 81), ATR の高発現は RS の原因の解消に関与していないことも明らかとなった. さらに, クロマチン凝縮状態を調べるために, micrococcal nuclease (MNase) 感受性試験を行った[55]. DRB, CQ または GSK126 で処理した KRAS^{G12V} を発現するコントロール細胞は, DMSO で処理したものに比べてクロマチンの MNase 感受性が増加したことから, KRAS^{G12V} 誘導性のクロマチン凝縮がこれらの薬剤によって実際に緩和されることが示唆された (Fig. 82).

これらの結果は, KRAS^{G12V} が介在する RNA 転写依存的な H3K27me3 の増加に伴うクロマチン凝縮が, コントロール細胞と ATR-1 細胞の両方で RS を引き起こす可能性を示唆している (Fig. 83).

PrimPol 依存的 repriming は局所的に凝縮したクロマチン領域で起きる

一般に, H3K27me3 と H3K9me3 は, それぞれ条件的 (facultative) ヘテロクロマチンと構

^{注2} 2024 年現在, RNA が PRC2 と直接相互作用し, そのリクルートを制御するモデルには多くの異議が寄せられている[80]–[82]. だが, RNA が PRC2 の機能する核内の区画を決定し, その酵素活性を間接的に制御するという液-液相分離モデル自体は否定しきれない. KRAS^{G12V} 誘導性条件的ヘテロクロマチン形成の機序は更なる検証が必要である.

成的 (constitutive) ヘテロクロマチンの特徴として定義されているが[56], 最近になって, これらのマーカーがゲノム上で頻繁に共局在することが明らかになった[57], [58]. Heterochromatin protein 1 (HP1)は, ヘテロクロマチンの形成と維持に必要なアダプタータンパク質であり, H3K9me3 との結合は H3K27me3 の存在下で増強される[58]. HP1 とヒストン H3 との相互作用が KRAS^{G12V} 誘導性 RS の原因に関与しているかどうかを検証するため, HP1 α と HP1 β をノックダウンにより消失させた (Fig. 84). 興味深いことに, HP1 α または HP1 β のいずれかを消失させると, KRAS^{G12V}を発現しているコントロール細胞では, 減速したフォークが完全に回復し (Fig. 85), HP1 α を再発現すると, フォークの減速が再現された (Fig. 86, 87). このことから, HP1 が DNA 複製の障害として必要かつ十分であることが示された. さらに, HP1 α の消失は, KRAS^{G12V} 発現によって誘導されるクロマチン結合 RPA のレベルを抑制し (Fig. 88), KRAS^{G12V} 発現に伴う細胞増殖抑制を回復させた (Fig. 89). ここから, HP1 α の消失は, KRAS^{G12V}を発現している細胞の RS を解消し, DNA 複製を継続させ, 細胞増殖を回復させることが示唆された. これらの結果から, H3K27me3 と HP1 の両方が, KRAS^{G12V} が誘導する RS に寄与していることが示唆される^{注3}.

続いて, PrimPol が局所的に凝縮したクロマチン領域近傍で repriming を行うかどうかを評価した. 親鎖 DNA 上の repriming 依存的な ssDNA ギャップ露出を検出するために, KRAS^{G12V}を発現する ATR-1 細胞を 48 時間 BrdU 含有培地で培養し, その後 24 時間 BrdU 非含有培地で培養した[26]. 最後の 30 分間, S 期細胞を標識するために 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) 含有培地で培養した. これに非変性プロトコルで H3K27me3 と BrdU に対するモノクローナル抗体を用いて近接ライゲーションアッセイ (PLA) を行った (Fig. 90). PLA シグナル (foci) は BrdU 含有培地で培養した細胞でのみ検出され, 新生 DNA (EdU) とは共局在せずに分画されていたことから, 取り込まれた BrdU と H3K27me3 の近接性をモニターする PLA の精度が確認された (Fig. 91). 驚くべきことに, KRAS^{G12V} 発現は, S 期細胞 (Fig. 92, 93) の PLA シグナルを PrimPol 発現依存的に増加させた (Fig. 94-96). これは, PrimPol を介した repriming によって, H3K27me3 を含む局所的に凝縮したクロマチン領域の近傍に ssDNA ギャップが形成されることを示唆する. 興味深いことに, PLA シグナルの増加は S 期だけでなく, G2/M 期の細胞でも観察された (Fig. 92, 93). このことは, S 期に生じた repriming 依存的な ssDNA ギャップが, G2/M 期まで持続し, その結果 ATR-1 細胞ではゲノムが不安定になる可能性を示唆している.

^{注3} 既存の H3K9me3 への HP1 のリクルートを H3K27me3 が介在するモデルや, 今回の実験系では検出できない H3K9 を取り巻く変化によって, HP1 が H3K27me3 と並行してヘテロクロマチンを形成し, フォークを阻害するモデルも考えられる.

ATR を高発現する細胞は KRAS^{G12V} 発現が促進するゲノム不安定性へ適応する

KRAS^{G12V} 誘導性 RS に起因する ATR の発現増加が、ゲノムの不安定性に及ぼす影響を調べるため、小核 (Micro Nuclei : MN) や異常核構造 (blebs) などのゲノム不安定性マーカーを評価した (Fig. 97) . KRAS^{G12V} 未発現の条件下では、コントロール細胞の約 5% が MN 陽性であったが、KRAS^{G12V} を発現すると、その割合は 10% 前後にまで増加する傾向があった (Fig. 98) . 驚くべきことに、KRAS^{G12V} を発現する ATR-1 細胞では、コントロール細胞に比べて MN 形成が有意に促進され、同様の傾向は blebs の形成でも観察された (Fig. 98) . RS の結果である M 期細胞の anaphase bridge も [59], [60], コントロール細胞と ATR-1 細胞の両方で KRAS^{G12V} 発現によってわずかに増加し、KRAS^{G12V} を発現する ATR-1 細胞は、コントロール細胞に比べて anaphase bridge 陽性細胞が約 1.5 倍多かった (Fig. 99) .

コントロール細胞では、KRAS^{G12V} の発現は細胞生存率を約 50% まで低下させ、methuosis 様の細胞死を誘導するが (Fig. 4, 22, 100) , ATRi 処理はその細胞生存率をさらに低下させた (Fig. 100) . KRAS^{G12V} が誘導する減速したフォークは ATR の阻害後に徐々に崩壊し、細胞死を引き起こしている可能性がある. ATR-1 細胞では、KRAS^{G12V} の発現は MN 形成の増加後も細胞生存率を低下させなかったが、ATR の阻害は細胞生存率と MN 形成を低下させた (Fig. 100, 101) . これらの結果から、ATR 阻害による PrimPol 依存的 repriming の抑制が (Fig. 33, 56) , 細胞生存率と MN 形成の低下に関連することが示唆された^{注4}. しかし、PrimPol を介した repriming が、KRAS^{G12V} を発現する ATR-1 細胞における MN 形成と、その細胞生存にどのように寄与しているのかについては、さらなる研究が必要である. これらの結果は、ATR のキナーゼ活性が細胞の生存に必要であり、KRAS^{G12V} 誘導性 RS に適応する過程で、ゲノム不安定性を高める可能を示す. 注目すべきことに、KRAS^{G12V} を発現していない ATR-1 細胞でも、継代に伴って核の構造異常が増強される傾向がある (Fig. 98) . ATR の高発現が潜在的な RS に過敏に応答した結果、ゲノムが不安定化する可能性がある^{注5}.

以上の見解と一致して、ATR を高発現するコントロール細胞由来の RSTC もまた、MN 形成の増加を示した (Fig. 102) .

RSTC の WGS 解析から、構造変異 (structural variant : SV) の総数が増加していることが明らかになり、そのほとんどが欠失 (Fig. 103) , 高頻度のコピー数変異 (copy number variant : CNV) , ゲノム再構成 (Fig. 104) であった. また、すべての RSTC が全ゲノム重複 (whole genome duplication : WGD) を示すことがわかった. これは、がん遺伝子が RS を通して WGD を促進することを示した最近の研究と整合性がある [61], [62]. これらの所見は、KRAS^{G12V} が誘導する RS に応答した ATR-PrimPol による RS 耐性機構が、がんのク

注4 すなわち、フォークの停止/減速自体が、潜在的な細胞死の原因となりうる.

注5 4OHT 非依存的に漏出發現する KRAS^{G12V} の影響の可能性も否定しきれない.

ローン進化の過程において頻繁に起こり, WGD を惹起して染色体の異数倍化を促進することを示唆している.

加えて, RSTC では一塩基変異 (single nucleotide variant : SNV) が 2 倍以上増加していた (Fig. 105) . そのシグネチャーを解析したところ, RSTC で特異的に COSMIC シグネチャー-SBS8 が同定された (Fig. 106) . これは, DNA 複製エラーを看過すること起因するものであり [63], KRAS^{G12V} に誘導された RS が SV だけでなく, その変異過程にも影響していることを示唆している.

これらの結果から, ATR 発現の上昇は, KRAS^{G12V} 誘導性 RS を伴いつつも細胞生存を可能にし, 一方でゲノム不安定性の蓄積を看過する結果, RSTC のクローン進化を促進することが示唆された.

次に, ATR-PrimPol を介した RST 機構が, 発がん性 KRAS 変異を有する肺がん細胞でも維持されているかどうかを検証した (Fig. 107) . KRAS^{G12mut} 細胞株は, KRAS 野生型細胞株よりも PrimPol と H3K27me3 の発現量が有意に高く, ATR と HP1 α の発現量は細胞ごとに異なるものの, KRAS^{G12mut} 細胞株で高発現の傾向が見られた (Fig. 108) . 興味深いことに, KRAS^{G12mut} 細胞で PrimPol をノックダウンにより消失させると, ファイバーの長さはそのコントロールに比して 40% 程度減少したが, KRAS 野生型細胞株ではほとんど影響がなかった (Fig. 109, 110) . これらの結果は, KRAS^{G12mut} がん細胞はヘテロクロマチン関連性 RS を内在しており, その DNA 複製は RSTC と同じく (Fig. 44) , PrimPol を介した repriming に慢性的に依存していることを示唆している.

ATR が KRAS^{G12V} 誘導性 RS に応答して, PrimPol 依存的な repriming を介した RST を促進することでフォーク速度を維持し, ゲノム不安定性を亢進させつつも, 細胞生存を可能にすることを踏まえ, Fig. 1 に示す LUAD 患者のコホートを再解析し, PrimPol と ATR の両方の高発現が, 発がん性 KRAS をもつ腫瘍と, 患者の予後にどのような影響を与えるか検証した.

LUAD コホートの KRAS 変異型腫瘍群において, ATR と PrimPol の両方の mRNA 量が高い症例では, ATR と PrimPol の両方の mRNA 量が低い症例よりも OS 率が低かった (Fig. 111) . しかしながら, このパターンは COAD および PAAD では観察されなかったことから (Fig. 112) , OS に対する ATR-PrimPol を介した RST の影響は, LUAD においてより顕著であることが示唆された. ATR および PrimPol の高発現と予後不良との関連が TCGA LUAD コホートだけの特徴である可能性を検証するために, 本邦の国立がん研究センター中央病院 (NCCJ) の LUAD コホートを追加解析した. TCGA と NCCJ のデータの患者背景を一致させるため, 喫煙歴のある症例を選択し, この群を比較解析した. ATR の mRNA 発現量が高い症例, および ATR と PrimPol の両方の mRNA 発現量が高い患者は, TCGA と NCCJ の両コホートにおいて, その発現量が少ない患者に比べて OS 率が有意に低かった

(Fig. 113, 114) .

これらの結果は, ATR の発現量が高いほど, KRAS^{G12V} が誘導する RS に対する耐性が高くなり, この効果は PrimPol 依存的な repriming によって媒介され, その結果ゲノム不安定性亢進のリスクが高まるという (Fig. 115) , 本研究における我々の見解を強く支持する.

考察

発がんにおける ATR キナーゼ依存性モジュールのもつ影響

がん細胞がどのように発生し, 進展するのかは, 最も激しく議論されてきた問題の一つである. がん遺伝子は, 培養細胞において RS と DNA 損傷を誘導し, それに伴って DNA 損傷応答 (DDR) と細胞周期チェックポイントを惹起する. これらの応答機構は腫瘍形成の初期段階における発がんバリアとして機能する [64], [65]. それと同時に, このバリアを回避した腫瘍発生の起源細胞となりうるサブセットが選択される [8].

これまでの研究で, ATR の発現量によって腫瘍形成に異なる影響を与えることが報告されている. 片アレルに変異を持つ ATR 遺伝子のヘテロ接合体 (変異型ホモ接合体は胚性致死を示す) は, RS 応答が十分に機能しないために腫瘍化しやすいことが知られている [17]. 一方で, セッケル症候群を模倣する ATR の hypomorphic 変異による ATR 発現量の著しい低下は, がん遺伝子発現細胞において許容できないレベルの RS を経験した細胞を集団から排除するため, 腫瘍抑制的な効果を示す [20].

本研究結果は, KRAS^{G12V} が誘導する RS への適応には, ATR の高発現が細胞生存の重要な決定因子であり (Fig. 12, 20) , 腫瘍形成の初期段階においては, その本来の腫瘍抑制効果とは異なる側面が顕在することを示唆している. 事実, Chk1 や Claspin/Timeless などの ATR キナーゼ依存性モジュールを構成する因子の高発現は, 発がん性 RAS によって誘導される悪性形質転換を促進することが報告されている [21], [66]. さらに, 子宮内膜種の再発に KRAS の発現量と, ATR-Chk1 経路の活性化が関与する可能性も指摘されている [67]. これらの結果は, ATR キナーゼシグナル伝達経路を介する RS 応答が, 内因性 RS により増強された遺伝毒性の亢進にもかかわらず, 細胞が RS に対処し, 生存することを助ける可能性を示している.

複製ストレス応答における PrimPol の役割

RST はフォークの可塑性を制御しており, 中でも repriming が中心的な機構として近年注目されている. repriming は, cisplatin, UV-C, 低濃度 hydroxyurea (HU) のような外因性 RS 誘導剤の処理により活性化されることから, RS に対処するための一般的な機構であることが示唆される [22], [37], [68].

最近の報告で, PrimPol の RNA 転写制御と repriming 機構は ATR 依存的に制御されてい

ることが示された[37]. さらに, USP36 は PrimPol から Lys29 に結合したポリユビキチン鎖を除去することによって PrimPol タンパク質の安定性に関与し, RST において重要な役割を果たしている[69]. これらの知見は, repriming の開始には PrimPol の RNA 転写量あるいはタンパク質の安定性が重要であることを強調している.

KRAS^{G12V} 誘導性 RS に応答する過程で, 強制的な PrimPol 発現は repriming を活性化するのに十分であるが (Fig. 52), repriming は ATR キナーゼ活性依存的であり, 長時間の ATR/Chk1 活性化を必要とすることから (Fig. 54), ATR キナーゼによる制御が PrimPol 依存的な repriming を引き起こすのに必須であることが示唆された.

また, 外因性 RS が PrimPol の Ser255 のリン酸化を誘導することを示した最近の研究と一致して, KRAS^{G12V} 誘導性 RS 存在下でもその制御は repriming に必要である (Fig. 64). これらの結果は, ATR-Chk1 経路に依存した PrimPol の Ser255 でのリン酸化が, その repriming 活性をオンにするための自己抑制の解除に関わる重要なスイッチであることを示している[39], [40]. PrimPol の Ser255 は非構造領域 (disordered region) に位置し, 高等霊長類にのみ保存されているため, 他の生物種における PrimPol 依存性 repriming の制御は, PrimPol 遺伝子の発現量, タンパク質の安定性, クロマチンへのリクルート機序, またはその代替機構など, 重層的な機序の帰結として成り立つものであると考えられる.

また, SMARCAL1, ZRANB3, HTLF などいくつかのタンパク質は, フォークの物理的障害の近辺で鋳型交換 (template switch: TS) を介在し, フォークの逆転構造の形成を触媒する一方で, フォークの減速を促進している[70]. 特に SMARCAL1 は, 内因性の RS に対処するのに必要であり[71], また, ATR は SMARCAL1 の Ser652 をリン酸化し, そのフォークのリモデリング活性を負に制御する[35]. そして本研究で判明したことから, ATR 発現が増加すると, 局所的なヘテロクロマチンは PrimPol 依存性の repriming によってスキップされ, 複製後のフォーク後方には ssDNA ギャップが形成される (Fig. 90-93, 96). これらの知見から, ATR はそのキナーゼ活性を介して PrimPol 活性を制御するだけでなく, KRAS^{G12V} 誘導性 RS に応答して, PrimPol を介した repriming を可能にするためにフォークの逆転を防ぐことが示唆される.

発がん性 RAS 誘導性複製ストレスの原因

先行研究と一致して, KRAS^{G12V} の発現は RNA 転写に依存した複製ストレスを惹起し, フォークを減速させた (Fig. 65). だが興味深いことに, その原因は R-loop 形成や TRC といったよく知られた現象[14], [42]とは異なる機構によるものであった (Fig. 67-71).

KRAS^{G12V} の発現は, 全体的なクロマチンの脱凝縮を亢進させ[72], H3K27me3 に富んだ遺伝子領域からの漏出的な RNA 転写を促進し, PRC2 の活性化と H3K27me3 の再形成を増強する (Fig. 74-77, 80). 最近の報告から, H3K27me3 の転写抑制機能は H3K9me3 のそれよりも低く[73], 転写の漏出を許しがちであることが示唆された. 加えて, このような productive な転写産物が少ない場合には, PRC2 依存的な H3K27me3 形成を増強しやすい

という正のフィードバックモデルも提案されている[74]. こうした H3K27me3 領域では転写依存的に, より H3K27me3 が増強されるという上記の性質も相まって, KRAS^{G12V} 発現が HP1 α および HP1 β を伴う条件的ヘテロクロマチンの形成を促進し, 結果的にフォークの進行を阻害し, 減速させると考えられる (Fig. 84-87) .

また, 本研究で明らかになったように, KRAS^{G12V} 発現に伴う全体的な RNA の安定化には新生 RNA 転写が必要であり (Fig. 72, 73) , KRAS^{G12V} 発現細胞において独特な RNA プールが維持されていることが明らかとなった. こうした RNA 代謝の変化は, RNA の液-液相分離に依存する核内区画にも影響を与えるため, こうした背景も PRC2 の活性化に寄与すると考えられる[48].

では, 先行研究で発がん性 RAS が誘導した R-loop や TRC と, 本研究で発見された条件的ヘテロクロマチンの誘導過程にはどのような差があるのだろうか? こうした RNA 転写依存性 RS を検証するにあたり, 次の 3 点に注目する必要があると考える. 1; RNA の種類 (由来となるゲノムの領域: 空間的要素, 転写される時期: 時間的要素, コード RNA や ncRNA などの機能的分類) . 2; 転写の新生速度 (生成と分解の合算による見かけの転写速度) . 3; 転写後の RNA の核内における安定性 (核内における RNA の分解速度と, 細胞質への運搬効率) .

1. について, 核内の空間的分画は RNA の時空間的な転写の種類に依存的に決定されている[48]. 本研究においては, H3K27me3 に富んだ領域からの non-productive な RNA 転写が PRC2 の機能制御を介在すると考えられるが, RNA の種類の解明と共に, その時空間的作用についても更なる解析が必要である.

2. について, 先行研究との大きな違いは, KRAS^{G12V} の発現が明確な RNA 転写合成の活発化を誘導しなかったことである (Fig. 66) [14]. R-loop や TRC は, 高頻度の RNA 転写が DNA 複製に影響することに伴う現象であるため, この結果は, 先行研究とそもそもの前提が異なることを示唆する.

3. について, 新生 RNA 依存的に核内 RNA が安定化された KRAS^{G12V} 発現下特異的な状況が, PRC2 の活性に関与する点は, その制御として無視できない (Fig. 72, 73) . これは 1. と 2.とも関連して, R-loop や TRC と, 条件的ヘテロクロマチンが形成される, 根本的な分岐点である可能性がある.

これらを総括的に区分する点として, 細胞種の違いがある. R-loop や TRC が頻繁に観察されるのは, 線維芽細胞を用いた実験系であり[14], [41], [42], 本研究で用いた上皮細胞の系とは大きくエピジェネティックな要素が異なる. 発がん性 RAS の誘導する複製ストレスの原因が, 何をパラメータとして決定されるのかを解明するため, こうした要素を加味した研究が引き続き必要である.

治療標的としての ATR-PrimPol 経路とヘテロクロマチン関連性複製ストレス

KRAS^{G12V} 誘導性 RS に応答して, ATR-PrimPol が介在する RST はどのような結果をもた

らすのだろうか？第一に、より多くの細胞の生存を可能にし、足場非依存性増殖を促進する。第二に、これらの細胞はより高度のゲノム不安定性を示す。これら 2 つの表現型は ATRi によって抑制され、同時に PrimPol 依存性 repriming も抑制される (Fig. 33, 50, 52, 56, 57, 59, 100, 101)。ここから、ATR-PrimPol が介在する RST は、ゲノム内の ssDNA ギャップを伴う DNA 複製の完了を促進する一方で、クローン進化に必要なゲノム不安定性の上昇をもたらし、その帰結としての腫瘍化、そして悪性形質転換を引き起こすことが示唆される。

こうした RS の観点から、がんを治療する方法は大きく 2 つ考えられる。1 つ目は、RS 適応機構を阻害する方法である。発がん性 RAS をドライバーとする TRC 依存性 RS に対しては Topoisomerase1 の高発現に依存し[42]、本研究より、ヘテロクロマチン依存性 RS に対しては ATR の高発現に依存する。こうした依存因子を標的とすることで、効率的に細胞死が誘導できると期待される。実際、cisplatin に対する PrimPol を介した適応は ATR 依存的であり[27], [37]、プラチナ剤無投薬期間が 3 カ月以下の PrimPol 依存的と考えられる患者では、ATRi と gemcitabine の併用による顕著な有益性が観察されたが、無投薬期間が 3 カ月を超える PrimPol 非依存的と考えられる患者ではその効果が観察されなかった[75]。RS に応答する ATR-PrimPol 経路の活性化を指標とすることが、ATRi 奏功の鍵であることが示唆される。

2 つ目は、慢性的 RS を抑制し、ゲノム不安定性の亢進を抑制する方法である。本研究より、内因性 RS そのものよりも、それに対する応答機構がゲノム不安定性に寄与することが明らかとなった。すなわち、RS の発生を根本的に解除することで、ゲノム不安定性亢進と発がん促進を抑制できると期待される。実際、発がん性 RAS をドライバーとする肺がんの腫瘍モデルに、PRC2 阻害剤を継続的に投与すると、ヘテロクロマチンが抑制され、造腫瘍効果も抑制される[76]。これは、慢性的なヘテロクロマチン依存性 RS を抑制することで、がんの増悪防止が可能であることを示唆する。

加齢依存的なゲノム不安定性の亢進機構解明への展望

散発性がんにおけるゲノム不安定性の原因として、Halazonetis はがん遺伝子の発現を想定した[4]。本研究で明らかにしたように、発がん性 KRAS は ATR-PrimPol 経路の応答を介して明らかにゲノム不安定性を亢進させる。では、発がんイベントが惹起されるまで、ゲノム不安定性は亢進しないのだろうか？

Vogelstein の bad luck model は、ゲノム不安定性が必ずしもがん遺伝子に起因せず、通常の DNA 複製と、その反復回数そのものがリスクとなりうることを示唆する[6]。実際、Muto & Ogawa による食道正常上皮細胞のゲノム解析では、顕著な発がん性変異は認められなかったにもかかわらず、ゲノム不安定性の兆候が認められた[77]。そのゲノム不安定性は加齢とともに進行し、飲酒・喫煙などの発がんリスク行動は顕著にこれを増加させた。

以上の結果は、本研究の見解と併せて、発がんに関与しうるゲノム不安定性の 3 つの特徴

を示唆している. 1; 発がんには有利ではあるが十分ではない^{注 6} (がん遺伝子を持たない正常細胞でもゲノム不安定性は進行する). 2; 発がんには加齢依存的なゲノム不安定性の獲得が関与する (本研究はクローン進化の過程でゲノム不安定性が亢進することを示す). 3; その原因は必ずしもがん遺伝子の発現や TSG の不活性化とは限らない (環境要因もこれに交絡する) .

こうした加齢依存的なゲノム不安定性の原因を解明することは、その原因と結果の間に様々な要因が交絡するため、非常に難しい. だが、本研究の提示する RNA 転写依存的ヘテロクロマチン関連性 RS とその機序は、それが発がん性 KRAS の発現を伴わずとも、非常に低い確率ではあるが正常細胞でも転写の活性化に伴い、散発的に発生しうることを示唆する. また、通常の DNA 複製においても親鎖 H3K27me3 の娘鎖への分配はリーディング鎖とラギング鎖で非対称であり、リーディング鎖に分配されやすい[78]. こうした潜在的 RS の原因に ATR 高発現が過剰に応答しうる可能性を加味すれば (Fig. 98) , 長期的な視点では、微弱な ATR-PrimPol 経路の活性化でも、加齢依存的なゲノム不安定性に寄与する可能性を、十分に考慮すべきであると考ええる.

^{注 6} ゲノム不安定性がほとんど認められない Ewing 肉腫の症例や, in vitro での報告[83]もあるため、発がんには必要であるとは言い難い.

略語集

略語	正式名	日訳
TSG	Tumor Suppressor Gene	がん抑制遺伝子
RS	Replication Stress	複製ストレス
TRC	Transcription-Replication Conflict	転写-複製衝突
RST	Replication Stress Tolerance	複製ストレス耐性
RSTC	Replication Stress Tolerance Cell	複製ストレス耐性細胞
LUAD	Lung Adenocarcinoma	肺腺癌
PAAD	Pancreatic Adenocarcinoma	膵管腺癌
COAD	Colon Adenocarcinoma	大腸腺癌
MN	Micro Nuclei	小核

材料と実験方法

抗体一覧

抗体名	メーカー	識別
Mouse monoclonal anti-pan Ras	Santa Cruz	Cat# sc-166691, RRID:AB_2154229
Rabbit polyclonal anti- α Tubulin	MBL	Cat# PM054, RRID:AB_10598496
Rabbit monoclonal anti-phospho-ATR (Thr1989)	Cell Signaling Technology	Cat# 30632, RRID:AB_2798992
Rabbit polyclonal anti-ATR	Genetex	Cat# GTX128146, RRID:AB_2885716
Rabbit monoclonal anti-phospho-CBK1 (Ser317)	Cell Signaling Technology	Cat# 12302, RRID:AB_2783865
Rabbit monoclonal anti-phospho-CBK1 (Ser345)	Cell Signaling Technology	Cat# 2348, RRID:AB_331212
Mouse monoclonal anti-CBK1	Santa Cruz	Cat# sc-8408, RRID:AB_627257
Rabbit polyclonal anti-PrimPol	Proteintech	Cat# 29824-1-AP, RRID:AB_2918349
Rabbit monoclonal anti-phospho-RB Ser807/811	Cell Signaling Technology	Cat# 8516, RRID:AB_11178658
Rabbit monoclonal anti-E-Cadherin	Cell Signaling Technology	Cat# 3195, RRID:AB_2291471
Rabbit monoclonal anti-Vimentin	Cell Signaling Technology	Cat# 5741, RRID:AB_10695459
Mouse monoclonal anti-myc-tag	MBL	Cat# 192-3, RRID:AB_11160947
Rabbit monoclonal anti-HistoneH1.4	Cell Signaling Technology	Cat# 41328, RRID:AB_2799199

Mouse monoclonal anti-GAPDH	Wako	Cat# 010-25521, RRID: N/A
Rabbit monoclonal anti-phospho-CHK1 (Ser296)	Cell Signaling Technology	Cat# 90178, RRID:AB_2800153
Mouse monoclonal anti-RNaseH1	abcam	Cat# ab56560, RRID:AB_945244
Mouse monoclonal anti- HP1 α	Millipore	Cat# 05-689, RRID:AB_11213599
Rabbit monoclonal anti-HP1 β	Cell Signaling Technology	Cat# 8676, RRID:AB_11217816
Mouse monoclonal anti-RPA32	abcam	Cat# ab2175, RRID:AB_302873
Rabbit polyclonal anti-phospho-RPA32 (Ser33)	Bethyl Laboratories	Cat# A300-246A-M, RRID:AB_2180847
Rabbit monoclonal anti-Tri-Methyl-Histone H3 (Lys27)	Cell Signaling Technology	Cat# 9733, RRID:AB_2616029
Rabbit polyclonal anti-Tri-Methyl-Histone H3 (Lys9)	abcam	Cat# ab8898, RRID:AB_306848
Mouse polyclonal anti-PICH	Abnova	Cat# H00054821-B01P, RRID:AB_1573438
Rabbit polyclonal anti-phospho-HistoneH3 (Ser10)	Millipore	Cat# 06-570, RRID:AB_310177
Mouse monoclonal anti-BrdU	GE health	Cat# RPN202, RRID:AB_2314032
Mouse monoclonal anti-PCNA	Santa Cruz	Cat# sc-56, RRID:AB_628110
Rabbit polyclonal anti- phospho-Polymerase II (Ser2)	Novus	Cat# NB100-1805, RRID:AB_10001499
Mouse monoclonal anti-BrdU (B44)	BD Biosciences	Cat# 347580, RRID:AB_10015219
Rat monoclonal anti-BrdU (BU1/75)	abcam	Cat# ab6326, RRID:AB_305426
Mouse monoclonal anti-DNA:RNA hybrids (S9.6)	Millipore	Cat# MABE1095, RRID:AB_2861387
Mouse monoclonal anti-dsDNA	abcam	Cat# ab27156, RRID:AB_470907
Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H + L) antibody	Jackson Immuno Research	Cat# 111-035-003, RRID:AB_2313567
Peroxidase-AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H + L) antibody	Jackson Immuno Research	Cat# 115-035-003, RRID:AB_10015289
Goat anti-Rat IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 488	invitrogen	Cat# A11006, RRID:AB_2534074
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Fluor 555	invitrogen	Cat# A21422, RRID:AB_2535844
Alexa Fluor 488-AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) antibody	Jackson Immuno Research	Cat# 711-545-152, RRID:AB_2313584

Alexa Fluor 488-AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) antibody	Jackson Immuno Research	Cat# 715-545-151, RRID:AB_2341099
Alexa Fluor 594 AffiniPure Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L) antibody	Jackson Immuno Research	Cat# 711-585-152, RRID:AB_2340621
Alexa Fluor 594-AffiniPure Donkey Anti-Mouse IgG (H+L) antibody	Jackson Immuno Research	Cat# 715-585-151, RRID:AB_2340855

オリゴ配列一覧

オリゴ・プライマー名	メーカー	識別
Silencer Select Negative control #1 siRNA (siCTL)	Ambion	Cat# 4390843
Silencer Select siRNA PRIMPOL (termed as siPP#2)	Ambion	ID# s47418
Silencer Select siRNA PRIMPOL (termed as siPP#3)	Ambion	ID# s47417
IDT Negative control-1 siRNA (siCTL)	Integrated DNA Technologies	Cat# 51-01-14-03
IDT siRNA UTR of PRIMPOL (termed as siPP#4)	Integrated DNA Technologies	ID# hs.Ri.PRIMPOL.13.3
Custom designed siUTR-PRIMPOL (termed as siPP#5)	Ambion	Sense : GUCUGUGAGAUUUGAUAAAtt , Antisense : UUUAUCAAUCUCACAGACa U
Silencer Select siRNA HP1 α (termed as siHP1 α #1)	Ambion	ID# s23883
Silencer Select siRNA HP1 α (termed as siHP1 α #2)	Ambion	ID# s23884
Custom designed siUTR- HP1 α (termed as siHP1 α #3)	Ambion	Sense : GUUGCCCAUCUGUAAAAAtt, Antisense : UUUUUAACAGAUGGGCAACa U
Silencer Select siRNA HP1 β (termed as siHP1 β #1)	Ambion	ID# s21549
Silencer Select siRNA HP1 β (termed as siHP1 β #2)	Ambion	ID# s21550

ATR RT-qPCR primer F	this study	5'- GGTATGCTCTCACTTCCATG- 3'
ATR RT-qPCR primer R	this study	5'- GTCAGAAGAAACACACATCG- 3'
PrimPol RT-qPCR primer F	Quinet <i>et al.</i> , 2019	5'- TGTGGCTTTGGAGGTTACTG A-3'
PrimPol RT-qPCR primer R	Quinet <i>et al.</i> , 2019	5'- TTCTACTGAAGTGCCGATAC TGT-3'
Hs_ACTB_1_SG Primer Assay	QuantiTect QIAGEN	ID# QT00095431
TaqMan™ RNU48	MicroRNA assay Applied Biosystem	ID# 001006
TaqMan™ miR185	MicroRNA assay Applied Biosystem	ID# 002271

実験方法

細胞培養と細胞株

HEK293T 細胞はダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM; Nacalai Tesque, Cat# 08459-64) で培養した. RPE-1 細胞 (Dr. Hochegger より提供) および派生細胞株は, DMEM-Ham's F-12 培地 (Nacalai Tesque, Cat#11581-15) で培養した. H3122 (小林博士より提供), H1975, H1819, H358, A427 および H2009 細胞は RPMI1640 (Nacalai Tesque, Cat# 30264-56) で培養した. これらの培地は, 10% ウシ胎児血清 (Gibco), 100 U/ml ペニシリンおよび 100 µg/ml ストレプトマイシン (Nacalai Tesque, Cat# 26252-94) を添加した.

SAEC (ヒト小気道上皮細胞, 清野博士より提供) は, hTERT, CDK4 変異体, サイクリン D1 の発現を介して不死化した. SAEC および由来細胞株は, LifeFactors® Kit (Lifeline Cell Technology 社, Cat# LS-1047; human serum albumin, lecithin, linoleic acid, L-glutamine, bovine pituitary extract, and TM-1 factor を含む) を添加した BronchiaLife™ Epithelial Basal Medium (Lifeline Cell Technology 社, Cat# LM-0007) で培養した. 細胞はすべて, 37°C, 5% CO₂ で培養した.

KRAS^{G12V} 発現誘導性細胞株の作製

4OHT 誘導性 KRAS^{G12V} 細胞を樹立するために, HEK293T 細胞に 0.5 µg/ml の pQCXIHyg-mERT2-KRAS^{G12V} プラスミドベクター (清野博士より提供) を, Polyethyleneimine (PEI) “MAX” (PEI; Polyscience, Cat#24765) により, pCL-GagPol と pEF6/env (10A1) と併せてトランスフェクションした. レトロウイルス上清を回収し, 濾過し (0.45 µm PVDF),

Retro-X Concentrator (TaKaRa, Cat#631456) を用いて濃縮した。濃縮したウイルスを 8 µg/ml の polybrene (Sigma-Aldrich, Cat# H9268) を含む培地に再懸濁し, SAEC または RPE-1 細胞に感染させた。

ATR 恒常発現および誘導的 PrimPol, RNaseH1 または HP1α発現を有する細胞株の作製

ATR 高発現細胞を作製するために, ATR cDNA を Pfu Turbo DNA Polymerase (Agilent, Cat# 600250) を用いて PCR で増幅し, In-Fusion HD cloning protocol (TaKaRa, Cat# 639649) を用いて CSII-CMV-MCS-IRES2-Bsd (理研, Cat# RDB04385) の NotI および NheI 部位に挿入した。HEK293T 細胞に, 0.5 µg/ml の CSII-CMV-ATR-IRES2-Bsd プラスミドベクターと, pCAG-HIVgp および pCMV-VSV-G-RSV-Rev を, PEI を用いてそれぞれトランスフェクションした。ウイルス上清を回収し, 濾過し (0.45 mm PVDF), Lenti-X Concentrator (TaKaRa, Cat#631232) を用いて濃縮した。濃縮したウイルスを 8 µg/ml の polybrene を含む培地に再懸濁し, SAEC または RPE-1 細胞に感染させた。CSII-ATR をトランスフェクションした単細胞クローンを, KRAS^{G12V} 発現のためのレトロウイルス感染前に複数選択した。

Doxycycline 誘導性 PrimPol 細胞を樹立するために, PrimPol-myc cDNA (OriGene, Cat# rc209004) を Pfu Turbo DNA Polymerase を用いた PCR で増幅し, In-Fusion HD cloning protocol を用いて pENTR GateWay ベクターの BamHI および NotI 部位に挿入した。pENTR-PrimPol-myc を, GateWay system (Invitrogen, Cat# 11791-020) を用いて CSIV-TRE-RfA-UbC-KT-Puro (中西博士より提供) に組換えた。HEK293T 細胞に 0.5 µg/ml の CSIV-TRE-PrimPol-myc-RfA-UbC-KT-Puro, pCAG-HIVgp および pCMV-VSV-G-RSV-Rev プラスミドを PEI によりトランスフェクションした。ウイルス上清を回収し, 濾過し, Lenti-X Concentrator を用いて濃縮した。濃縮したウイルスを 8 µg/ml の polybrene を含む培地に再懸濁し, SAEC に感染させた。

Doxycycline 誘導性 RNaseH1 細胞を樹立するために, HEK293T 細胞に PEI を用いて pInd20-TRE-RNaseH1-GFP-UbC-IRES-Neo, pCAG-HIVgp および pCMV-VSV-G-RSV-Rev プラスミドを 0.5 µg/ml ずつトランスフェクションした。ウイルス上清を回収し, 濾過し, Lenti-X Concentrator を用いて濃縮した。濃縮ウイルスを 8 µg/ml の polybrene を含む培地に再懸濁し, SAEC に感染させた。

Doxycycline 誘導性 HP1α細胞を樹立するために, myc-HP1α cDNA (IDT, カスタムデザイン) を, In-Fusion HD cloning protocol を用いて pInd20-TRE-MCS-UbC-IRES-Neo の BsmBI および XhoI 部位に挿入した。HEK293T 細胞に, PEI を用いて pInd20-TRE-myc-HP1α-UbC-IRES-Neo, pCAG-HIVgp および pCMV-VSV-G-RSV-Rev プラスミドをそれぞれ

れ 0.5 µg/ml トランスフェクションした。ウイルス上清を回収し、濾過し、Lenti-X Concentrator を用いて濃縮した。濃縮したウイルスを 8 µg/ml の polybrene を含む培地に再懸濁し、SAEC に感染させた。

遺伝子発現誘導と薬剤処理

抗生物質を以下に示す濃度で投与した： pQCXIHyg-mERT2-KRAS^{G12V} ベクター選択には 50 µg/ml の hygromycin B (Wako, Cat# 080-07683), CSII-CMV-ATR-IRES2-Bsd ベクター選択には 10 µg/ml の blasticidin S (Wako, Cat# 022-18713), CSIV-TRE-PrimPol-myc-RfA-UbC-KT-Puro ベクター選択には 1 µg/ml の puromycin (InvivoGen, Cat# ant-pr-1), pInd20-TRE-RNaseH1-GFP-UbC-IRES-Neo ベクターおよび pInd20-TRE-myc-HP1α-UbC-IRES-Neo ベクター選択には 200 µg/ml の G418 (InvivoGen, Cat# ant-gn-1) を用いた。

4OHT (Abcam, Cat# ab141943) を DMSO に溶解して 0.1 mM のストック溶液とし、-20°C で保存した。4OHT による KRAS^{G12V} 発現誘導のために、細胞を 0.1 µM の 4OHT で図と説明文に示す時間処理した。Doxycycline (Sigma-Aldrich, Cat# D9891-1G) は dH₂O に溶解し、1mg/ml の濃度とした。Doxycycline 誘導性の PrimPol, RNaseH1, および HP1α発現のために、細胞を 1 µg/ml の doxycycline で図と説明文に示す時間処理した。

ATR 阻害剤 berzosertib (Selleck, Cat# S7102, 1mM ストック) および Chk1 阻害剤 rabusertib (Selleck, Cat# S2626, 1mM ストック) を DMSO に溶解し、記載する最終濃度で投与した(図参照)。Cycloheximide (CHX; Wako, Cat# 037-20991, 10mg/ml ストック) を dH₂O に溶解し、最終濃度 300 µg/ml で投与した。Roscovitine (Calbiochem, Cat# 557360-5MG, 10mM ストック) を DMSO に溶解し、最終濃度 25 µM で投与した。5,6-Dichloro-1-β-D-ribofuranosyl-1H-benzimidazole (DRB; Sigma-Aldrich, Cat# D1916-10MG, 100mM ストック) を DMSO に溶解し、最終濃度 100 µM で投与した。Chloroquine (CQ; Sigma-Aldrich, Cat# C6628-25G) を 4 mM の濃度になるように dH₂O に溶解し(各実験時に新規に調製), 最終濃度 40 µM で投与した。GSK126 (Selleck, Cat# S7061, 5mM ストック) を DMSO に溶解し、最終濃度 2.5 µM で投与した。

PhosSTOP (Sigma-Aldrich, Cat# 04906837001) および cOmplete (Sigma-Aldrich, Cat# 11697498001) は、メーカーの指示に従って in vitro にて buffer に溶解した。

RNAi による遺伝子サイレンシング

Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Cat# 13778-150) を用いたリバーストランスフェクション法により、細胞を 1 nM (Ambion 製品) または 5 nM (Integrated DNA

Technologies (IDT) 製品) の siRNA でトランスフェクションした. siRNA と共に 18~24 時間インキュベートした後, 細胞培地を新鮮な培地に交換した. 上表に示す siPRIMPOL (Ambion); siHP1 α (Ambion); siHP1 β (Ambion) は Thermo Fisher Scientific から購入した. siUTR-PRIMPOL (Ambion; siPP#5) および siUTR-HP1 α (Ambion; siHP1 α #3) はカスタムデザインした.

コントロール siRNA として Silencer Select Negative Control siRNA (Ambion, Cat# 4390843) を用いた. siUTR-PRIMPOL (siPPol#4) と IDT negative control siRNA (IDT, Cat# 51-01-14-03) は IDT から購入した.

RNA 発現量と患者生存率の相関解析

TCGA プロジェクトの LUAD サンプルに関する RNA-seq および臨床データは, Genomic Data Commons Data Portal から入手した. LUAD サンプルに関連する RNA-seq および臨床データは, 国立がん研究センターバイオバンク (NCC, 日本) から入手した.

NCC Biobank のサンプルの RNA-seq は, 916 人の患者から得た瞬間凍結がん組織サンプルより単離した 1.1 μ g の RNA を用いて実施した. Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) で品質評価 (RIN > 6.0) を行った後, TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina) を用いてポリアデニル化 RNA ライブラリーを作製し, Illumina HiSeq 2500 プラットフォームで 2 \times 75 bp/2 \times 100 bp ペアエンドリード, または NovaSeq 6000 プラットフォームでシーケンスした. リードマッピングは, ヒトゲノム (GRCh38) およびトランスクリプトームデータ (GENCODE ver.31) を参照データセットとして, STAR ver.2.4.2a を用いて行った. Transcripts per million (TPM) 値は StringTie (ver.2.0.4) プログラムを用いて算出した. 本解析は, 国立がんセンターの施設審査委員会の承認を得た.

サンプルは, ATR 発現, PrimPol 発現, KRAS 変異の有無, 患者の喫煙歴の有無によってグループ分けした. 低発現群 (Av_Low) と高発現群 (Av_High) の平均発現量が次の条件を満たすように, コホートを 2 群 (High 群と Low 群) に分けた: 平均発現量の比 [(Av_High) / (Av_Low)] が最小 (通常~2) であるか, 1.5 未満でないこと. 各群の OS は, log-rank (Mantel-Cox) 検定による Kaplan-Meier 法で解析した.

ウェスタンブロット分析

細胞を sampling buffer (120 mM Tris-HCl (pH 6.8), 12% glycerol, 4% SDS, 200 mM DTT, 0.004% bromophenol blue) で溶解し, 95 $^{\circ}$ C で 5 分間変性させた. 細胞溶解液中のタンパク質濃度は, Bradford assay (XL-Bradford, Apro Science, Cat# KY-1031) で推定した. 等量のタンパク質を SDS-PAGE (10%SDS-ポリアクリルアミドゲル) で 120V, 2 時間分離した後, polyvinylidene difluoride (PVDF) メンブレン (Immobilon-P, Millipore, Cat# IPVH00010) に 150mA, 4 $^{\circ}$ C で 16 時間以上転写した. PVDF メンブレンを TBST (25 mM

Tris-HCl (pH 7.8) , 140 mM NaCl, 0.1% Tween 20) を溶媒とする 5%スキムミルクにて室温 (RT) で 20 分間ブロッキングし, 5%スキムミルクで希釈した上表に示す一次抗体でプローブした (0.02% NaN₃ を添加) . TBST で 3 回洗浄後, PVDF メンブレンを 5%スキムミルクで希釈した Horseradish Peroxidase (HRP) 標識 AffiniPure Goat Anti-Rabbit または Mouse IgG (1:5000, Jackson ImmunoResearch, Cat# 111-035-003 または Cat#115-035-003) にて, RT で 1 時間インキュベートし, TBST で 5 回洗浄した. ブロットは, Western Lightning Plus ECL Reagent (PerkinElmer, Cat# NEL105001EA) を用いて, メーカーの指示に従って現像し, LAS 3000 luminescent image analyzer (富士フイルム) で撮影した.

長期細胞増殖 (Long-term time-to-progression : TTP) アッセイ

合計 2×10^5 個の細胞を, 6cm プレートにて $0.1 \mu\text{M}$ の 4OHT で処理し, 3~4 日間培養した後, 細胞を集め, 数を数えた. この 2 次元培養を, 4OHT による KRAS^{G12V} の殺細胞効果に応じて, 約 30 日間継続した.

増殖率 (μ) を次の式に従って計算した: $\mu = (\ln N - \ln N') / t$, ここで N は数えた細胞数, N' は前週に播種した細胞数, t は培養日数である. 各計測日で計算された日ごとの増殖率 (μ) に基づき, $\ln N_x = \ln N_0 + \mu * T$ の式に従って計測時点の総細胞数 (N_x) を推定した. ここで, N_0 は最初の播種時点の細胞数, T は培養日数の合計である.

足場非依存性増殖アッセイ

合計 2×10^4 個の細胞を培地で希釈した 1 ml の 0.4 %ソフトアガー溶液 (SeaPlaque 寒天, Lonza 社, SeaPlaqueTM, Cat# 50101) に懸濁し, 1.5 ml の 0.7 %ソフトアガー培地上に播種した. $0.1 \mu\text{M}$ の 4OHT を含む液体培地を 3~4 日ごとに加えた. 37°C で 30 日間培養した後, 細胞を 20%MeOH で希釈した 0.01% の crystal violet にて RT で 1 時間染色し, LAS 3000 luminescent image analyzer (富士フイルム) を用いて撮影した.

RNA 抽出とリアルタイム PCR

合計 1×10^5 個の細胞を 6 ウェルプレートに播種した. 薬剤処理後, ISOGEN II (Nippon Gene, Cat# 311-07361) を用いて, メーカーの指示に従って全 RNA を精製した. 抽出した RNA を TE buffer (pH 8.0, Nippon Gene, Cat# 314-90021) に懸濁した.

ATR, PrimPol および ActinB mRNA を検出するために, mRNA ライブラリーの逆転写を, High-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Cat# 4387406) を用いて, メーカーの指示に従って行った. SYBR Green リアルタイム PCR は, KAPA SYBR FAST ABI Prism qPCR Kit (Kapa Biosystems, Cat# KK4604) を用いて行った. 上表のプライマーを 500 nM で使用した.

miR185 を検出するために, TaqManTM MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Cat# 4366596) と TaqManTM MicroRNA Assays (Applied Biosystems, RNU48:

Assay ID# 001006, miR185: Assay ID# 002271) を用いて, メーカーの指示に従って逆転写を行った. TaqMan real-time PCR は, TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems, Cat# 4444556) を使用し, メーカーの指示に従って実施した.

PCR は StepOnePlus thermocycler (Applied Biosystems) を用いて行った. 比較 Ct ($\Delta\Delta C_t$) 法を選択し, mRNA の定量を検証した.

増殖アッセイ

合計 2000 個の細胞を 96 ウェルプレートに播種し, 0.1 μ M の 4OHT で処理した. 4OHT 処理 7 日後に, PrestoBlue™ を用いて増殖細胞数を測定した. PrestoBlue™ Cell Viability Reagent (Invitrogen, Cat# A13262) を, メーカーの説明書に従い, 細胞に直接加え, 37°C で 1 時間インキュベートした. 光学密度 (励起: 560 nm, 発光: 590 nm) を Biotek Epoch マイクロプレートリーダーで測定し, Gen5 2.05 ソフトウェア (Biotek) で解析した.

HP1 α KD 効果の検証のために, 1.5×10^5 個の細胞を 1 nM siRNA で 2 日間トランスフェクトし, 0.1 μ M 4OHT を添加した 96 ウェルプレートに再び播種した. 5 日間のインキュベーション後, 細胞増殖は Cell Titer-Glo 2.0 Assay (Promega, Cat# G9243) を用いて, メーカーの指示に従って評価した. 発光は Biotek Epoch マイクロプレートリーダーで測定し, Gen5 ver.2.05 (Biotek) で解析した.

DNA ファイバー法と S1 ファイバー法

合計 1×10^5 個の細胞を 6 ウェルプレートに播種した. 薬剤処理後, 細胞を 100 μ M の IdU (5-iodo-2'-deoxyuridine, Sigma-Aldrich, Cat# I7125-5G) で 20 分間標識し, PBS で 3 回洗浄した後, 100 μ M CldU (5-chloro-2'-deoxyuridine, Sigma-Aldrich, Cat# C6891-100MG) で 40 分間標識し, PBS で洗浄した. 標識細胞をトリプシン処理し, 800 $\times g$, 5 分間, 4 °C でペレット化した後, 200 μ l の PBS に再懸濁した.

S1 ファイバーアッセイは, トリプシン処理前の標識細胞を CSK100 (10 mM MOPS (pH 7.0), 100 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 300 mM sucrose, 0.5% Triton X-100) にて 10 分間 RT で透過処理し, S1 buffer (30 mM sodium acetate (pH 4.6), 50 mM NaCl, 10 mM zinc acetate, 5% glycerol) で 2 回穏やかに洗浄し, S1 buffer で 10 U/ml に希釈した S1 スクレアーゼ (Invitrogen, Cat # 18001-016) で 37°C にて 30 分間処理し, スクレイパーを用いて 1% BSA (Nacalai Tesque, Cat # 01860-07) を含む 500 μ l の PBS に懸濁した. 細胞核を 4900 $\times g$, 4°C で 5 分間ペレット化し, 上清 300 μ l を除去し, 200 μ l を残した. 細胞核をピペッティングでゆっくりと再懸濁した.

標準 DNA ファイバー法と S1 ファイバー法の両方で, 100 μ l の固定液 (3:1 MtOH: acetic

acid)を200 μ lの細胞懸濁液に滴下にて添加した。この操作を3回繰り返した。続いて500 μ lの固定液を2回に分けて加えた。細胞または核を800 $\times g$, 5分間, 4°Cでペレット化し, 最終濃度が \sim 1000 細胞/ μ lになるように固定液に再懸濁した。

50 μ lの固定細胞をスライドガラス (Matsunami, Cat# S2112) にスポットした。3分間乾燥させた後, スライドを溶解液 (200 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM EDTA, 0.5% SDS) に37°Cにて20分間浸した。細胞から溶出したDNAを, スライドを高湿度のチャンバー内で少なくとも30分間傾けることにより伸長させた。スライドを固定液に20分間浸し, 4°Cで一晩乾燥させた (O/N)。

ファイバーの免疫染色では, ファイバーをPBSで5分間ずつ3回水和し, 2.5 M HClに1時間浸してDNAを変性させ, PBSで5分間ずつ3回洗浄した。ブロッキング (PBS 溶媒 5% BSA および 0.1% Tween 20) を1時間行った後, スライドをブロッキング溶液で希釈した IdU 抗体 (1:25, BD Biosciences, 347580) および CldU 抗体 (1:100, Abcam, ab6326) と共に37°Cで2時間インキュベートしてDNAを標識し, PBST (0.1% Tween 20 を含む PBS) で3回洗浄した。続いてブロッキング溶液で希釈した Alexa Fluor 488 標識抗ラット IgG (1:500, Invitrogen, Cat# A11006) および Alexa Fluor 555 標識抗マウス IgG (1:250, Invitrogen, Cat# A21422) を1時間インキュベートした。染色したスライドをPBSTで3回洗浄し, ProLong Gold Antifade (Invitrogen, Cat# P36980) で包埋した。

蛍光顕微鏡 (Celldiscoverer 7, Zeiss) を用いて画像を取得し, ImageJ (v2.0.0-rc-69, National Institutes of Health) を用いて解析した。赤色 (IdU) と緑色 (CldU) の連続した軌跡を測定し, マイクロメートル単位の長さを塩基対 (1 μ m = 3.5kb) に換算した。最後に, フォークの速度を標識時間から計算した。各サンプルで合計200 \sim 500本のファイバーを測定し, 無作為に選んだ200本のファイバーを図に示した。

蛍光免疫染色

コラーゲンコートした8ウェルチャンバーディッシュに, 合計 1×10^4 個の細胞を播種した。薬剤処理後, 細胞を氷冷PBSで5分間プレ固定し, pre-extraction buffer (20 mM MOPS (pH7.0) および 0.05% Triton X-100, PBS 溶液) を用いて氷上で5分間プレ透過処理を行った。細胞をPBS 溶媒 4% paraformaldehyde (PFA) で10分間固定した後, PBS 溶媒 0.25% Triton X-100 で10分間透過処理した。細胞内に取り込まれた非変性 BrdU を検出するため, 細胞をさらに氷冷 MtOH で10分間固定した。Wash buffer (PBS 溶媒 3% BSA および 0.05% Tween 20) にて37°Cで1時間ブロッキングした後, Wash buffer にて希釈した上表に示す一次抗体とともに37°Cで1時間または4°CでO/Nインキュベートした。

細胞をWash bufferで3回洗浄し, Alexa Fluor 標識二次抗体をRTで1時間インキュベートした。3回の洗浄後, 核を1 μ g/ml DAPI で染色し, VECTASHIELD で包埋した。蛍光顕微鏡 (Celldiscoverer 7, Zeiss) を用いて免疫蛍光画像を取得し, 蛍光強度解析を行った (Zen

v2.6, Zeiss) .

PrimPol リン酸化プロテオミクスアッセイ

薬剤処理後, 1.5×10^7 個の細胞を PhosSTOP 添加 PBS で洗浄し, 8ml の lysis buffer (30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.5% NP40, PhosSTOP, cOmplete, 1 mM dithiothreitol (DTT)) で溶解した. 100 U/ml の Benzonase にて $4^\circ C$ で 1 時間処理した後, 不溶分画を $20000 \times g$, $4^\circ C$ で 10 分間遠心しペレット化した. 可溶分画を回収し, タンパク質濃度を Bradford assay で推定した. 等量のタンパク質を含むサンプルを, Protein-G Sepharose ビーズ (Cytiva, Cat# 17061802) に結合させた抗 myc-tag 抗体 ($15 \mu g / 1.5 \times 10^7$ 細胞, MBL, Cat# M192-3) と共に $4^\circ C$ にて 4 時間インキュベートし, ビーズを lysis buffer で 3 回洗浄した. 免疫沈降したタンパク質を sampling buffer で熱変性させ, SDS-PAGE で分離した. タンパク質は, SYPRO Ruby Protein Gel Stain (Invitrogen, Cat# S12000) を用いて, メーカーの指示に従って染色した.

タンパク質のバンドを切り出し, ゲル片を脱染, 洗浄し, DTT 還元と iodoacetamide alkylation の後, タンパク質をトリプシンで $37^\circ C$ にて O/N で消化した. 得られたトリプシン処理ペプチドは, 30% acetonitrile, 0.3% trifluoroacetic acid and 100% acetonitrile で順次処理してゲル片から抽出した. 抽出液を真空遠心機で蒸発させて有機溶媒を除去し, 逆相 C18 StageTips で脱塩・濃縮した. その後, リン酸化ペプチドの固定化金属アフィニティークロマトグラフィー (IMAC) 濃縮を行った.

LC-MS/MS は UltiMate 3000 Nano LC システム (Thermo Fisher Scientific) と HTC-PAL autosampler (CTC Analytics) を Q Exactive hybrid quadrupole-Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) に接続して行った. ペプチドを分析カラム ($75 \mu m \times 30 cm$, ReproSil-Pur C18-AQ, $1.9 \mu m$ 樹脂を充填) に供給し, 280 nl/分の流速で, 85 分間, 5% から 30% の濃度勾配溶媒 B (0.1% formic acid (FA) , 90% acetonitrile) を用いて分離した. Q Exactive 装置はデータ依存モードで操作した. Survey full-scan MS spectra (m/z 350 to 1800) は, ターゲット値 3×10^6 までイオン蓄積した後, Orbitrap で 70,000 の分解能で取得した. 動的排除時間は 20 秒に設定した. 12 個の最も強い多価イオン ($z \geq 2$) を順次 1×10^5 の目標値まで蓄積し, 最大注入時間 120 ms, 分解能 35,000 の高エネルギー衝突解離 (HCD) により衝突セル内で断片化した. 標準的な質量分析条件は以下の通り: スプレー電圧 2 kV, 加熱キャピラリー温度 $250^\circ C$, 規格化 HCD 衝突エネルギー 25%. MS/MS イオン選択閾値は 2.5×10^4 カウントに設定した. 分離幅は 2.0 Da とした.

生の MS データは, Andromeda 検索エンジンによる MaxQuant (ver.1.6.14.0) で処理した. MS/MS スペクトルは, UniProt human データベース (<https://www.uniprot.org>) に対して, 次の検索パラメータで検索した: 完全なトリプシン特異性, 最大 2 つのミス切断部位, 固定

修飾としてシステイン残基の carbamidomethylation. 可変修飾としてセリン, スレオニン, チロシンのリン酸化, N 末端タンパク質のアセチル化, メチオニン酸化. タンパク質群, ペプチド, リン酸化部位の偽発見率 (FDR) は<0.01 であった.

クロマチン分画

合計 2×10^5 個の細胞を 60 mm ディッシュに播種した. 薬剤処理後, 細胞をスクレイパーで回収し, $800 \times g$, 4°C で 5 分間遠心してペレット化し, 120 μl の PBS に再懸濁した. 細胞の約 15% をインプットサンプルとして回収した. 細胞を再度ペレット化し, 0.2% Triton X-100 を添加した 50 μl の buffer A (10 mM HEPES-KOH pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.34 M sucrose, 10% glycerol, PhosSTOP, cOmplete, 1 mM DTT) に再懸濁した. 氷上で 5 分間インキュベートした後, 核分画を $2500 \times g$, 4°C で 5 分間遠心して沈殿させ, 上清を細胞質分画として回収した. buffer A で洗浄後, 核分画を 100 μl の buffer B (3mM EDTA, 0.2mM EGTA, 1mM DTT) に懸濁し, 氷上で 20 分間インキュベートした. クロマチン分画を沈殿させ, buffer B で洗浄し, 最後に $20,000 \times g$ 5 分間, 4°C で遠心してペレット化した. 分画サンプルを sampling buffer で熱変性させ, タンパク質濃度を Bradford assay で推定した. 等量のタンパク質を含むサンプルを SDS-PAGE で分離し, ウェスタンブロッティングで分析した.

核内 EU 取り込みアッセイ

Click-iT RNA Alexa Fluor 594 Imaging Kit (Invitrogen, Cat# C10330) を用いて行った. 薬剤処理後, 細胞を 1 mM EU で 1 時間または 23 時間標識し, PBS 溶媒 4% PFA で 15 分間固定した. 固定した細胞を 0.5% Triton X-100 で 15 分間透過処理した. Click-iT 反応は, メーカーの指示に従って行った. 核を 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI で染色し, スライドを VECTASHIELD (Vector Laboratories, Cat# H-1000) で包埋した. 蛍光顕微鏡 (Celldiscoverer 7, Zeiss) で画像を取得し, 強度解析を行った (Zen v2.6, Zeiss) .

スロットブロットアッセイ

合計 1×10^5 個の細胞を 6 ウェルプレートに播種した. 薬剤処理後, 細胞をトリプシン処理し, $800 \times g$, 4°C で 5 分間遠心してペレット化し, 200 μl の PBS に再懸濁した. 全 DNA と RNA を QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Cat# 51106) を用いてメーカーの指示に従って精製し, 10 mM TE buffer (pH 8.0) に懸濁した. DNA:RNA ハイブリッドを消化するために, 核酸溶液を 50 mU/ μl RNaseH1 (NEB, Cat# M0297) で 37°C にて 1 時間処理し, 5 mM EDTA で反応を終了させた. DNA 濃度は NanoDrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific) を用いて推定した.

合計 125 ng の核酸を, BIO-DOT SF 装置 (Bio-Rad) を用いて, メーカーの指示に従ってナイロン膜 (Amersham Hybond-N, GE Healthcare, Cat# RPN303N) 上にスポットし, 紫外

線架橋 (120 mJ/cm²) を行った。ウェスタンブロット法で述べたように、メンブレンをブロッキングし、Block Ace (DS Pharma Biomedical) で希釈した S9.6 (1:500, Millipore, Cat# MABE1095) と抗 dsDNA (1:5000, Abcam, Cat# ab27156) の一次抗体でプローブした後、HRP 標識二次抗体とインキュベートし、Western Lightning Plus ECL 試薬でブロットを現像した。S9.6 のシグナルは、DNA:RNA ハイブリッドの相対量を決定するために、dsDNA シグナルに基づいて正規化した。

MNase 感受性アッセイ

合計 8×10^4 個の細胞をコラーゲンコートした 35 mm ディッシュに播種した。薬剤処理後、細胞を CSK100 で 10 分間 RT にて透過処理し、MNase buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM NaCl, 5 mM CaCl₂) で穏やかに洗浄し、MNase buffer で 75 gelU/ml に希釈した MNase (New England Biolab, Cat# M0247S) で 25°C にて 5~20 分間処理した。MNase 処理した細胞を 250 μ l の TES buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA, 0.5% SDS) で溶解した。この細胞溶解液を、1 mg/ml RNaseA (NipponGene, Cat# 318-06391) で 45 分間、200 μ g/ml Proteinase K (QIAGEN, Cat# 19133) で 90 分間、50°C にて順次処理した後、等容量の phenol/chloroform (NipponGene, Cat# 311-90151) を加えた。不溶分画を 20,000 x g で沈降させ、上清を 0.5 M の NaCl と混合し、EtOH 洗浄を行った。抽出した DNA を TE buffer (pH8.0) に懸濁し、1 レーンあたり 1 μ g の DNA を 1.2% アガロースゲル (Fast Gene, Cat# NE-AG02) で電気泳動にて分離し、EtBr (NipponGene, Cat# 315-90051) で染色した。画像は LAS 3000 luminescent image analyzer (FujiFilm) で撮影し、ImageJ で解析を行った。

近接ライゲーションアッセイ (proximity ligation assay : PLA)

コラーゲンコートした 8 ウェルチャンバーディッシュに、合計 1×10^4 個の細胞を播種した。ssDNA ギャップと H3K27me3 の近接を可視化するため、細胞を 10 μ M BrdU (Sigma-Aldrich, Cat# B5002-1G) 含有培地で 48 時間培養した後、BrdU 非含有培地で 24 時間培養した。S 期細胞は 10 μ M EdU を 30 分取り込ませ、標識した。蛍光免疫染色法で述べたように、細胞をプレ透過処理し、固定し、Click-iT Plus EdU Alexa Fluor 488 Imaging Kit (Invitrogen, Cat# C10337) を用いてメーカーの指示に従って処理した後、ブロッキングを行い、一次抗体を O/N, 4°C でインキュベートした。PLA は、Duolink In Situ PLA キット (Sigma-Aldrich, Cat# DUO92001, Cat# DUO92005 and Cat# DUO92008) を用い、メーカーの指示に従って次の一次抗体で行った：抗 BrdU (1:1000, GE Healthcare, Cat# RPN202) および抗 H3K27me3 (1:1600, Cell Signaling Technology, Cat# 9733) または抗 PCNA (1:500, Santa Cruz, Cat# sc-56) および抗リン酸化 POLII (Ser2) (1:10000, Novus, Cat# NB100-1805)。核は 1 μ g/ml DAPI で染色し、スライドは VECTASHIELD で包埋した。蛍光顕微鏡 (Celldiscoverer 7, Zeiss) で PLA シグナルの数を数え (Zen v2.6, Zeiss)、または

共焦点レーザー顕微鏡 (TCS SP8, Leica) で代表的な核の写真撮影を行った。

全トランスクリプトーム RNA-seq

薬剤処理後, 1×10^6 個の細胞を PBS で洗浄し, RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, Cat# 74134) を用いて, メーカーの指示に従って全 RNA を精製した。

DNBSEQ-G400 (MGI tech) プラットフォームで, メーカーの指示に従って, リード長 150 塩基のペアエンドシーケンスを行った。生シーケンスデータの品質は FastQC ソフトウェア (ver.0.11.9) で確認した。アライメントと TPM 計算は, ヒト cDNA リファレンスをもとに Kallisto を用いて行った。Kallisto (ver.0.46.0) の出力ファイルは, R ソフトウェア (ver.3.6.3) の tximport (ver.1.18.0) パッケージを用いて発現行列に変換した。出力された TPM カウントを解析に用いた。遺伝子座内の H3K27me3 ChIP-seq シグナルの分布は, deepTools94 の scale-regions 関数で可視化した。SAEC の H3K27me3 ChIP-seq データは, Suzuki, A., et al. (2014) を使用した。

小核 (MN) 評価アッセイ

薬剤処理後, 細胞を PBS 溶媒 4%PFA で固定し, 上述のようにリン酸化 HistoneH3 (Ser10) 抗体 (1:500, Millipore, Cat# 06-570) で染色した。蛍光顕微鏡 (Celldiscoverer 7, Zeiss) で撮影後, MN または blebs を有する細胞数を数えた。Phospho-HistoneH3 (Ser10) 陽性細胞は, 核膜が消失しているため除外した。サンプルごとに少なくとも 200 個の細胞を解析した (Zen v3.1, Zeiss)。

コロニー形成効率アッセイ

合計 1×10^4 個の細胞を 6 ウェルプレートに播種し, 4OHT および berzosertib (ATRi) で 6 日間処理した。培地は細胞播種の 3 日後に交換した。その後, 細胞を 20% MtOH で希釈した 0.5% crystal violet で 30 分間染色し, 蒸留水で 3 回洗浄した。乾燥後, LAS-3000 imager (Fujifilm) を用いて, 各 6 ウェルプレート全体の画像を取得した。各ウェルの平均グレイ値は ImageJ を用いて定量した。

WGS

処理後, $\sim 2 \times 10^5$ 個の細胞を 250 μ l の TES buffer (10mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM EDTA, 0.5%SDS) で溶解した。細胞溶解液は, 260 μ l の phenol/chloroform (NipponGene, Cat# 311-90151) を添加する前に, 1 mg/ml の RNaseA (NipponGene, Cat# 318-06391) で 45 分間, 200 μ g/ml の proteinase K (QIAGEN, Cat# 19133) で 90 分間, 50°C で順次処理した。不溶性分画を 20,000 $\times g$ で遠心して沈降し, 上清を 0.5 M NaCl と混合し, EtOH で 2 回洗浄した。抽出した DNA を 50 μ l の TE buffer (pH8.0) に懸濁した。

ゲノムライブラリー調製は TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit (Illumina) を用いて行った. NovaSeq 6000 システム (Illumina) を用いて, 150 bp ペアエンドリードによるシーケンスを, シーケンス深度~120 倍で行い, シーケンスリードを GATK Best Practices ワークフローに従って BWA-MEM (ver.0.7.17) を用いてヒト参照ゲノム (hg38) にアライメントした. SAEC 細胞を正常相当検体とし, Control-ER-Kras-G12V, RSTC#2, RSTC#5, RSTC#7 細胞を腫瘍相当検体とした. 体細胞 SNV および小さな挿入と欠失 (INDEL) は, Mutect2 (gatk version 4.1.2.0) を用いて腫瘍-正常モードでコールし, 腫瘍検体のバリエーションから正常検体のバリエーションを差し引いた. これらのバリエーションは FilterMutectCalls と FilterAlignmentArtifacts でフィルタリングされ, バリエーション対立遺伝子頻度 (VAF) が 0.1 未満のものは除去された.

構造変異は Manta プログラム (ver.1.6.0) で検出し, ペアリードとスプリットリードの不一致から break-end junction を同定した. 信頼性の高い再配列を同定するために, 次の基準で選別した: PASS in the FILTER field ; VAF > 0.1 ; split read >0. Circos プロットは shinyCircos プログラム (ver.1) で作成した. FACETS (ver.0.6.2) を用い, 推奨パラメータ “cval = 400” で, アレル特異的のコピー数, 腫瘍純度, 倍数性を推定した.

繰り返し領域を除く一塩基置換 (SBS) は, SigproflerMatrixGenerator (ver.1.2.12) を用いて 3 塩基のコンテキストに分類し, de novo のシグネチャーは SigproflerExtractor (ver.1.1.2) を用いてデフォルトのパラメータで非負行列分解 (NMF) を用いて抽出した. これらのシグネチャーを, コサイン類似度を用いて COSMIC シグネチャー (ver.3.3) に分解し, 各サンプルに割り当てた.

統計解析

棒グラフについて, 生物学的反復の場合は各実験の平均値 \pm SEM, 技術的反復の場合は計測の平均値 \pm SD で示した. 2 群比較の場合, 統計的有意性は t 検定で決定した (図の説明を参照). 多群比較では, 多重比較検定によって統計的有意性を決定した (図の説明を参照). すべての統計解析は Prism 9 ソフトウェアを用いて行い, $p < 0.05$ を統計的に有意とみなした.

謝辞

レトロウイルスプラスミドと SAEC を提供して下さった清野透先生, RPE-1-puro 細胞を提供して下さった Helfrid Hochegger 先生, H3122 細胞を提供して下さった小林祥久先生, レンチウイルスプラスミドを提供して下さった中西真先生, RNA-seq 解析について有益なアドバイスを下さった山本雄介先生, 研究生活を手厚くサポートして下さった高松教授と松尾教授, ディスカッションに参加して下さった吉見先生と研究室のメンバー, そして6年にわたる指導を賜った塩谷文章先生に感謝を申し上げます.

参考文献

- [1] R. A. Weinberg, *The Biology of Cancer*, 2nd Editio. New York: W.W. Norton & Company, 2013.
- [2] A. G. Knudson, “Two genetic hits (more or less) to cancer,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 1, no. 2, pp. 157–162, Nov. 2001, doi: 10.1038/35101031.
- [3] M. Ghashghaie, M. Köberle, U. Mrowietz, and I. Bernhardt, “Proliferating tumor cells mimic glucose metabolism of mature human erythrocytes,” *Cell Cycle*, vol. 18, no. 12, pp. 1316–1334, 2019, doi: 10.1080/15384101.2019.1618125.
- [4] S. Negrini, V. G. Gorgoulis, and T. D. Halazonetis, “Genomic instability — an evolving hallmark of cancer,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 11, no. 3, pp. 220–228, Mar. 2010, doi: 10.1038/nrm2858.
- [5] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Hallmarks of Cancer: The Next Generation,” *Cell*, vol. 144, no. 5, pp. 646–674, Mar. 2011, doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [6] C. Tomasetti and B. Vogelstein, “Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions,” *Science (80-.)*, vol. 347, no. 6217, pp. 78–81, Jan. 2015, doi: 10.1126/science.1260825.
- [7] P. Kotsantis, E. Petermann, and S. J. Boulton, “Mechanisms of oncogene-induced replication stress: Jigsaw falling into place,” *Cancer Discov.*, vol. 8, no. 5, pp. 537–555, 2018, doi: 10.1158/2159-8290.CD-17-1461.
- [8] T. D. Halazonetis, V. G. Gorgoulis, and J. Bartek, “An oncogene-induced DNA damage model for cancer development,” *Science (80-.)*, vol. 319, no. 5868, pp. 1352–1355, 2008, doi: 10.1126/science.1140735.
- [9] N. Kakiuchi and S. Ogawa, “Clonal expansion in non-cancer tissues,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 21, no. 4, pp. 239–256, Apr. 2021, doi: 10.1038/s41568-021-00335-3.
- [10] S. Mukhopadhyay, M. G. Vander Heiden, and F. McCormick, “The metabolic landscape of RAS-driven cancers from biology to therapy,” *Nat. Cancer*, vol. 2, no. 3, pp. 271–283, Mar. 2021, doi: 10.1038/s43018-021-00184-x.
- [11] M. Saito, K. Shiraishi, H. Kunitoh, S. Takenoshita, J. Yokota, and T. Kohno, “Gene aberrations for precision medicine against lung adenocarcinoma,” *Cancer Sci.*, vol. 107, no. 6, pp. 713–720, Jun. 2016, doi: 10.1111/cas.12941.
- [12] Y. Pylayeva-Gupta, E. Grabocka, and D. Bar-Sagi, “RAS oncogenes: Weaving a tumorigenic web,” *Nat. Rev. Cancer*, vol. 11, no. 11, pp. 761–774, 2011, doi: 10.1038/nrc3106.
- [13] L. Huang, Z. Guo, F. Wang, and L. Fu, “KRAS mutation: from undruggable to druggable in cancer,” *Signal Transduct. Target. Ther.*, vol. 6, no. 1, p. 386, Dec. 2021, doi: 10.1038/s41392-021-00780-4.

- [14] P. Kotsantis *et al.*, “Increased global transcription activity as a mechanism of replication stress in cancer,” *Nat. Commun.*, vol. 7, no. 1, p. 13087, Dec. 2016, doi: 10.1038/ncomms13087.
- [15] J. C. Saldivar, D. Cortez, and K. A. Cimprich, “The essential kinase ATR: ensuring faithful duplication of a challenging genome,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 18, no. 10, pp. 622–636, Oct. 2017, doi: 10.1038/nrm.2017.67.
- [16] A. N. Blackford and S. P. Jackson, “ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response,” *Mol. Cell*, vol. 66, no. 6, pp. 801–817, Jun. 2017, doi: 10.1016/j.molcel.2017.05.015.
- [17] E. J. Brown and D. Baltimore, “ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality,” *Genes Dev.*, vol. 14, no. 4, pp. 397–402, 2000, doi: 10.1101/gad.14.4.397.
- [18] Y. Fang *et al.*, “ATR functions as a gene dosage-dependent tumor suppressor on a mismatch repair-deficient background,” *EMBO J.*, vol. 23, no. 15, pp. 3164–3174, 2004, doi: 10.1038/sj.emboj.7600315.
- [19] H. Niida *et al.*, “Cooperative functions of Chk1 and Chk2 reduce tumour susceptibility in vivo,” *EMBO J.*, vol. 29, no. 20, pp. 3558–3570, 2010, doi: 10.1038/emboj.2010.218.
- [20] D. W. Schoppy *et al.*, “Oncogenic stress sensitizes murine cancers to hypomorphic suppression of ATR,” *J. Clin. Invest.*, vol. 122, no. 1, pp. 241–252, Jan. 2012, doi: 10.1172/JCI58928.
- [21] A. J. López-Contreras, P. Gutierrez-Martinez, J. Specks, S. Rodrigo-Perez, and O. Fernandez-Capetillo, “An extra allele of Chk1 limits oncogene-induced replicative stress and promotes transformation,” *J. Exp. Med.*, vol. 209, no. 3, pp. 455–461, Mar. 2012, doi: 10.1084/jem.20112147.
- [22] J. Bianchi *et al.*, “PrimPol Bypasses UV Photoproducts during Eukaryotic Chromosomal DNA Replication,” *Mol. Cell*, vol. 52, no. 4, pp. 566–573, Nov. 2013, doi: 10.1016/j.molcel.2013.10.035.
- [23] S. García-Gómez *et al.*, “PrimPol, an Archaic Primase/Polymerase Operating in Human Cells,” *Mol. Cell*, vol. 52, no. 4, pp. 541–553, Nov. 2013, doi: 10.1016/j.molcel.2013.09.025.
- [24] S. Tirman *et al.*, “Temporally distinct post-replicative repair mechanisms fill PRIMPOL-dependent ssDNA gaps in human cells,” *Mol. Cell*, vol. 81, no. 19, pp. 4026–4040.e8, Oct. 2021, doi: 10.1016/j.molcel.2021.09.013.
- [25] A. Taglialatela *et al.*, “REV1-Pol ζ maintains the viability of homologous recombination-deficient cancer cells through mutagenic repair of PRIMPOL-dependent ssDNA gaps,” *Mol. Cell*, pp. 1–18, 2021, doi: 10.1016/j.molcel.2021.08.016.
- [26] A. L. Piberger *et al.*, “PrimPol-dependent single-stranded gap formation mediates

- homologous recombination at bulky DNA adducts,” *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, p. 5863, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-19570-7.
- [27] A. Quinet, S. Tirman, E. Cybulla, A. Meroni, and A. Vindigni, “To skip or not to skip: choosing repriming to tolerate DNA damage,” *Mol. Cell*, pp. 1–10, 2021, doi: 10.1016/j.molcel.2021.01.012.
- [28] L. J. Bailey, R. Teague, P. Kolesar, L. J. Bainbridge, H. D. Lindsay, and A. J. Doherty, “PLK1 regulates the PrimPol damage tolerance pathway during the cell cycle,” *Sci. Adv.*, vol. 7, no. 49, pp. 1–16, Dec. 2021, doi: 10.1126/sciadv.abh1004.
- [29] C. Otsubo *et al.*, “TSPAN2 Is Involved in Cell Invasion and Motility during Lung Cancer Progression,” *Cell Rep.*, vol. 7, no. 2, pp. 527–538, 2014, doi: 10.1016/j.celrep.2014.03.027.
- [30] K. Dendo *et al.*, “Induction of non-apoptotic programmed cell death by oncogenic RAS in human epithelial cells and its suppression by MYC overexpression,” *Carcinogenesis*, vol. 39, no. 2, pp. 202–213, Feb. 2018, doi: 10.1093/carcin/bgx124.
- [31] B. Shui *et al.*, “Oncogenic K-Ras suppresses global miRNA function,” *Mol. Cell*, vol. 83, no. 14, pp. 2509–2523.e13, 2023, doi: 10.1016/j.molcel.2023.06.008.
- [32] J. Wang *et al.*, “Repression of ATR pathway by miR-185 enhances radiation-induced apoptosis and proliferation inhibition,” *Cell Death Dis.*, vol. 4, 2013, doi: 10.1038/cddis.2013.227.
- [33] D. A. Jackson and A. Pombo, “Replicon clusters are stable units of chromosome structure: Evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells,” *J. Cell Biol.*, vol. 140, no. 6, pp. 1285–1295, 1998, doi: 10.1083/jcb.140.6.1285.
- [34] A. Quinet, D. Carvajal-Maldonado, D. Lemacon, and A. Vindigni, “DNA Fiber Analysis: Mind the Gap!,” *Methods Enzymol.*, vol. 591, pp. 55–82, 2017, doi: 10.1016/bs.mie.2017.03.019.
- [35] F. B. Couch *et al.*, “ATR phosphorylates SMARCA1 to prevent replication fork collapse,” *Genes Dev.*, vol. 27, no. 14, pp. 1610–1623, 2013, doi: 10.1101/gad.214080.113.
- [36] T. Moiseeva, B. Hood, S. Schamus, M. J. O’Connor, T. P. Conrads, and C. J. Bakkenist, “ATR kinase inhibition induces unscheduled origin firing through a Cdc7-dependent association between GINS and And-1,” *Nat. Commun.*, vol. 8, no. 1, p. 1392, Dec. 2017, doi: 10.1038/s41467-017-01401-x.
- [37] A. Quinet *et al.*, “PRIMPOL-Mediated Adaptive Response Suppresses Replication Fork Reversal in BRCA-Deficient Cells,” *Mol. Cell*, pp. 1–14, Oct. 2019, doi: 10.1016/j.molcel.2019.10.008.
- [38] S. Mourón *et al.*, “Repriming of DNA synthesis at stalled replication forks by human PrimPol,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 20, no. 12, pp. 1383–1389, Dec. 2013, doi:

10.1038/nsmb.2719.

- [39] K. P. M. Mehta *et al.*, “CHK1 phosphorylates PRIMPOL to promote replication stress tolerance,” *Sci. Adv.*, vol. 8, no. 13, p. 314, Apr. 2022, doi: 10.1126/sciadv.abm0314.
- [40] K. Kasho *et al.*, “A unique arginine cluster in PolDIP2 enhances nucleotide binding and DNA synthesis by PrimPol,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 49, no. 4, pp. 2179–2191, Feb. 2021, doi: 10.1093/nar/gkab049.
- [41] A. R. Carlos *et al.*, “ARF triggers senescence in Brca2-deficient cells by altering the spectrum of p53 transcriptional targets,” *Nat. Commun.*, vol. 4, pp. 1–3, 2013, doi: 10.1038/ncomms3697.
- [42] D. Sarni *et al.*, “Topoisomerase 1-dependent R-loop deficiency drives accelerated replication and genomic instability,” *Cell Rep.*, vol. 40, no. 13, p. 111397, Sep. 2022, doi: 10.1016/j.celrep.2022.111397.
- [43] S. Hamperl, M. J. Bocek, J. C. Saldivar, T. Swigut, and K. A. Cimprich, “Transcription-Replication Conflict Orientation Modulates R-Loop Levels and Activates Distinct DNA Damage Responses,” *Cell*, vol. 170, no. 4, pp. 774–786.e19, 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.07.043.
- [44] D. A. Matos, J.-M. Zhang, J. Ouyang, H. D. Nguyen, M.-M. Genois, and L. Zou, “ATR Protects the Genome against R Loops through a MUS81-Triggered Feedback Loop,” *Mol. Cell*, vol. 77, no. 3, pp. 514–527.e4, Feb. 2020, doi: 10.1016/j.molcel.2019.10.010.
- [45] A. Suzuki *et al.*, “Aberrant transcriptional regulations in cancers: Genome, transcriptome and epigenome analysis of lung adenocarcinoma cell lines,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. 22, pp. 13557–13572, 2014, doi: 10.1093/nar/gku885.
- [46] C. Davidovich, L. Zheng, K. J. Goodrich, and T. R. Cech, “Promiscuous RNA binding by Polycomb repressive complex 2,” *Nat. Struct. Mol. Biol.*, vol. 20, no. 11, pp. 1250–1257, Nov. 2013, doi: 10.1038/nsmb.2679.
- [47] Y. Long, T. Hwang, A. R. Gooding, K. J. Goodrich, J. L. Rinn, and T. R. Cech, “RNA is essential for PRC2 chromatin occupancy and function in human pluripotent stem cells,” *Nat. Genet.*, vol. 52, no. 9, pp. 931–938, 2020, doi: 10.1038/s41588-020-0662-x.
- [48] S. A. Quinodoz *et al.*, “RNA promotes the formation of spatial compartments in the nucleus,” *Cell*, vol. 184, no. 23, pp. 5775–5790.e30, Nov. 2021, doi: 10.1016/j.cell.2021.10.014.
- [49] S. Lambert and A. M. Carr, “Impediments to replication fork movement: Stabilisation, reactivation and genome instability,” *Chromosoma*, vol. 122, no. 1–2, pp. 33–45, 2013, doi: 10.1007/s00412-013-0398-9.
- [50] A. Mendez-Bermudez *et al.*, “Genome-wide Control of Heterochromatin Replication by the Telomere Capping Protein TRF2,” *Mol. Cell*, vol. 70, no. 3, pp. 449–461.e5, May 2018, doi: 10.1016/j.molcel.2018.03.036.

- [51] K. Kurashima *et al.*, “SMARCA4 deficiency-associated heterochromatin induces intrinsic DNA replication stress and susceptibility to ATR inhibition in lung adenocarcinoma,” *NAR Cancer*, vol. 2, no. 2, pp. 1–19, Jun. 2020, doi: 10.1093/narcan/zcaa005.
- [52] J. Schvartzman *et al.*, “Oncogenic IDH mutations increase heterochromatin-related replication stress without impacting homologous recombination,” *Mol. Cell*, pp. 1–10, 2023, doi: 10.1016/j.molcel.2023.05.026.
- [53] W. A. Krajewski, “Alterations in the internucleosomal DNA helical twist in chromatin of human erythroleukemia cells in vivo influences the chromatin higher-order folding,” *FEBS Lett.*, vol. 361, no. 2–3, pp. 149–152, Mar. 1995, doi: 10.1016/0014-5793(95)00144-X.
- [54] R. Catalano *et al.*, “A drug repurposing screening reveals a novel epigenetic activity of hydroxychloroquine,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 183, p. 111715, Dec. 2019, doi: 10.1016/j.ejmech.2019.111715.
- [55] Y. Ziv *et al.*, “Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 8, no. 8, pp. 870–876, Aug. 2006, doi: 10.1038/ncb1446.
- [56] P. Trojer and D. Reinberg, “Facultative Heterochromatin: Is There a Distinctive Molecular Signature?,” *Mol. Cell*, vol. 28, no. 1, pp. 1–13, Oct. 2007, doi: 10.1016/j.molcel.2007.09.011.
- [57] R. D. Hawkins *et al.*, “Distinct epigenomic landscapes of pluripotent and lineage-committed human cells,” *Cell Stem Cell*, vol. 6, no. 5, pp. 479–491, 2010, doi: 10.1016/j.stem.2010.03.018.
- [58] J. Boros, N. Arnoult, V. Stroobant, J.-F. Collet, and A. Decottignies, “Polycomb Repressive Complex 2 and H3K27me3 Cooperate with H3K9 Methylation To Maintain Heterochromatin Protein 1 α at Chromatin,” *Mol. Cell Biol.*, vol. 34, no. 19, pp. 3662–3674, 2014, doi: 10.1128/mcb.00205-14.
- [59] C. Baumann, R. Körner, K. Hofmann, and E. A. Nigg, “PICH, a Centromere-Associated SNF2 Family ATPase, Is Regulated by Plk1 and Required for the Spindle Checkpoint,” *Cell*, vol. 128, no. 1, pp. 101–114, Jan. 2007, doi: 10.1016/j.cell.2006.11.041.
- [60] A. Maya-Mendoza, P. Moudry, J. M. Merchut-Maya, M. Lee, R. Strauss, and J. Bartek, “High speed of fork progression induces DNA replication stress and genomic instability,” *Nature*, vol. 559, no. 7713, pp. 279–284, 2018, doi: 10.1038/s41586-018-0261-5.
- [61] J. Zeng, S. A. Hills, E. Ozono, and J. F. X. Diffley, “Cyclin E-induced replicative stress drives p53-dependent whole-genome duplication,” *Cell*, vol. 186, no. 3, pp. 528–542.e14, 2023, doi: 10.1016/j.cell.2022.12.036.
- [62] C. M. Bielski *et al.*, “Genome doubling shapes the evolution and prognosis of advanced cancers,” *Nat. Genet.*, vol. 50, no. 8, pp. 1189–1195, 2018, doi: 10.1038/s41588-018-0165-

1.

- [63] V. K. Singh, A. Rastogi, X. Hu, Y. Wang, and S. De, “Mutational signature SBS8 predominantly arises due to late replication errors in cancer,” *Commun. Biol.*, vol. 3, no. 1, pp. 1–10, 2020, doi: 10.1038/s42003-020-01119-5.
- [64] J. Bartkova *et al.*, “Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints,” *Nature*, vol. 444, no. 7119, pp. 633–637, Nov. 2006, doi: 10.1038/nature05268.
- [65] J. Bartkova *et al.*, “DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis,” *Nature*, vol. 434, no. 7035, pp. 864–870, Apr. 2005, doi: 10.1038/nature03482.
- [66] J. N. Bianco *et al.*, “Overexpression of Claspin and Timeless protects cancer cells from replication stress in a checkpoint-independent manner,” *Nat. Commun.*, vol. 10, no. 1, p. 910, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41467-019-08886-8.
- [67] L. Buchynska, I. Gordiienko, N. Glushchenko, and N. Iurchenko, “The KRAS, ATR and CHEK1 expression levels in endometrial cancer are the risk factors predicting recurrence,” *PLoS One*, vol. 19, no. 4, p. e0302075, Apr. 2024, doi: 10.1371/journal.pone.0302075.
- [68] M. Andrs *et al.*, “Excessive reactive oxygen species induce transcription-dependent replication stress,” *Nat. Commun.*, vol. 14, no. 1, p. 1791, Mar. 2023, doi: 10.1038/s41467-023-37341-y.
- [69] Y. Yan *et al.*, “The deubiquitinase USP36 Regulates DNA replication stress and confers therapeutic resistance through PrimPol stabilization,” *Nucleic Acids Res.*, vol. 48, no. 22, pp. 12711–12726, Dec. 2020, doi: 10.1093/nar/gkaa1090.
- [70] L. A. Poole and D. Cortez, “Functions of SMARCAL1, ZRANB3, and HLTF in maintaining genome stability,” *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, vol. 52, no. 6, pp. 696–714, 2017, doi: 10.1080/10409238.2017.1380597.
- [71] C. E. Bansbach, R. Bétous, C. A. Lovejoy, G. G. Glick, and D. Cortez, “The annealing helicase SMARCAL1 maintains genome integrity at stalled replication forks,” *Genes Dev.*, vol. 23, no. 20, pp. 2405–2414, 2009, doi: 10.1101/gad.1839909.
- [72] J. Xu *et al.*, “Super-resolution imaging reveals the evolution of higher-order chromatin folding in early carcinogenesis,” *Nat. Commun.*, vol. 11, no. 1, p. 1899, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41467-020-15718-7.
- [73] C. Policarpi, M. Munafò, S. Tsagkris, V. Carlini, and J. A. Hackett, “Systematic epigenome editing captures the context-dependent instructive function of chromatin modifications,” *Nat. Genet.*, vol. 56, no. June, 2024, doi: 10.1038/s41588-024-01706-w.
- [74] G. Menon *et al.*, “Proximal termination generates a transcriptional state that determines the rate of establishment of Polycomb silencing,” *Mol. Cell*, vol. 84, no. 12, pp. 2255–

2271.e9, 2024, doi: 10.1016/j.molcel.2024.05.014.

- [75] P. A. Konstantinopoulos *et al.*, “Berzosertib plus gemcitabine versus gemcitabine alone in platinum-resistant high-grade serous ovarian cancer: a multicentre, open-label, randomised, phase 2 trial,” *Lancet Oncol.*, vol. 21, no. 7, pp. 957–968, Jul. 2020, doi: 10.1016/S1470-2045(20)30180-7.
- [76] M. Serresi *et al.*, “Ezh2 inhibition in Kras-driven lung cancer amplifies inflammation and associated vulnerabilities,” *J. Exp. Med.*, vol. 215, no. 12, pp. 3115–3135, Dec. 2018, doi: 10.1084/jem.20180801.
- [77] A. Yokoyama *et al.*, “Age-related remodelling of oesophageal epithelia by mutated cancer drivers,” *Nature*, vol. 565, no. 7739, pp. 312–317, Jan. 2019, doi: 10.1038/s41586-018-0811-x.
- [78] V. Flury *et al.*, “Recycling of modified H2A-H2B provides short-term memory of chromatin states,” *Cell*, vol. 186, no. 5, pp. 1050–1065.e19, Mar. 2023, doi: 10.1016/j.cell.2023.01.007.
- [79] D. González - Acosta *et al.*, “PrimPol - mediated repriming facilitates replication traverse of DNA interstrand crosslinks,” *EMBO J.*, vol. 40, no. 14, pp. 1–17, Jul. 2021, doi: 10.15252/embj.2020106355.
- [80] J. K. Guo *et al.*, “Denaturing purifications demonstrate that PRC2 and other widely reported chromatin proteins do not appear to bind directly to RNA in vivo,” *Mol. Cell*, vol. 84, pp. 1–19, 2024, doi: 10.1016/j.molcel.2024.01.026.
- [81] E. Healy *et al.*, “The apparent loss of PRC2 chromatin occupancy as an artifact of RNA depletion,” *Cell Rep.*, vol. 43, no. 3, p. 113858, 2024, doi: 10.1016/j.celrep.2024.113858.
- [82] A. Hall Hickman and R. G. Jenner, “Apparent RNA bridging between PRC2 and chromatin is an artifact of non-specific chromatin precipitation upon RNA degradation,” *Cell Rep.*, vol. 43, no. 3, p. 113856, 2024, doi: 10.1016/j.celrep.2024.113856.
- [83] V. Parreno *et al.*, “Transient loss of Polycomb components induces an epigenetic cancer fate,” *Nature*, vol. 629, no. 8012, pp. 688–696, May 2024, doi: 10.1038/s41586-024-07328-w.



図を次項以降に掲載する．ソースデータ等は以下に記載するオンライン版英文雑誌にて公開されている．

雑誌名： Nature Communications

タイトル： *An ATR-PrimPol pathway confers tolerance to oncogenic KRAS-induced and heterochromatin-associated replication stress*

著者： Taichi Igarashi, Marianne Mazevet, Takaaki Yasuhara, Kimiyoshi Yano, Akifumi Mochizuki, Makoto Nishino, Tatsuya Yoshida, Yukihiro Yoshida, Nobuhiko Takamatsu, Akihito Yoshimi, Kouya Shiraishi, Hidehito Horinouchi, Takashi Kohno, Ryuji Hamamoto, Jun Adachi, Lee Zou and Bunsyo Shiotani

DOI： 10.1038/s41467-023-40578-2

掲載日： 2023 年 8 月 17 日

TCGA LUAD

Fig. 1

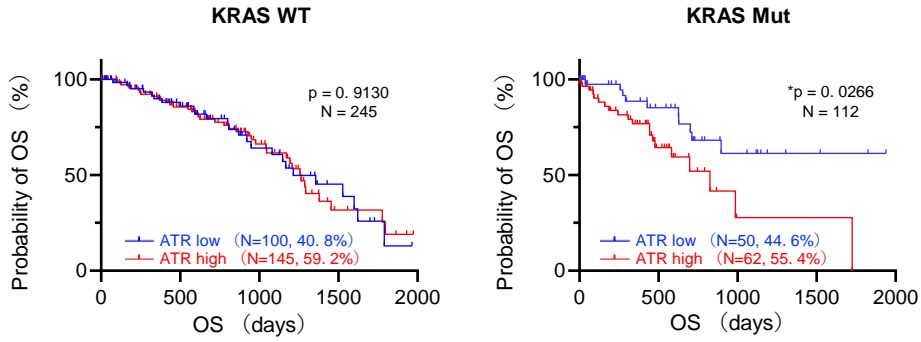
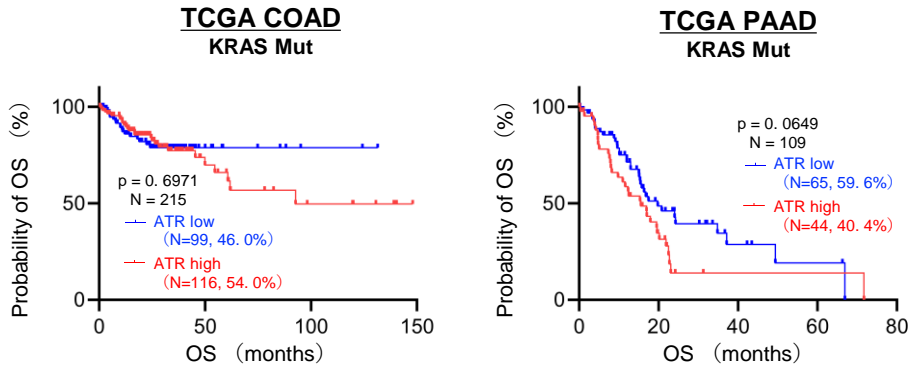
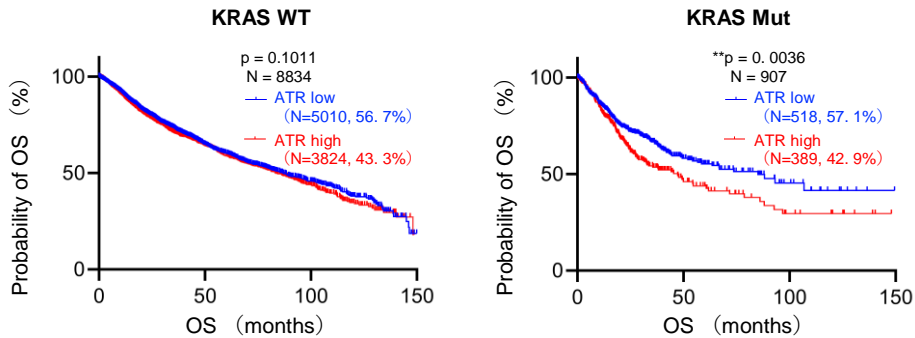


Fig. 2



TCGA Pan-Cancer KRAS WT

Fig. 3



発がん性KRASをもつ腺癌患者の予後はATR高発現により不良である

Fig. 1 (左) KRAS^{WT}または(右) KRAS^{mut}をもつLUAD患者357例のATR mRNA発現をもとに2群に分け, 全生存期間 (OS) を解析した. Log-rank p-valuesを示す.

Fig. 2 KRAS^{mut}をもつ(左) 結腸腺がん (COAD) 患者215例および, (右) 膵臓腺がん (PAAD) 患者109例のATR mRNA発現をもとに2群に分け, 全生存期間 (OS) を解析した. Log-rank p-valuesを示す.

Fig. 3 (左) KRAS^{WT}および(右) KRAS^{mut}をもつ全癌患者9741例のATR mRNA発現をもとに2群に分け, 全生存期間 (OS) を解析した. Log-rank p-valuesを示す.

SAEC-KRAS^{G12V} cells

Fig. 4

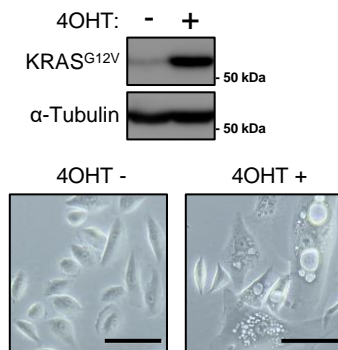
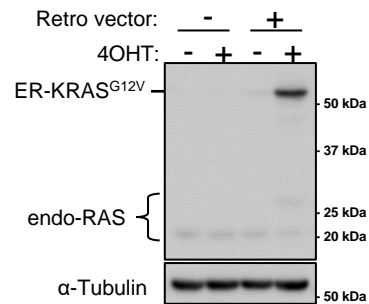


Fig. 5



実験モデルの代表写真とWB

Fig. 4 (上) エストロゲン受容体 (ER) -KRAS^{G12V}を導入したSAEC (コントロール細胞) を, 0.1 μ Mの4OHTで3日間処理した場合と無処理の場合のWB結果. 4OHTで誘導されたER-KRAS^{G12V}と, α -Tubulinの発現を検出した. (下) 画像は, 0.1 μ Mの4OHTで3日間処理したコントロール細胞の代表的な像. ER-KRAS^{G12V}発現により, methuosisに伴う大型の液胞が形成される. スケールバー=100 μ m.

Fig. 5 エストロゲン受容体 (ER) -KRAS^{G12V}をレトロウイルスで導入したSAEC (コントロール細胞), または導入していないSAECを, 0.1 μ Mの4OHTで3日間処理した. 4OHT誘導性ER-KRAS^{G12V}, 内因性RASおよび α -Tubulinの発現を, WBにより解析した. ER-KRAS^{G12V}を導入していないSAECに4OHTは影響を与えない.

Fig. 6

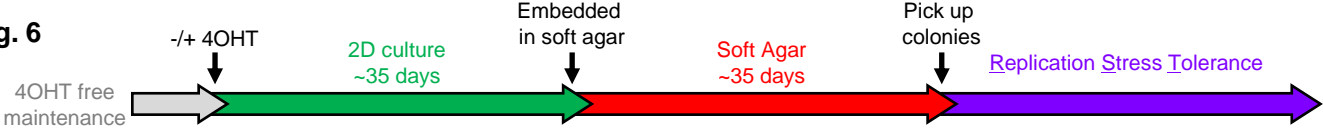


Fig. 7

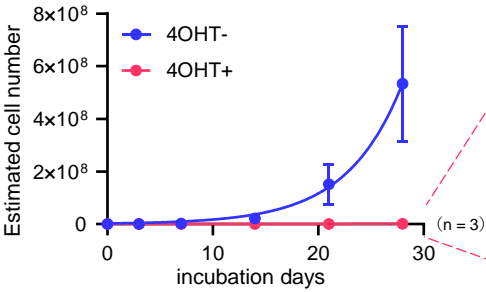


Fig. 8

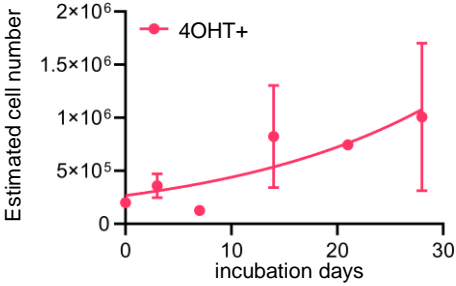


Fig. 9

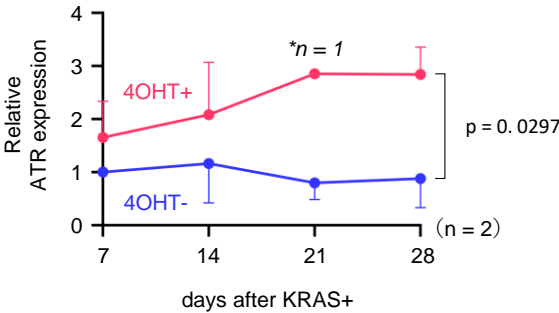
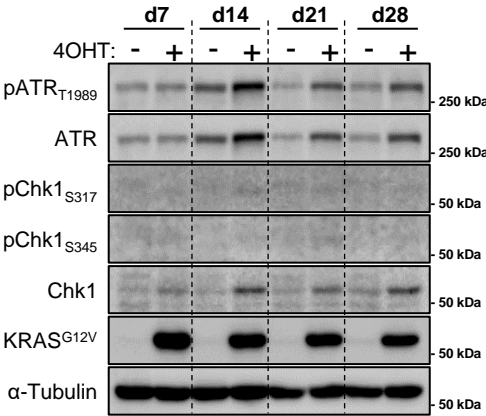


Fig. 10

Soft Agar

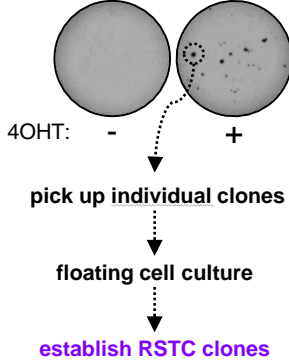
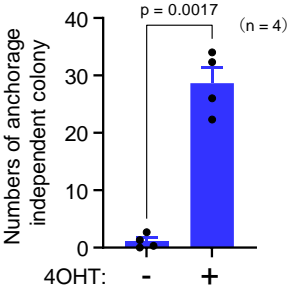


Fig. 11

RST

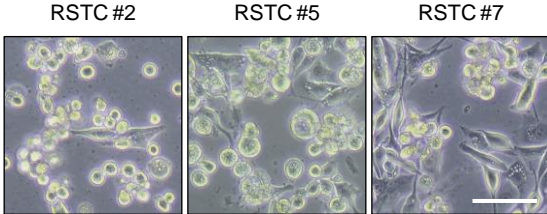
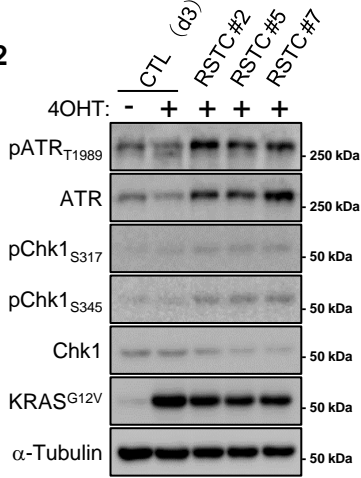


Fig. 12



長期的なKRAS^{G12V}発現に応答したATR高発現は、足場非依存性の獲得に必要である

Fig. 6 KRAS^{G12V}誘導細胞の長期培養の概略図.

Fig. 7 0.1 μ M 4OHTで28日間培養したコントロール細胞の積算細胞数の推定. 結果は3回の独立した実験の平均値 \pm SEMを表す.

Fig. 8 Fig. 7に示したKRAS^{G12V}を発現するコントロール細胞の推定細胞数を, スケールを変えて示す. 結果は3回の独立した実験の平均値 \pm SEMを表す.

Fig. 9 (左) 28日間培養したコントロール細胞におけるタンパク質の発現レベルをWBで検出した. 結果は2回の独立した再現性のある実験の代表写真. (右) その定量結果. 結果は平均値 \pm SEMを表す. * 0.1 μ Mの4OHTで21日間処理したコントロール細胞のサンプルは, 調製ができずN=1の結果である. 検定はtwo-tailed paired parametric t testによる.

Fig. 10 (上) コントロール細胞を, 0.1 μ M 4OHTを添加しつつ合計70日間培養した. 0.4%の軟寒天培地で, 足場非依存性を示したコロニー数を示す. 結果は, 4回の独立した実験の平均値 \pm SEMを表す. 検定はtwo-tailed paired parametric t-testによる. (下) 足場非依存性増殖アッセイの代表的な画像.

Fig. 11 0.1 μ Mの4OHT含有培地で維持培養した複製ストレス耐性細胞 (RSTC) クローン#2, #5, #7の代表的な写真. スケールバー=100 μ m.

Fig. 12 RSTC細胞におけるタンパク質の発現レベルをWBで検出した. 結果は3回の独立した実験の代表的な結果を示す.

RST

Fig. 13

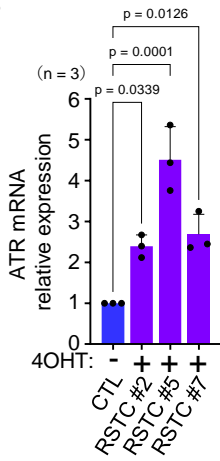


Fig. 14

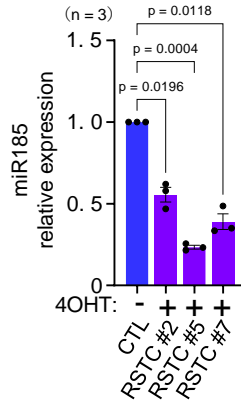


Fig. 15

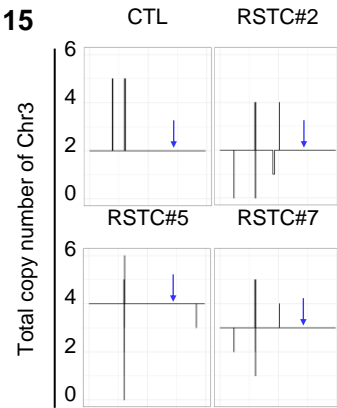


Fig. 16

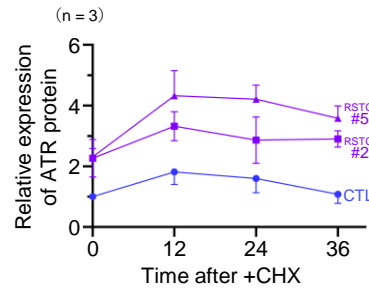
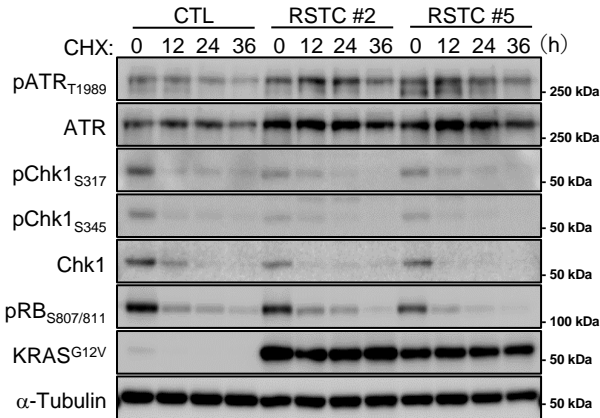


Fig. 17

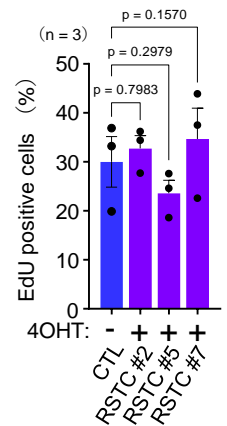


Fig. 18

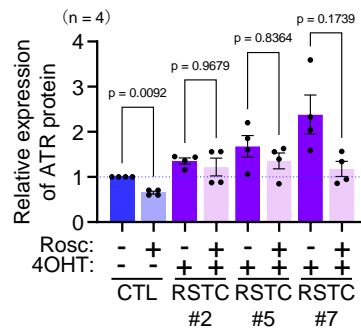
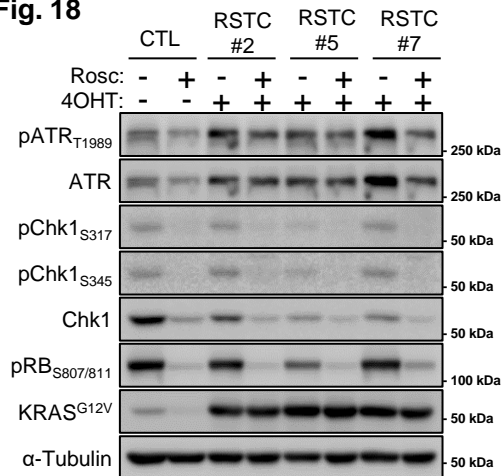
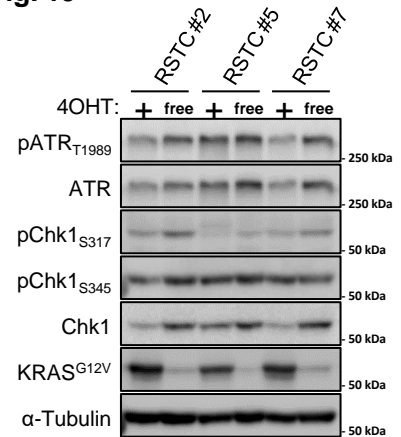


Fig. 19



転写の亢進、染色体の異数倍化、タンパク質の安定性亢進、細胞周期非依存的制御などの多岐にわたる機序が、RSTCにおけるATR高発現に関与する

Fig. 13 0.1 μM の4OHT含有培地で維持培養したRSTCs #2, #5および#7におけるATR mRNAの発現レベルを、SYBR Green RT-qPCRで解析した。結果は3回の独立した実験の平均値 \pm SEMを表す。検定はone-way ANOVA Tukey's testによる。

Fig. 14 0.1 μM の4OHT含有培地で維持培養したRSTCs #2, #5, #7におけるmiR185の発現レベルをTaqMan RT-qPCRで解析した。結果は3回の独立した実験の平均値 \pm SEMを表す。検定はone-way ANOVA Tukey's testによる。

Fig. 15 ATR遺伝子座を含むChr3の総コピー数。RSTC#5と#7ではChr3のコピー数増加が観察された。青矢印はATR遺伝子座を示す。

Fig. 16 (左) 0.1 μM の4OHT含有培地で培養したRSTC#2, #5のCHX処理アッセイの代表的結果。細胞は300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のCHXで図に示す時間処理した。タンパク質の発現レベルは、WBによって検出した。(右) 各サンプルの α -Tubulin発現量で正規化した相対的ATRタンパク質レベルの定量を示す。結果は3回の独立した実験の平均値 \pm SEMを表す。

Fig. 17 0.1 μM の4OHT含有培地で維持培養したRSTCs #2, #5, #7におけるEdU陽性細胞の割合をEdU-Click iT assayで解析した。結果は、3回の独立した実験の平均値 \pm SEMを表す。検定はone-way ANOVA Tukey's testによる。

Fig. 18 (左) コントロール細胞, RSTC #2, #5, #7におけるRosc処理アッセイの代表結果。細胞は25 μM のRoscで24時間処理した。(右) 各サンプルの α -Tubulin発現量で正規化した相対的ATRタンパク質レベルの定量を示す。結果は4回の独立した実験の平均値 \pm SEMを表す。検定はone-way ANOVA Tukey's testによる。

Fig. 19 RSTC #2, #5, #7における4OHTフリーアッセイの代表的結果。RSTCクローンを0.1 μM の4OHTを添加した条件と添加しない条件に分け、31日間培養した。タンパク質の発現レベルは、WBにより検出した。

Fig. 20

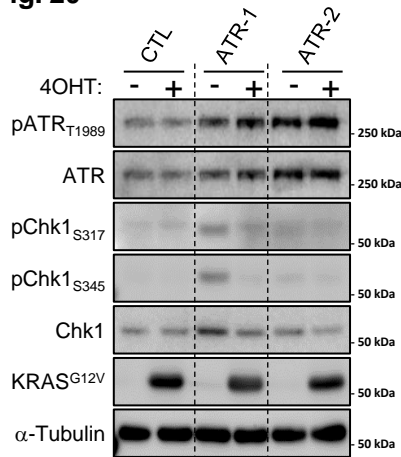


Fig. 21

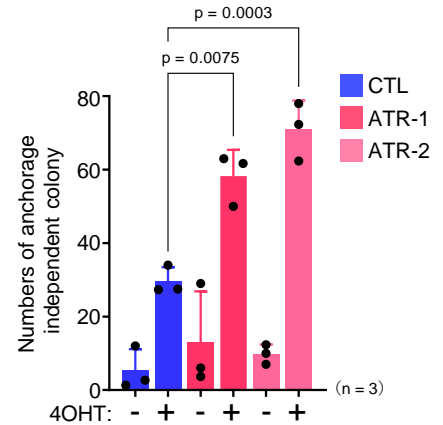
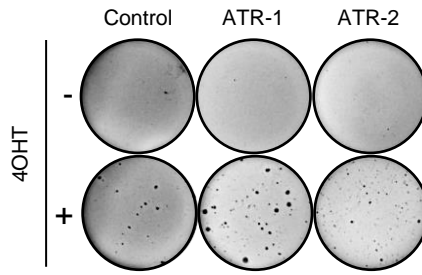


Fig. 22

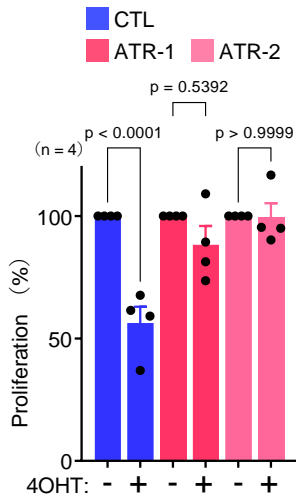


Fig. 23

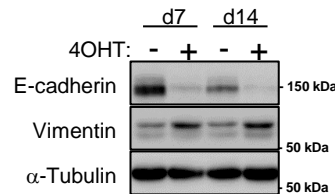
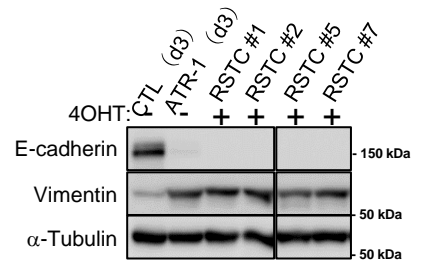


Fig. 24



ATRの恒常的高発現はRSTCを模倣し、足場非依存性の獲得を促進する

Fig. 20 コントロール, ATR-1およびATR-2細胞を, 0.1 μ Mの4OHTで3日間処理し, タンパク質の発現レベルをWBで検出した.

Fig. 21 (左) 0.1 μ Mの4OHTを合計70日間処理した後の, コントロール, ATR-1およびATR-2細胞の0.4%の軟寒天培地における足場非依存性増殖アッセイの代表的な画像. (右) そのコロニー数. 結果は3回の独立した実験の平均値 \pm SEMを表す. 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる.

Fig. 22 細胞増殖アッセイ結果. 細胞増殖は, 0.1 μ Mの4OHTにて7日間処理した後, PrestoBlueを用いて測定した. 結果は4回の独立した実験の平均値 \pm SEMを表す. 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる.

Fig. 23 0.1 μ Mの4OHTを含む培地で \sim 14日間維持培養したコントロール細胞における, EMTのマーカータンパク質の発現量をWBで解析した. 2回の独立した実験の代表的結果を示す.

Fig. 24 0.1 μ Mの4OHT含有培地中で維持培養したRSTC #2, #5, #7におけるEMTのマーカータンパク質の発現量をWBで検出した. コントロールとして, 3日間培養したATR-1細胞を示した. 3回の独立した実験の代表的結果を示す.

SAEC-KRAS^{G12V} cells

Fig. 25

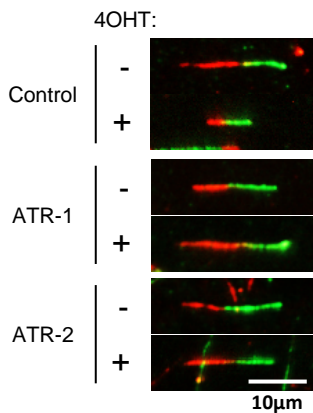


Fig. 26

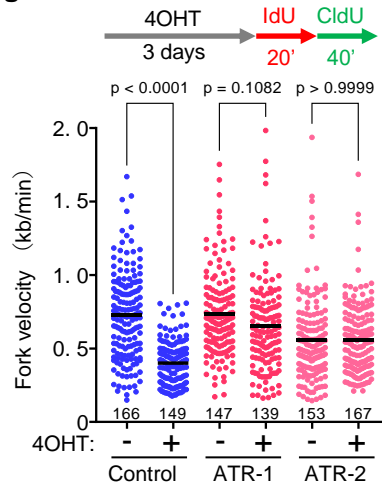
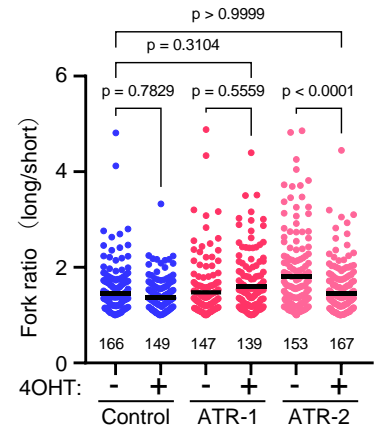


Fig. 27

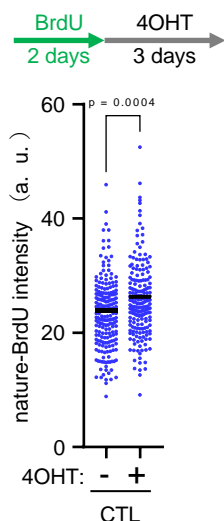
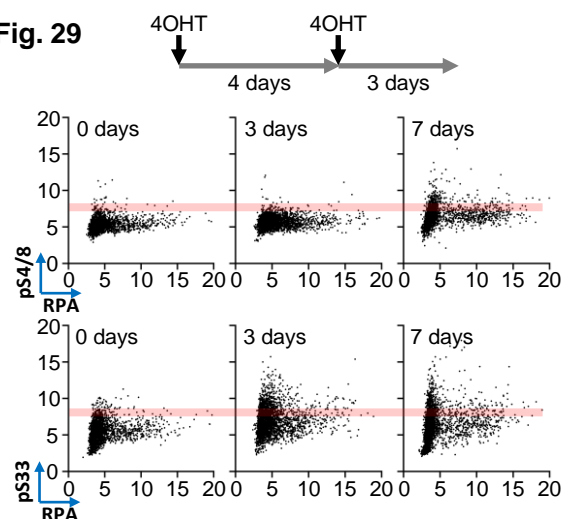
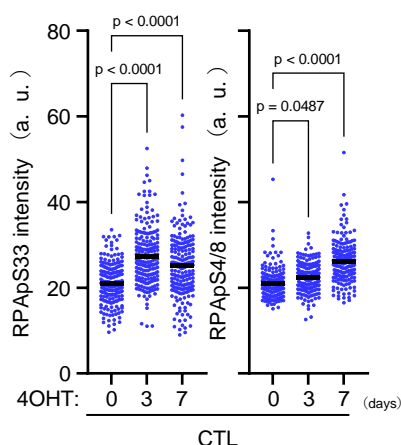
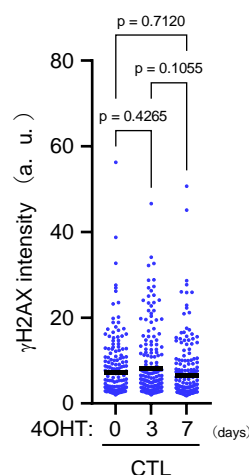


KRAS^{G12V}はRSを誘導し複製速度を低下させる一方で、ATRの恒常的高発現はこれを回避する

Fig. 25 0.1 μ Mの4OHTで3日間処理したコントロール、ATR-1およびATR-2細胞における新生鎖DNA合成をDNA Fiber法で解析した。IdU（赤）を20分間、続いてCldU（緑）を40分間処理し、変性プロトコールで可視化した。スケールバー＝10 μ m.

Fig. 26 Fig. 25に示したフォーク速度のドットプロットと平均値。3つの独立した再現実験の代表的結果を示す。黒線は平均を示す。検定はone-way ANOVA Tukey's testによる。

Fig. 27 Fig. 26に示した0.1 μ Mの4OHTで3日間処理したコントロール、ATR-1およびATR-2細胞のフォーク比率のドットプロットと平均値。黒線は平均を示す。検定はone-way ANOVA Tukey's testによる。

Fig. 28**Fig. 29****Fig. 30****Fig. 31**

KRAS^{G12V}発現はRSマーカのレベルを上昇させる

Fig. 28 非変性BrdU検出アッセイ. 細胞を10 μ MのBrdU含有培地で2日間インキュベートした後, 0.1 μ Mの4OHTを含むBrdU非含有培地にて3日間追加培養した. 2回の独立した再現実験の代表的結果. 黒線は平均を示す. 検定はtwo-tailed Mann-Whitney t testによる.

Fig. 29 細胞をそれぞれ0.1 μ Mの4OHTで3日間または7日間処理した後, 蛍光免疫法で追跡した. 3回の独立した再現実験の代表的結果. 散布図は, RPA32発現強度 (x軸) とリン酸化RPA32 (Ser4/8またはSer33) 強度 (y軸) の平均を示す.

Fig. 30 Fig. 29に示したphospho-RPA32 (Ser4/8 or Ser33) 強度の定量. 黒線は平均を示す. 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる. a. u. は任意単位.

Fig. 31 4OHT処理3日または7日後のγH2AX強度の定量. 黒線は平均を示す. 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる. a. u. は任意単位.

Fig. 32

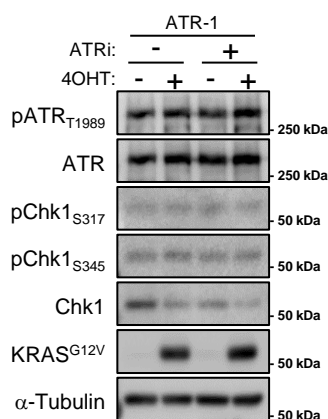
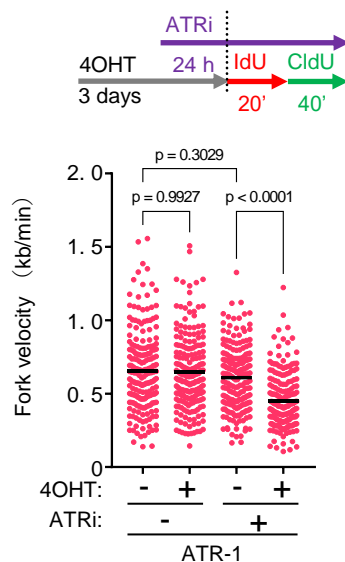


Fig. 33



恒常的ATR高発現細胞はKRAS^{G12V}誘導性RSに適応し、ATR依存的に複製速度を維持する

Fig. 32 0.1 μMの4OHTで3日間処理したATR-1細胞におけるタンパク質の発現量をWBで解析した. 1 nMのATRi (Berzosertib) をサンプリングの24時間前に添加した.

Fig. 33 Fig. 32に示したATR-1細胞におけるフォーク速度のドットプロットと平均値. 1 nMのATRi (Berzosertib) をIdU/CldU標識の24時間前に添加した. 2つの独立した再現実験の代表的結果を示す. 黒線は平均を示す. 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる.

Fig. 34

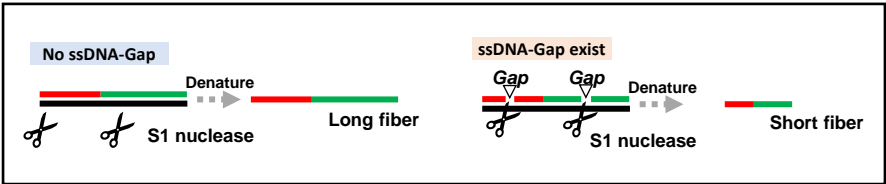


Fig. 35

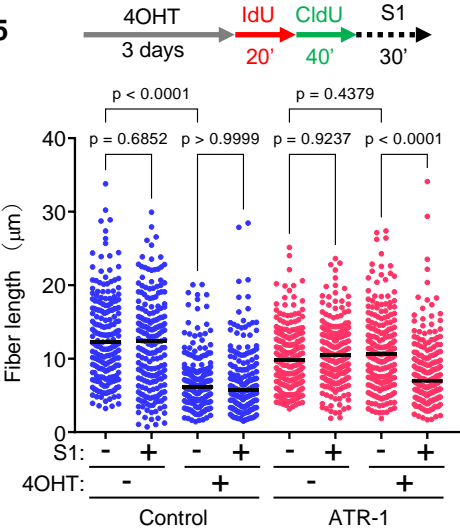
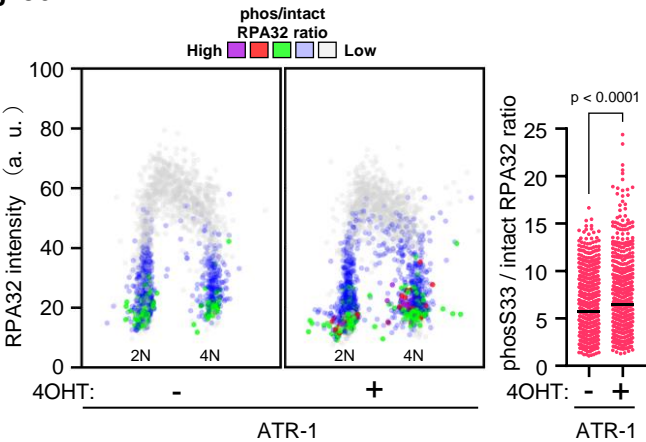


Fig. 36



恒常的ATR高発現は複製速度を維持する一方で、高頻度のssDNAギャップを誘発する

Fig. 34 ssDNA特異的S1ヌクレアーゼによるssDNAギャップの検出の模式図.

Fig. 35 コントロール細胞およびATR-1細胞を0.1 μ Mの4OHTで3日間処理し, 10 U/mlのS1ヌクレアーゼを30分間処理したファイバーの長さのドットプロットと平均値. 3つの独立した再現実験の代表的結果を示す. 黒線は平均を示す. 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる.

Fig. 36 (左) 0.1 μ Mの4OHTにて3日間処理したATR-1細胞において, クロマチン結合リン酸化RPA32 (Ser33) とRPA32をプレ透過処理法で可視化した定量的イメージベースサイトメトリー (QIBC). 3,000個の細胞の色は, リン酸化RPA32 (Ser33) 強度をインタクトRPA32強度で割って正規化したもの. (右) 正規化したリン酸化RPA32 (Ser33) 強度の定量. 2回の独立した再現実験の代表的結果を示す. 黒線は平均を示す. 検定はMann-Whitney testによる.

Fig. 37

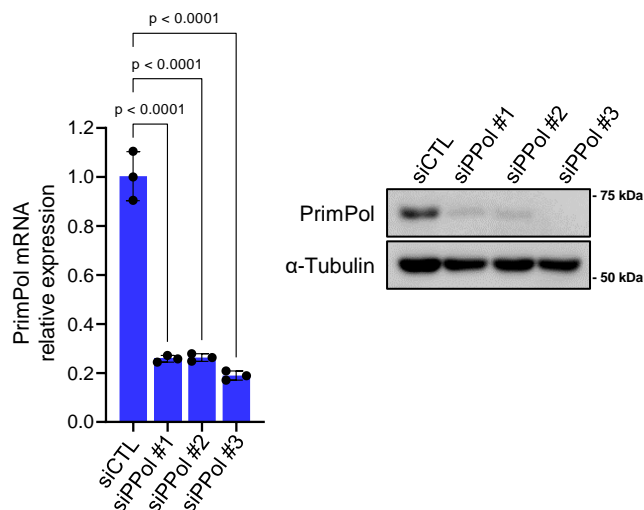


Fig. 38

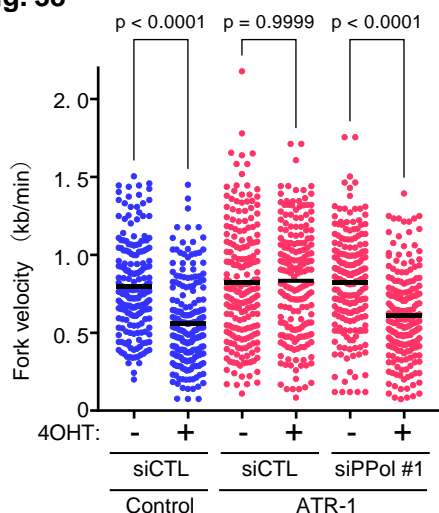
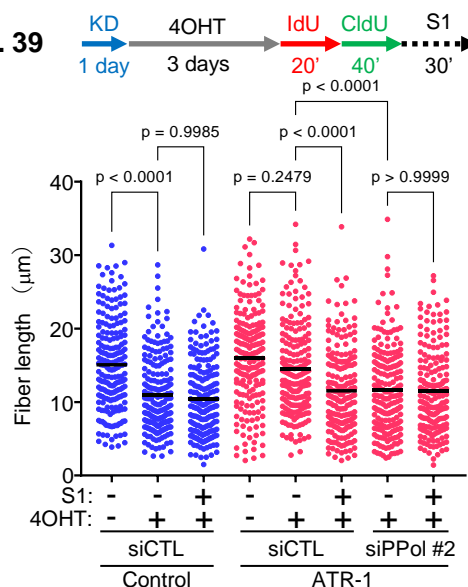


Fig. 39



恒常的ATR高発現はPrimPol依存的なreprimingを介して複製速度を維持する

Fig. 37 コントロール細胞に、PrimPolに対する3つの異なる1 nMのsiRNAを24時間トランスフェクションした。PrimPolの発現レベルは、(左) SYBR Green RT-qPCRと(右) WBで検出した。データは平均値±SD (n=3) で示した。検定はone-way ANOVA Tukey's testによる。

Fig. 38 1 nM のsiControlまたはsiPPol #1を24時間トランスフェクションし、0.1 μMの4OHTで3日間処理したコントロール細胞とATR-1細胞におけるフォーク速度のドットプロットと平均値。3回の独立した再現実験の代表的結果を示す。黒線は平均を示す。検定はone-way ANOVA Tukey's testによる。

Fig. 39 1 nMのsiControlまたはsiPrimPolを24時間トランスフェクションし、0.1 μMの4OHTで3日間処理し、10 U/mlのS1スクレーパーで30分間処理したコントロール細胞とATR-1細胞におけるファイバーの長さのドットプロットと平均値。2つの独立した再現実験の代表的結果を示す。黒線は平均を示す。検定はone-way ANOVA Tukey's testによる。

Fig. 40

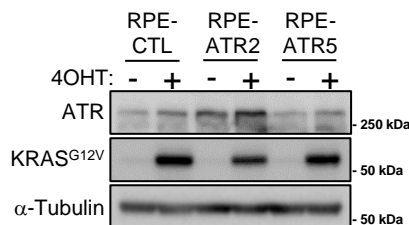


Fig. 41

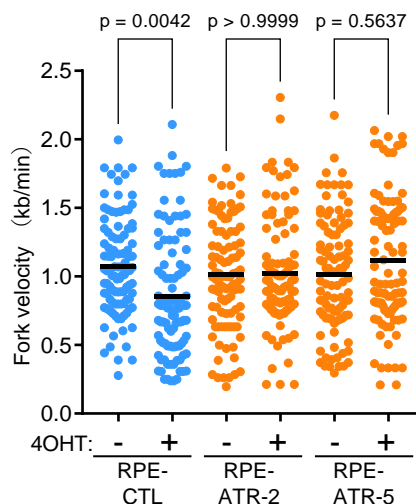


Fig. 42

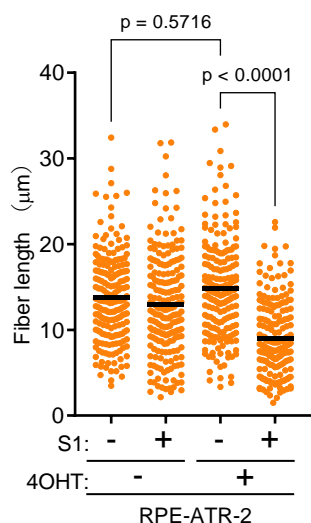
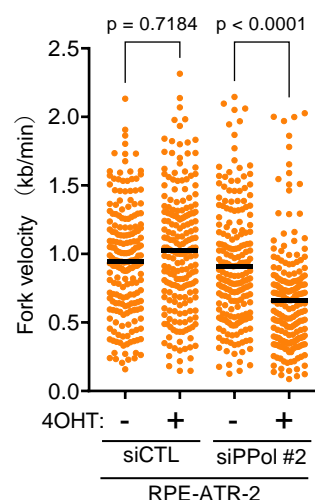


Fig. 43



RPE細胞においても、ATRの恒常的高発現はPrimPol依存的にRSへの適応を促進する

Fig. 40 RPE由来のコントロール細胞, ATR-2およびATR-5細胞を, 0.1 μ Mの4OHTで3日間処理し, タンパク質の発現量をWBで解析した結果.

Fig. 41 RPE由来のコントロール細胞, ATR-2およびATR-5細胞のフォーク速度のドットプロットと平均値. 3回の独立した再現実験の代表的結果を示す. 黒線は平均を示す. 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる.

Fig. 42 0.1 μ Mの4OHTで3日間処理したATR-2細胞を, 10 U/mlのS1ヌクレアーゼ処理を30分間行った場合のファイバーの長さのプロットと平均値. 2回の独立した再現実験の代表的結果. 黒線は平均を示す. 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる.

Fig. 43 1 nMのsiControlまたはsiPPol #2を24時間トランスフェクションし, 0.1 μ Mの4OHT処理を3日間行った場合のATR-2細胞のフォーク速度のドットプロットと平均値. 3回の独立した再現実験の代表的な結果を示す. 黒線は平均を示す. 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる.

Fig. 44

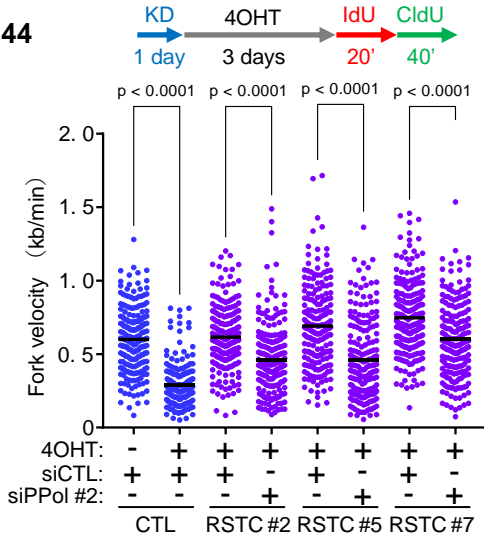


Fig. 45

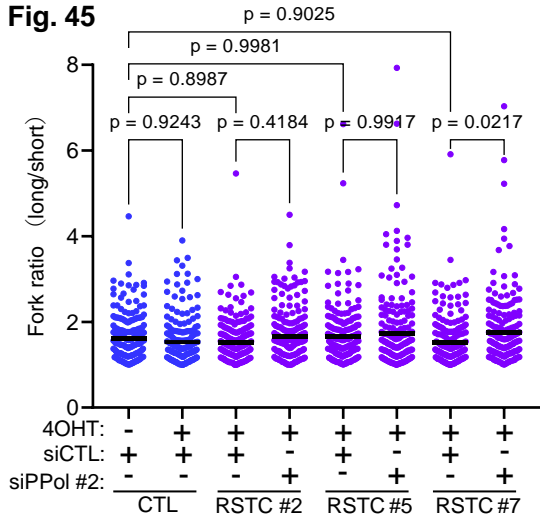


Fig. 46

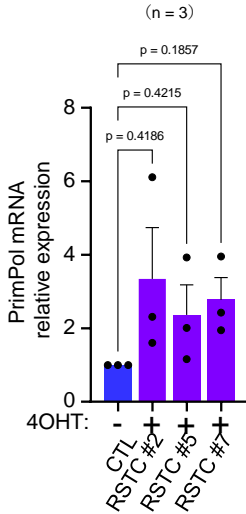
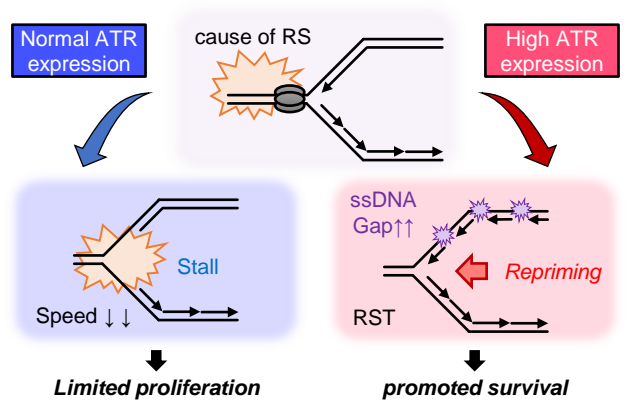


Fig. 47



RSTCにおいてはPrimPol依存的な複製が慢性的に行われる

Fig. 44 1 nMのsiControlまたはsiPrimPolを24時間トランスフェクトし、0.1 μ Mの4OHTで3日間処理したコントロール細胞およびRSTC #2, #5, #7におけるフォーク速度のドットプロットと平均値. 2つの独立した再現実験の代表的結果を示す. 黒線は平均を示す. 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる.

Fig. 45 Fig. 44に示した, コントロール細胞およびRSTC #2, #5, #7におけるフォーク比率のドットプロットと平均値. 黒線は平均を示す. 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる.

Fig. 46 0.1 μ Mの4OHT含有培地で維持培養したRSTCs #2, #5および#7におけるPrimPolのmRNA発現レベルを, SYBR Green RT-qPCRで検出した. 結果は3回の独立した実験の平均値 \pm SEMを表す. 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる.

Fig. 47 ATR-PrimPolを介したRSTモデルの概案. KRAS^{G12V}によって誘導された急性および慢性のRSに応答して, ATR発現の上昇はPrimPol依存的なreprimingを促進してフォーク速度を維持するが, ゲノムDNAにssDNAが蓄積するため, その結果ゲノム不安定性のリスクが高くなる.

Fig. 48

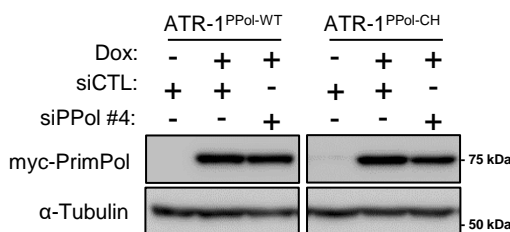


Fig. 49

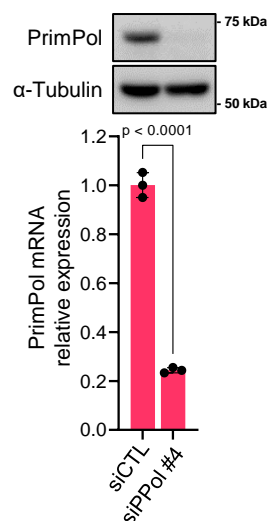
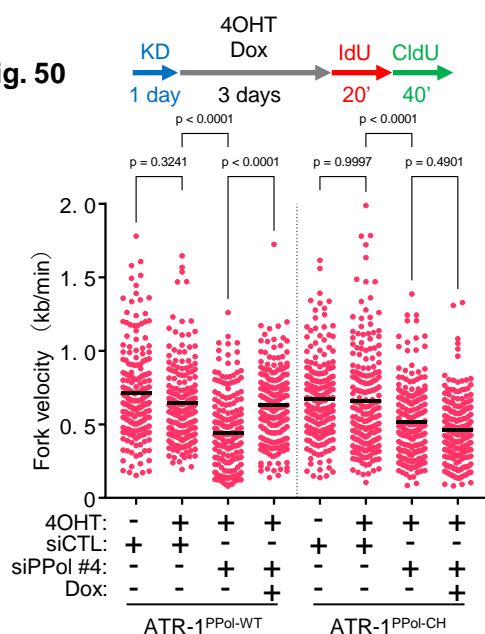


Fig. 50



PrimPol のプライマーゼ活性はreprimingに必要十分である

Fig. 48 ATR-1細胞に5 nMのsiUTR-PrimPol (siPPol #4) を24時間トランスフェクションし、RT-qPCRとWBでPrimPolの発現レベルを解析した。データは平均値±SD (n=3) で示した。検定はtwo-tailed unpaired t testによる。

Fig. 49 Doxycycline誘導性myc-PrimPol^{WT}またはmyc-PrimPol^{CH}を発現するATR-1細胞に、5 nMのsiControlまたはsiUTR-PrimPol (siPPol #4) を24時間トランスフェクションし、1 µg/mlのDoxycyclineで24時間処理した。myc-tag PrimPolとα-Tubulinの発現をWBで検出した。

Fig. 50 5 nMのsiControlまたはsiPPol #4を24時間トランスフェクションし、0.1 µMの4OHTと1 µg/mlのDoxycyclineの併用で3日間処理した、Doxycycline誘導性myc-PrimPol^{WT}またはmyc-PrimPol^{CH}を発現するATR-1細胞におけるフォーク速度のドットプロットと平均値。2回の独立した再現実験の代表的結果。黒線は平均を示す；n = 200；検定はone-way ANOVA Tukey's testによる。

Fig. 51

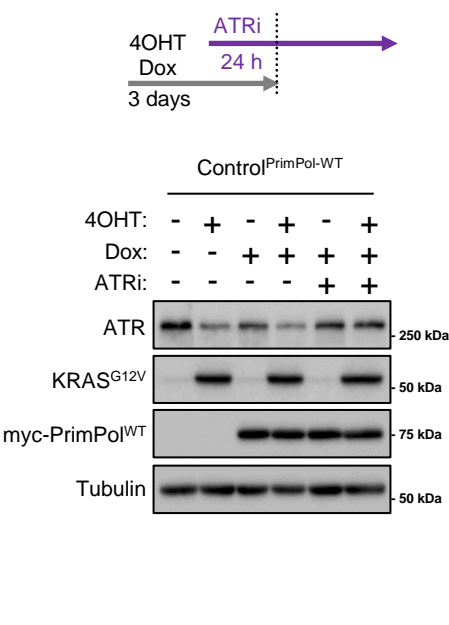


Fig. 52

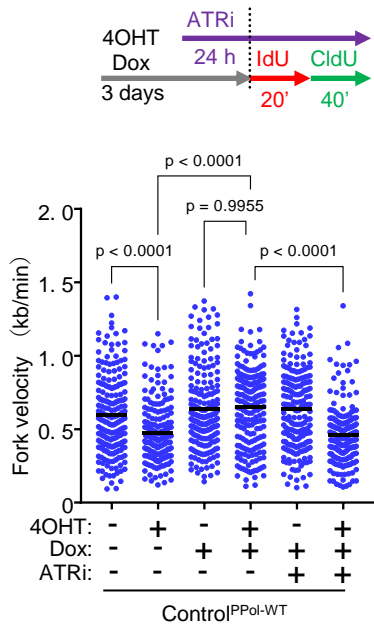
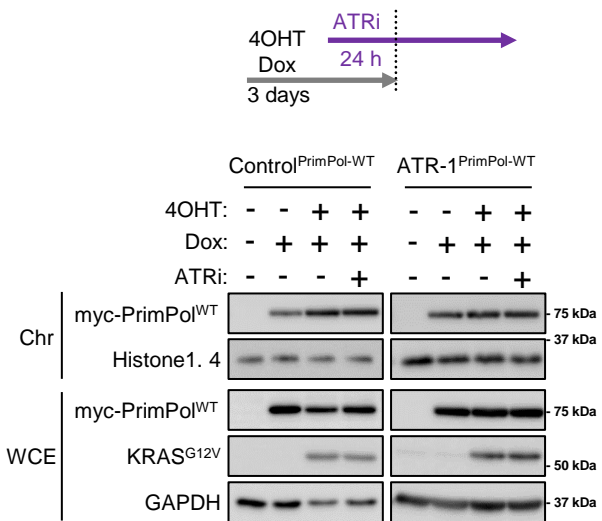


Fig. 53

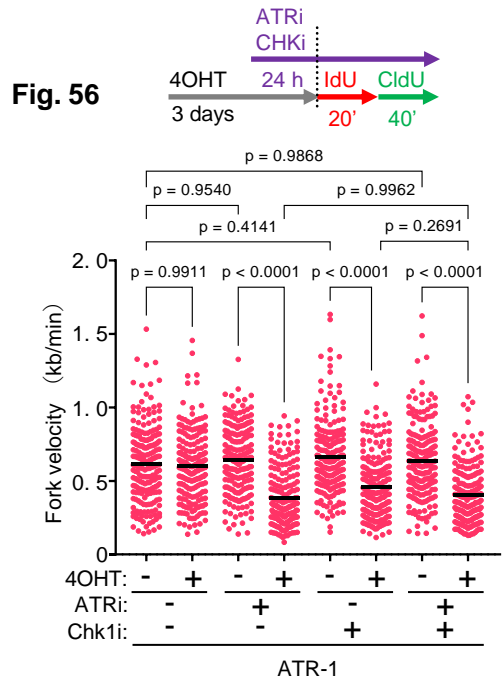
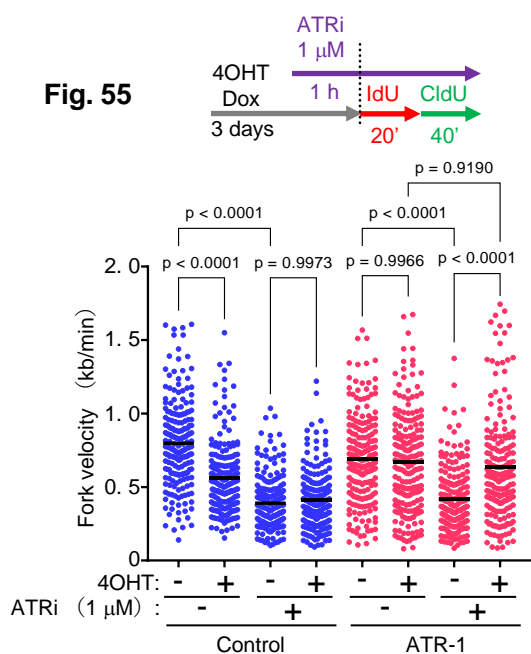
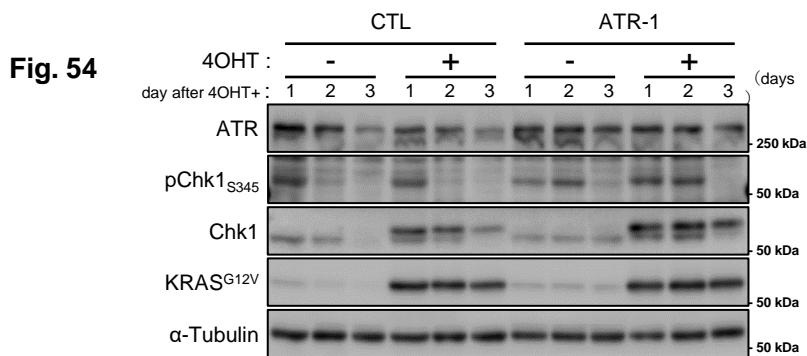


PrimPolの高発現は内因性ATRの活性依存的にreprimingを促進する

Fig. 51 0.1 μ Mの4OHTおよび1 μ g/mlのDoxycyclineで3日間処理した, Doxycycline誘導性 myc-PrimPol^{WT}を発現するコントロール細胞におけるタンパク質の発現レベルを, WBにより検出した. サンプルの24時間前に1 nMのATRiを添加した. 2回の独立した再現実験の代表的結果を示す.

Fig. 52 Fig. 51に示すDoxycycline誘導性myc-PrimPol^{WT}を発現するコントロール細胞のフォーク速度のドットプロットと平均値. 黒線は平均を示す; n = 200; 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる.

Fig. 53 2回の独立した再現性のあるクロマチン分画アッセイの代表的結果. Doxycycline誘導性myc-PrimPol^{WT}を発現するコントロール細胞およびATR-1細胞を, 0.1 μ Mの4OHTおよび1 μ g/mlのDoxycyclineで3日間処理した. サンプルの24時間前に1 nMのATRiを添加した.



PrimPol-reprimingには長期的なATR-Chk1の活性化が必要である

Fig. 54 4回の独立した再現性のある経時的タンパク質発現解析の代表結果. 4OHTを添加してから, 図中に示す時間の経過後に順次サンプリングした.

Fig. 55 0.1 μMの4OHTで3日間処理したコントロール細胞とATR-1細胞におけるフォーク速度のドットプロットと平均値. 高濃度のATRi (1 μM) をIdU/CldU標識の1時間前に添加した. 2回の独立した再現実験の代表的結果を示す. 黒線は平均を示す; n = 200; 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる.

Fig. 56 0.1 μMの4OHTで3日間処理したATR-1細胞におけるフォーク速度のドットプロットと平均値. 低濃度のATRi (1 nM) とChki (Rabusertib, 1 nM) をIdU/CldU標識の24時間前に添加した. 2回の独立した再現実験の代表的結果. 黒線は平均を示す; n = 200; 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる.

Fig. 57

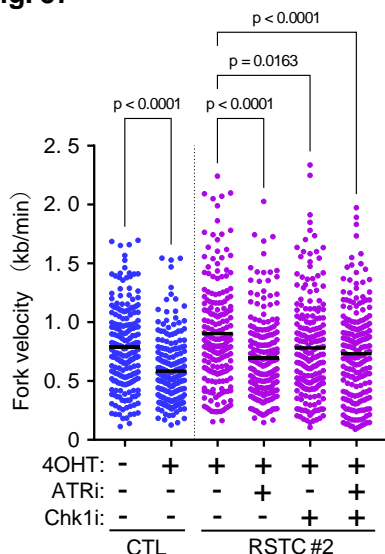


Fig. 58

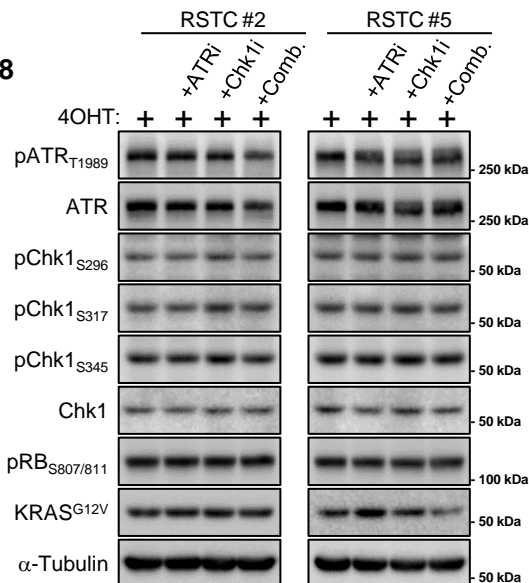
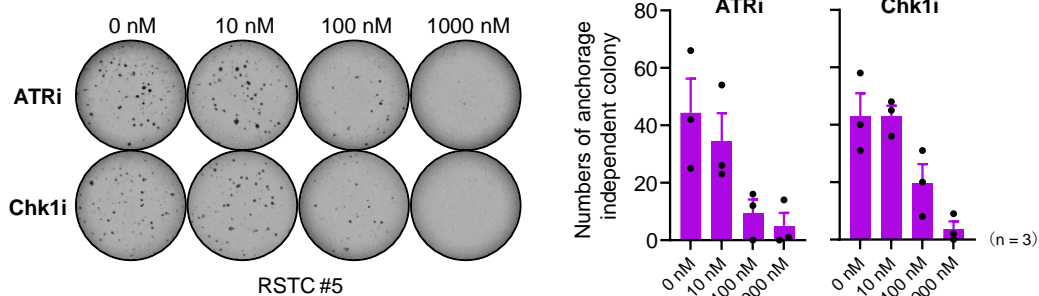


Fig. 59



RSTCにおけるPrimPol-reprimingはATR-Chk1依存的であり、足場非依存的増殖に関与する

Fig. 57 0.1 μ Mの4OHTで3日間処理したコントロール細胞とRSTC # 2細胞におけるフォーク速度のドットプロットと平均値. 低用量のATRi (1 nM) とChk1i (1 nM) をIdU/CldU標識の24時間前に添加した. 2回の独立した再現実験の代表的結果. 黒線は平均を示す; $n = 200$; 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる.

Fig. 58 0.1 μ Mの4OHTで3日間処理したRSTC # 2および # 5におけるタンパク質の発現量をWBで解析した. 低濃度のATRi (1 nM) , Chk1i (1 nM) , およびこれらの組み合わせ (Comb.) をサンプリングの24時間前に添加した. 2回の独立した再現実験の代表的結果.

Fig. 59 長期間のATRまたはChk1阻害を行ったRSTC # 5のコロニー再形成アッセイ. 上図は, 図に示す濃度のATRまたはChk1阻害剤で~14日間処理したコロニー数. 結果は3回の独立した実験の平均値 \pm SEM. 下図に代表的な像を示す.

Fig. 60

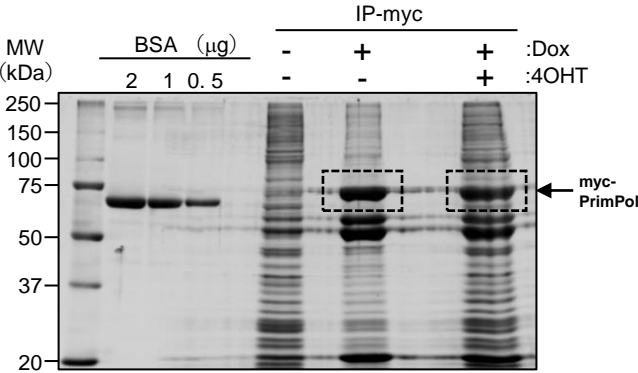


Fig. 61

Gene names	Positions within proteins	Amino acid	Sequence window	Fold change (Log)
PRIMPOL	26	S	QIEERASHYERKPLS S VYRPRLSKPEEPPSI	1.74
	33	S	HYERKPLSSVYRPRL S KPEEPPSIWRLFHRQ	1.35
	207	S	ILQPALDLLGSEDD S APETTGHGFPHFSEA	-1.35
	255	S	EESWTSNSKKLERL S AEQSSPDLSFLVVK	1.21
	499	S	ADETRSNETQNPHK S PSRLSTGASADAVWD	-1.31
	489, 499	S, S	ADETR S NETQNPHK S PSRLSTGASADAVWD	-2.21

Fig. 62

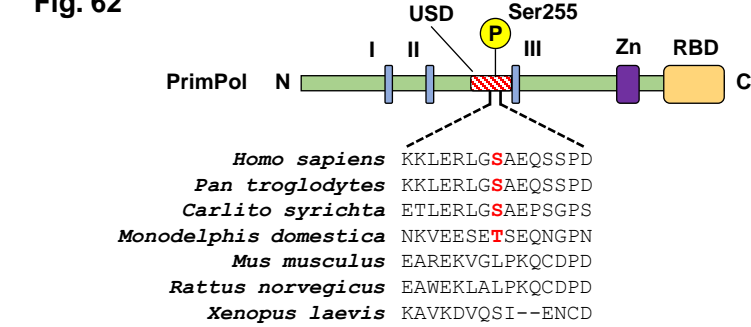


Fig. 63

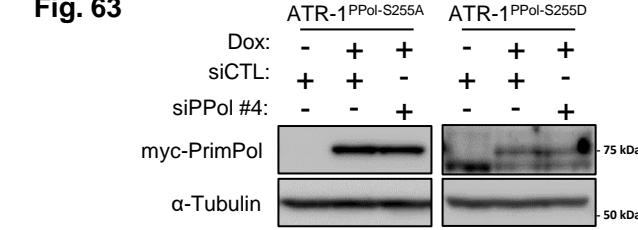
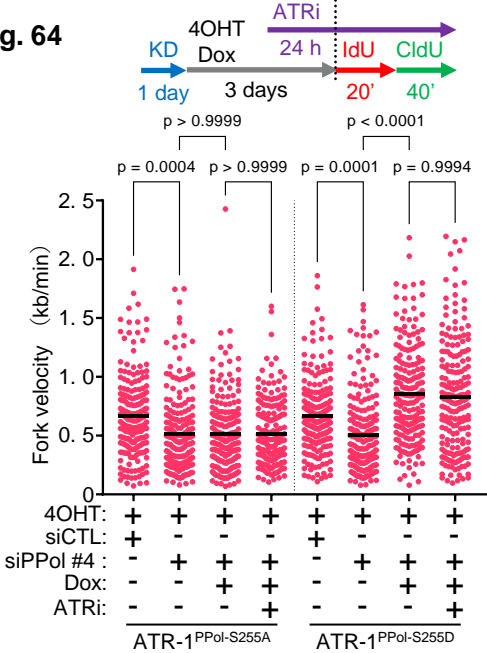


Fig. 64



Chk1基質部位と目されるPrimPolのSer255におけるリン酸化は、PrimPolの活性化に関与する

Fig. 60 リン酸化プロテオミクスサンプリングのためのSYPRO Ruby Protein Gel stainの結果. Doxycycline誘導性myc-PrimPol^{WT}を発現するATR-1細胞を、0.1 μMの4OHTと1 μg/mlのDoxycyclineで3日間処理した。

Fig. 61 LC-MS/MSによるPrimPolのリン酸化部位の同定. リン酸化プロテオミクス解析によって明らかになったmyc-PrimPolのリン酸化または脱リン酸化部位（赤で強調表示した.）のリスト.

Fig. 62 PrimPolのタンパク質ドメイン構造の模式図. archaeal-eukaryotic primase (AEP) ドメインのcatalytic signature motifs (I, II, III) ; Zinc-finger domain (Zn)およびRPA binding domain (RBD)を示す. 図中の生物種におけるPrimPolホモログの配列アラインメントを示す.

Fig. 63 Doxycycline誘導性myc-PrimPol^{S255A}またはmyc-PrimPol^{S255D}を発現するATR-1細胞に、5 nMのsiControlまたはsiPPol #4を24時間トランスフェクションし、1 μg/mlのDoxycyclineで24時間処理したWBの結果.

Fig.64 5 nMのsiControlまたはsiPPol #4を24時間トランスフェクションし、0.1 μMの4OHTで3日間処理し、1 μg/mlのDoxycycline処理した、Doxycycline誘導性myc-PrimPol^{S255A}またはmyc-PrimPol^{S255D}を発現するATR-1細胞におけるフォーク速度のドットプロットと平均値. IdU/CldU標識の24時間前に1 nMのATRiを添加した. 4回の独立した再現実験の代表的結果. 黒線は平均を示す；n = 200；検定はone-way ANOVA Tukey's testによる.

Fig. 65

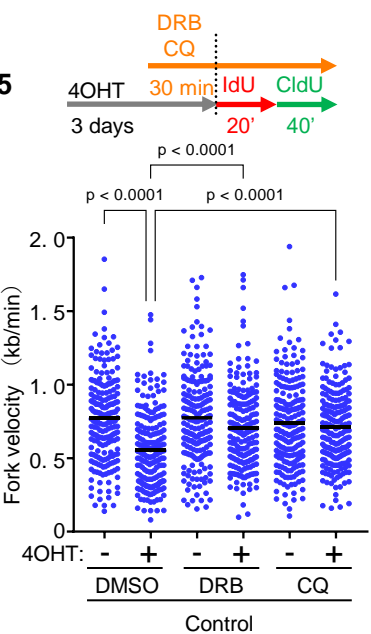
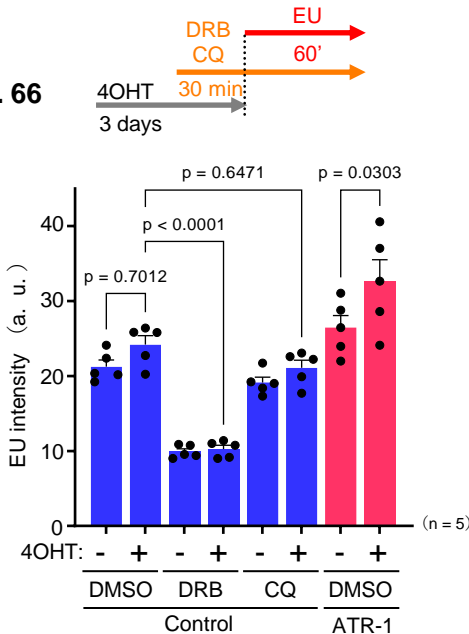


Fig. 66



R-loop validation

Fig. 67

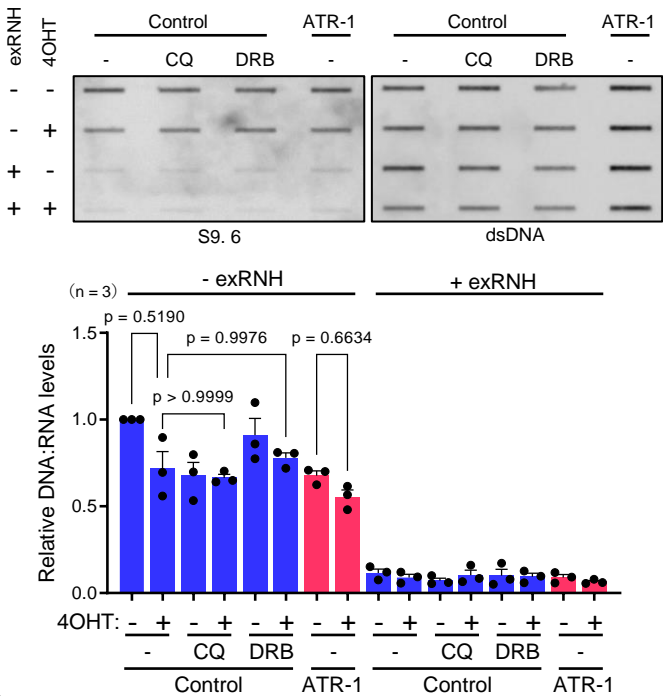


Fig. 68

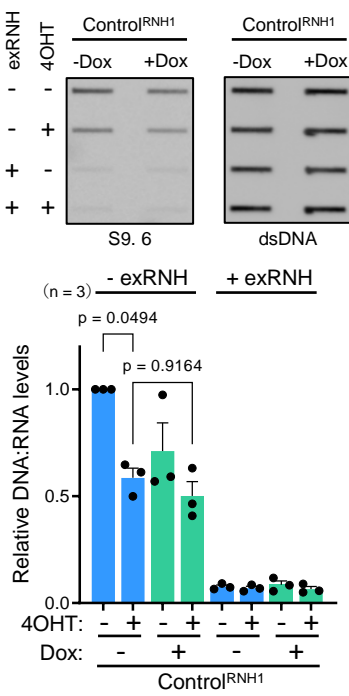


Fig. 69

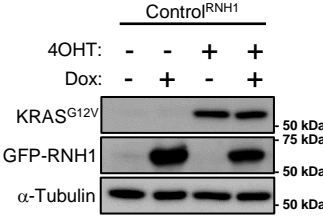
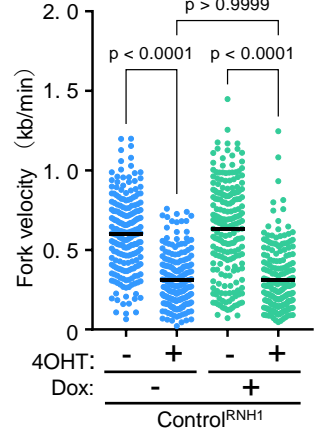
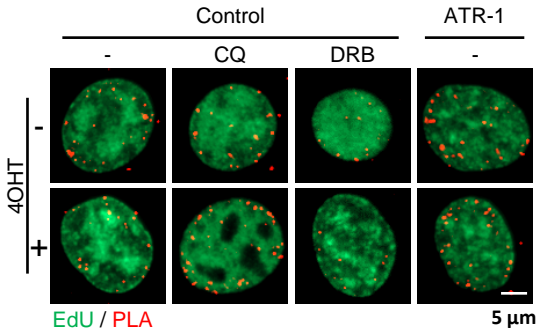


Fig. 70



TRC validation

Fig. 71



転写依存的なR-loopやTRCはSAECにおけるKRAS^{G12V}誘導性のRSの原因ではない

Fig. 65 0.1 μ Mの4OHTで3日間処理したコントロール細胞のフォーク速度のドットプロットと平均値. 100 μ MのDRBまたは40 μ Mのクロロキン (CQ) をIdU/CldU標識の30分前に添加した. 3回の独立した再現実験の代表的結果を示す. 黒線は平均を示す; n = 200; 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる.

Fig. 66 0.1 μ Mの4OHTで3日間処理したコントロール細胞とATR-1細胞のEU強度の定量. 100 μ MのDRBまたは40 μ MのCQを, 1mMのEU標識の30分前に添加し, その後60分間EUと併用処理した. 結果は5回の独立した実験の平均値 \pm SEMを表す. 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる. a. u.は任意単位.

Fig. 67 (上) R-loopスロットプロットアッセイの代表的結果. コントロール細胞とATR-1細胞を0.1 μ Mの4OHTで3日間処理した. 100 μ MのDRBまたは40 μ MのCQをサンプリングの90分前に添加した. (下) S9.6シグナルを並行して調整したdsDNAシグナルで正規化したもの. 結果は3回の独立した実験の平均値 \pm SEMを表す. 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる.

Fig. 68 (上) R-loopスロットプロットアッセイの代表的結果. Doxycycline誘導性GFP-RNaseH1を発現するコントロール細胞を, 0.1 μ Mの4OHTと1 μ g/mlのDoxycyclineで3日間処理した. (下) S9.6シグナルを並行して調整したdsDNAシグナルで正規化したもの. 結果は3回の独立した実験の平均値 \pm SEMを表す. 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる.

Fig. 69 Doxycyclineで誘導性GFP-RNaseH1を発現するコントロール細胞を, 0.1 μ Mの4OHTと1 μ g/mlのDoxycyclineで3日間処理し, タンパク質の発現をWBで検出した.

Fig. 70 Fig. 69に示すDoxycycline誘導性GFP-RNaseH1を発現するコントロール細胞の, フォーク速度のドットプロットと平均値. 2回の独立した再現実験の代表的結果を示す. 黒線は平均を示す; n = 200; 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる.

Fig. 71 (左) 0.1 μ Mの4OHTで3日間処理したコントロール細胞およびATR-1細胞におけるTRCを示す代表的なPLAシグナル像. 固定の90分前に100 μ MのDRBまたは40 μ MのCQを添加した. S期を検出するために, 細胞を10 μ MのEdUで30分間処理した後, PCNAとphospho-POLII (Ser2)に対する抗体を用いてPLAを行った. スケールバー=5 μ m. (右) EdU陽性細胞におけるPLAシグナルの数. 結果は3回の独立した実験の平均値 \pm SEMを表す. 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる.

Fig. 72

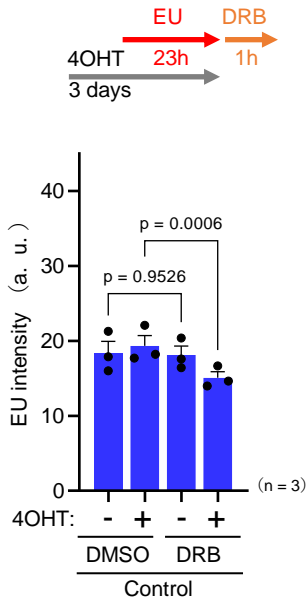


Fig. 73

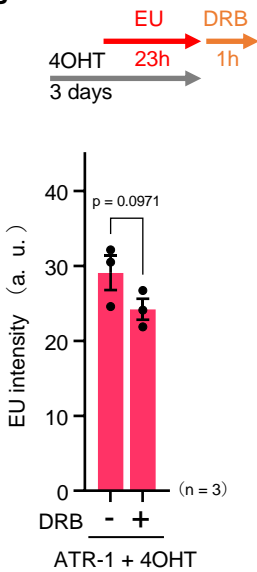


Fig. 74

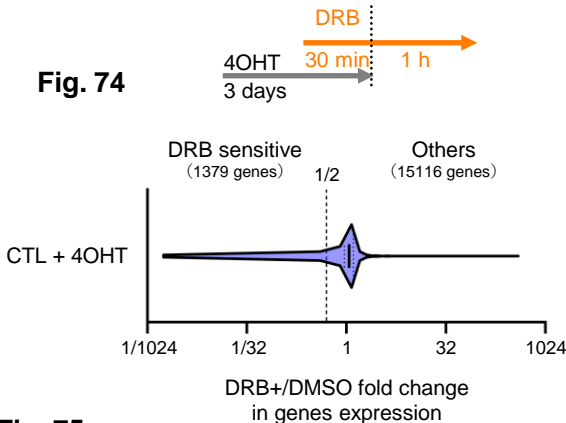


Fig. 75

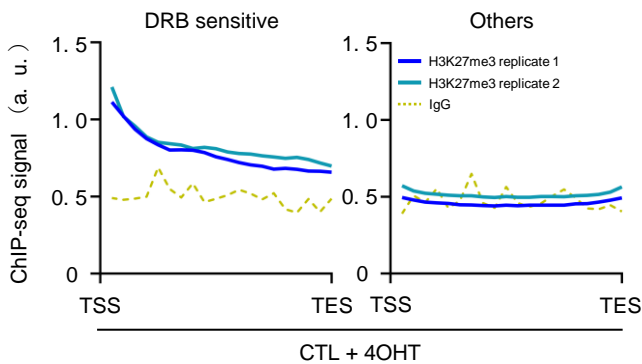


Fig. 76

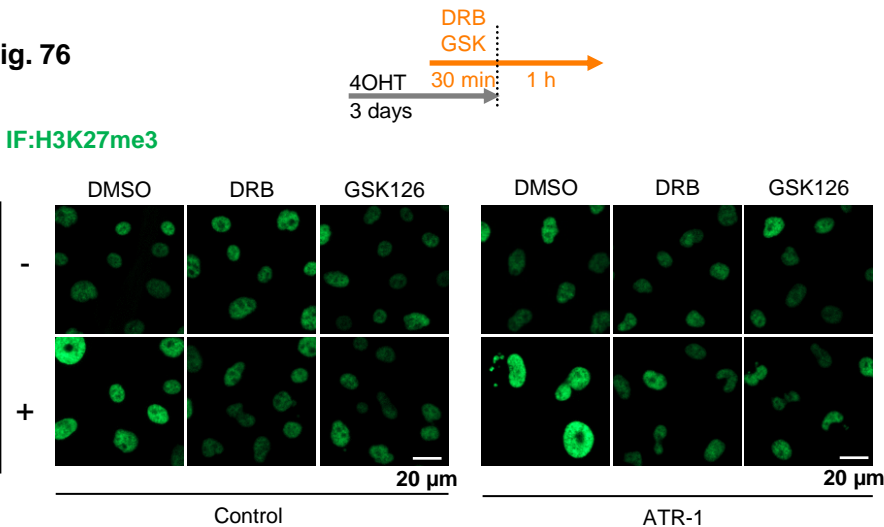


Fig. 78

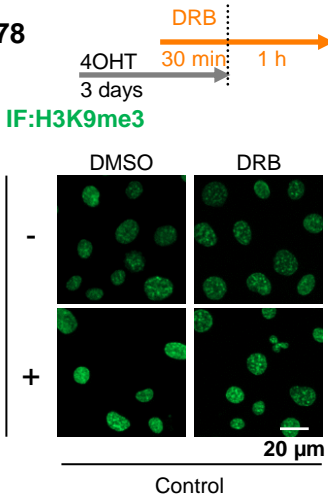


Fig. 77

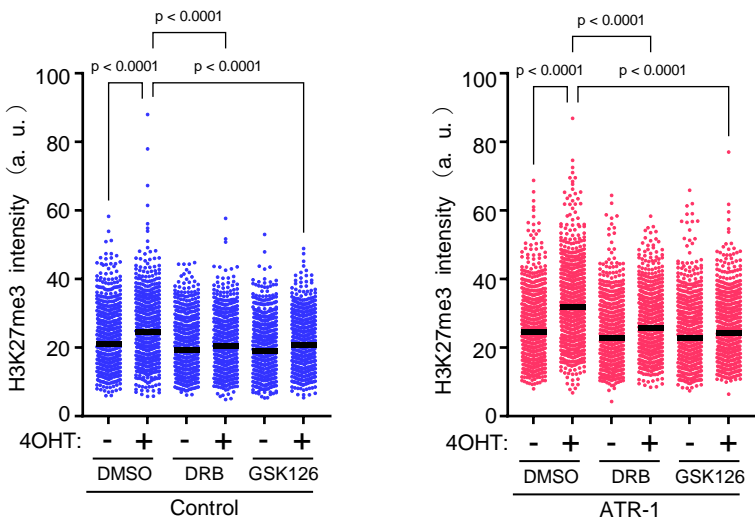
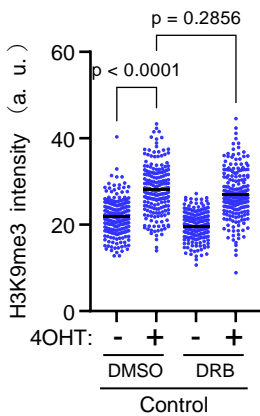


Fig. 79



KRAS^{G12V}発現に伴って漏出したRNA転写はPRC2を介してH3K27me3を増強する

Fig. 72 0.1 μM の4OHTで3日間処理したコントロール細胞の総RNAの定量. 100 μM のDRB処理の23時間前に1 mMのEUを添加し, 最終的に60分間DRBと併用処理した. 結果は3回の独立した実験の平均値 \pm SEMを表す. 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる. a. u.は任意単位.

Fig. 73 0.1 μM の4OHTで3日間処理したATR-1細胞のEU強度の定量. 100 μM のDRB処理の23時間前に1 mMのEUを添加し, 最終的に60分間併用処理した. 結果は3回の独立した実験の平均値 \pm SEMを表す. 検定はtwo-tailed paired parametric t testによる. a. u.は任意単位.

Fig. 74 RNA-seqで解析したDRB処理による遺伝子発現の倍数変化 (FC) の定量化. コントロール細胞を0.1 μM の4OHTで3日間処理し, 100 μM のDRBで90分間処理した. DRB処理により発現量が半分以下になった群をDRB sensitiveとして以降の解析対象とした.

Fig. 75 遺伝子座内のH3K27me3 ChIP-seqシグナルの分布を, deepToolsのscale-regions機能で可視化した. DRB sensitiveな群はH3K27me3に富んだ領域から漏出した産物であることがわかる. SAECのH3K27me3 ChIP-seqデータは, Suzuki, A. (PMID: 25378332) らの結果を参照した. a. u.は任意単位.

Fig. 76 0.1 μM の 4OHT で 3 日間処理した後, コントロール細胞および ATR-1 細胞を 100 μM の DRB または 2.5 μM の GSK126 で 90 分間処理し, その後 H3K27me3 抗体を用いてプレ透過処理法で染色した. クロマチン結合H3K27me3の代表的像.スケールバー=20 μm .

Fig. 77 Fig. 76に示したH3K27me3強度の定量. 3回の独立した再現実験の代表的結果を示す. N=1000. 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる. a. u.は任意単位.

Fig. 78 0.1 μM の 4OHT で 3 日間処理した後, コントロール細胞および ATR-1 細胞を 100 μM の DRB で 90 分間処理し, その後 H3K9me3 抗体を用いてプレ透過処理法で染色した. クロマチン結合H3K9me3の代表的像.スケールバー=20 μm .

Fig. 79 Fig. 78に示したH3K9me3強度の定量. 2回の独立した再現実験の代表的結果を示す. N=200. 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる. a. u.は任意単位.

Fig. 80

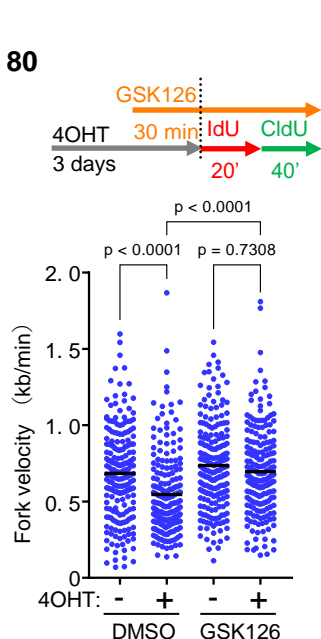


Fig. 81

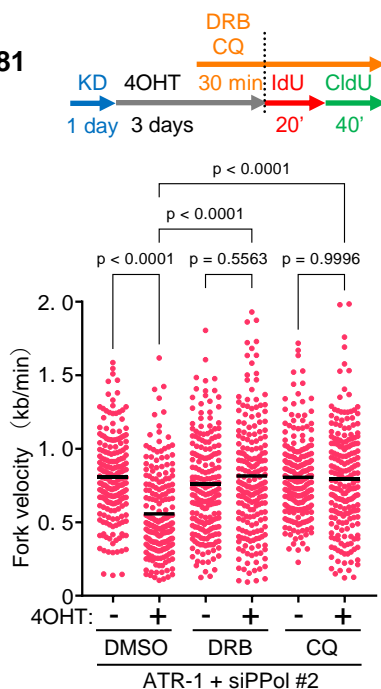


Fig. 83

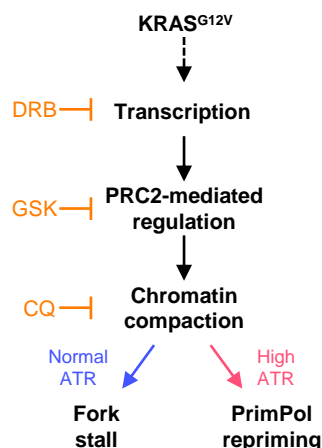
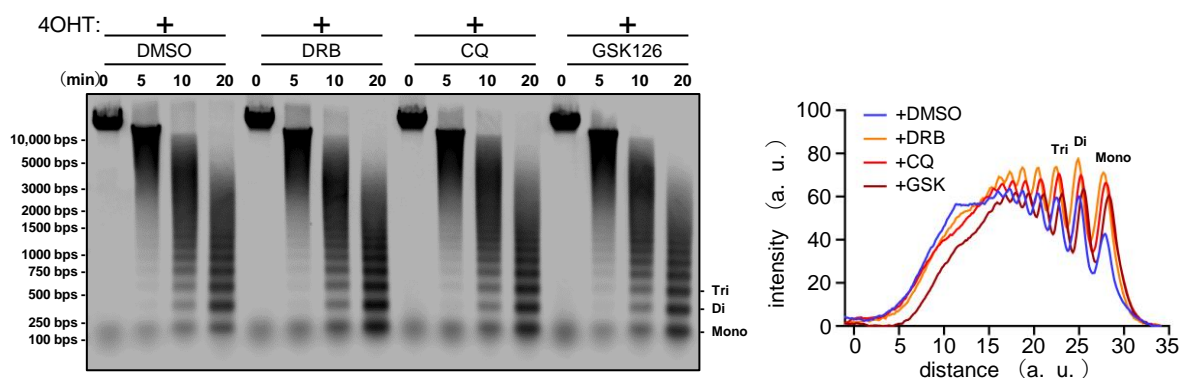


Fig. 82



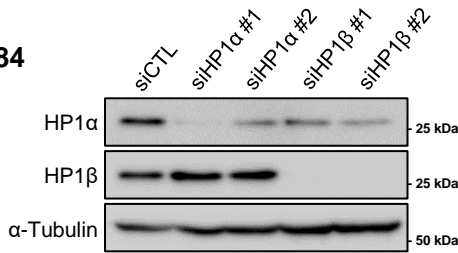
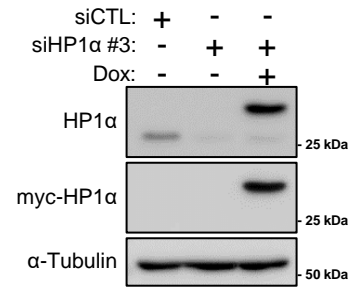
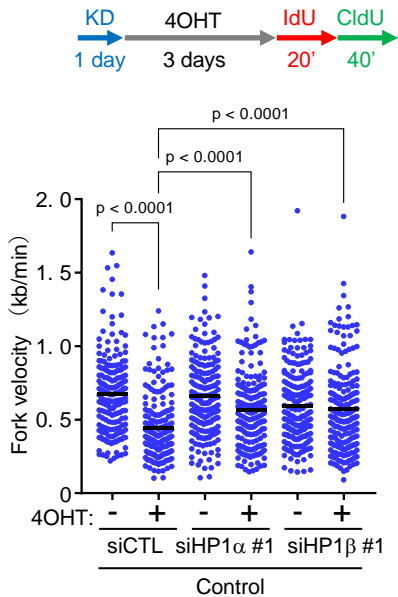
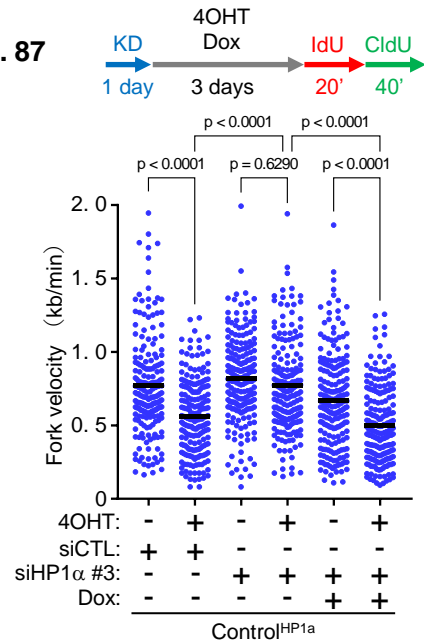
転写依存的なPRC2の阻害はクロマチン凝縮を抑制し、複製ストレスを解消する

Fig. 80 0.1 μM の4OHTで3日間処理した後、2.5 μM のGSK126を添加したコントロール細胞におけるフォーク速度のドットプロットと平均値. GSK126はIdU/CldU標識の30分前に添加した. 4回の独立した再現実験の代表的結果を示す. 黒線は平均を示す; $n = 200$; 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる.

Fig. 81 1 nMのsiPPol #2を24時間トランスフェクションし、0.1 μM の4OHTで3日間処理したATR-1細胞におけるフォーク速度のドットプロットと平均値. 100 μM のDRBまたは40 μM のCQをIdU/CldU標識の30分前に添加した. 4回の独立した再現実験の代表的結果を示す. 黒線は平均を示す; $n = 200$; 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる.

Fig. 82 (左) MNase感受性アッセイのアガロースゲル電気泳動による代表的な結果. 0.1 μM の4OHTで3日間処理した後、コントロール細胞を100 μM のDRB、2.5 μM のGSK126、または40 μM のCQで90分間処理し、その後透過処理とMNase消化をそれぞれ5、10、20分間行った. (右) MNase消化を20分間行ったサンプルのDNA強度の定量. 2回の独立した再現実験の代表的結果を示す. a. u.は任意単位.

Fig. 83 KRAS^{G12V}が誘導するRSとその反応モデル. KRAS^{G12V}は, polycomb repressive complex 2 (PRC2)に制御された遺伝子からの予定外のRNAの転写を誘導し, その遺伝子領域へのPRC2のリクルートとH3K27のトリメチル化を引き起こす. 局所的に凝縮したヘテロクロマチン領域が, RSの原因となる.

Fig. 84**Fig. 86****Fig. 85****Fig. 87**

クロマチン凝縮を制御するHP1は複製ストレスの原因として必要十分である

Fig. 84 1 nMのsiControl, siHP1α, siHP1βをコントロール細胞に24時間トランスフェクションし、タンパク質の発現量をWBで検出した。

Fig. 85 コントロール細胞に1nMのsiControl, siHP1α, siHP1βを24時間トランスフェクションし、0.1 μMの4OHTで3日間処理した場合のフォーク速度のドットプロットと平均値。2回の独立した再現実験の代表的結果を示す。黒線は平均を示す；n = 200；検定はone-way ANOVA Tukey's testによる。

Fig. 86 Doxycycline誘導性myc-HP1αを発現するコントロール細胞に、1nMのsiControlまたはsiUTR-HP1α (siHP1α #3) を24時間トランスフェクションし、1 μg/mlのDoxycyclineで24時間処理した。タンパク質の発現量をWBで検出した。

Fig. 87 Doxycycline誘導性myc-HP1αを発現するコントロール細胞に1 nMのsiControlまたはsiHP1α #3を24時間トランスフェクションし、0.1 μMの4OHTと1 μg/mlのDoxycyclineで3日間処理した場合のフォーク速度のドットプロットと平均値。2回の独立した再現実験の代表的結果を示す。黒線は平均を示す；n = 200；検定はone-way ANOVA Tukey's testによる。

Fig. 88

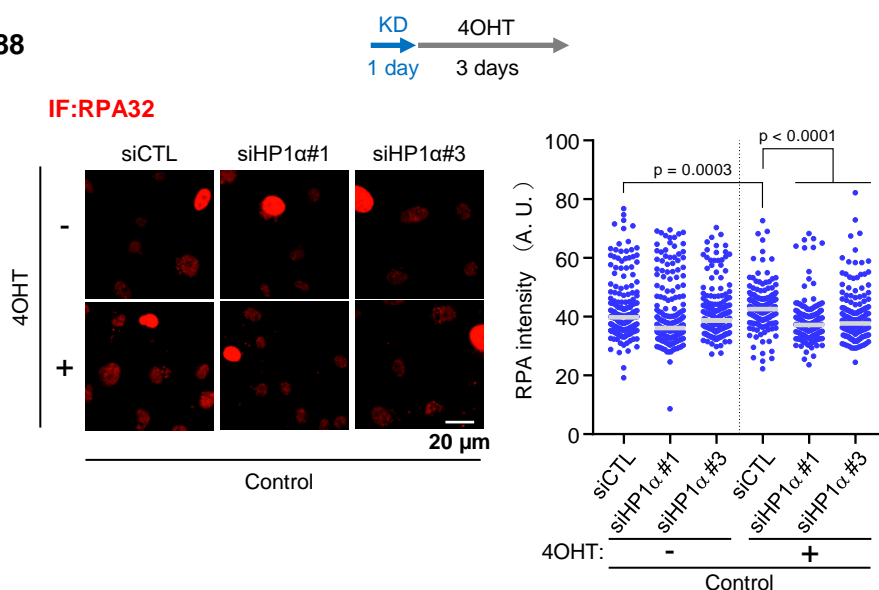
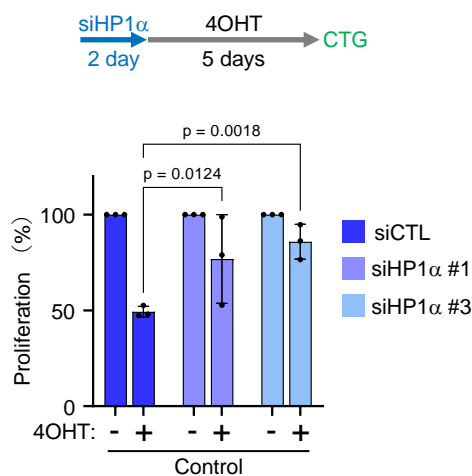


Fig. 89



HP1のノックダウンはKRAS^{G12V}誘導性RSを解消し、細胞増殖を回復させる

Fig. 88 コントロール細胞に1 nMのsiControl, siHP1α #1またはsiHP1α #3を24時間トランスフェクションし, 0.1 μMの4OHTで3日間処理した. (左) RPA蛍光免疫染色の代表画像. スケールバー=20 μm. (右) クロマチン結合RPA32強度の定量. 2回の独立した再現実験の代表的な結果を示す. 灰色の線は中央値を示す; n = 200; 検定はtwo-tailed Mann-Whitney t testによる.

Fig. 89 細胞増殖の定量化. 細胞に1 nMのsiControlまたはsiHP1α #1, #3を48時間トランスフェクションし, 0.1 μMの4OHT含有培地で5日間培養した. 細胞増殖はCell Titer-Glo 2.0 Assayを用いて測定した. 結果は3回の独立した実験の平均値±SEMを表す. 検定はtwo-way ANOVA Šidák's multiple comparisons testによる.

Fig. 90

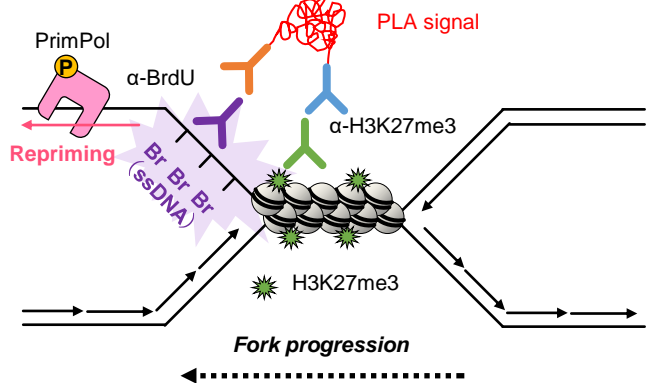


Fig. 91

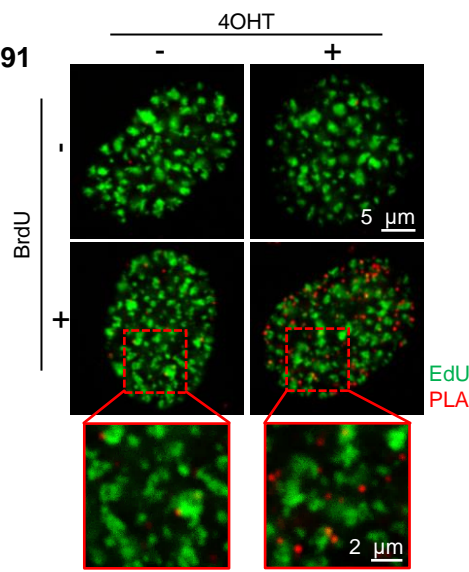


Fig. 92

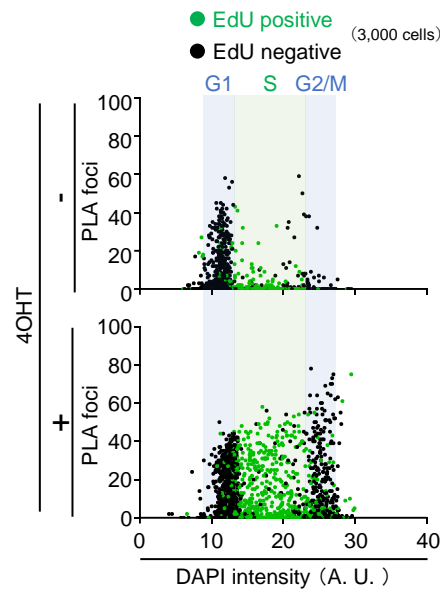
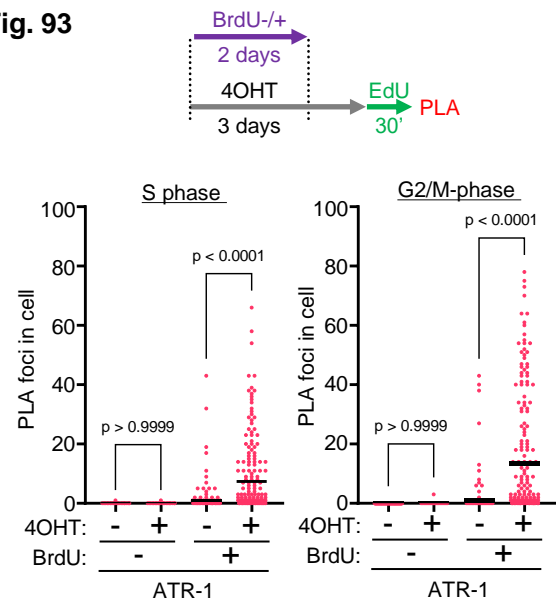


Fig. 93



KRAS^{G12V}発現に伴い、ssDNAギャップがH3K27me3近傍で高頻度で生じる

Fig. 90 H3K27me3を伴うヘテロクロマチン近傍のssDNA露出を検出するためのPLAの概要. siRNAトランスフェクション後、細胞を10 μ MのBrdU含有培地で培養し、2日間インキュベートした後、BrdU非含有培地で1日間追加培養する。

Fig. 91 0.1 μ Mの4OHTで3日間処理したATR-1細胞を用いた、3回の独立した再現実験から得られたH3K27me3-BrdU PLAの代表的なシグナルの像. スケールバー＝5 μ m. 拡大画像を赤い四角枠で示す. スケールバー＝2 μ m.

Fig. 92 Fig.90に示すPLAシグナルの数を示す散布図. 各サンプルから3,000個の細胞を無作為に選んでプロットした. それぞれEdU陰性（黒）とEdU陽性（緑）を示す。

Fig. 93 Fig.91に示すEdU強度で定義したS期またはG2/M期の細胞におけるPLAシグナルの数. 黒線は平均値を示す；n = 200；検定はone-way ANOVA Tukey's testによる。

Fig. 94

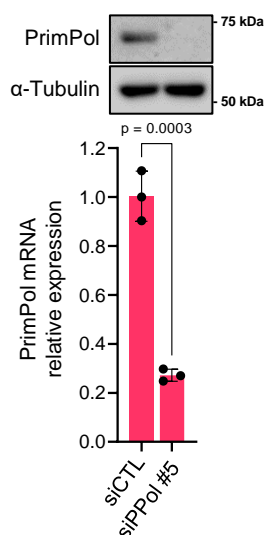
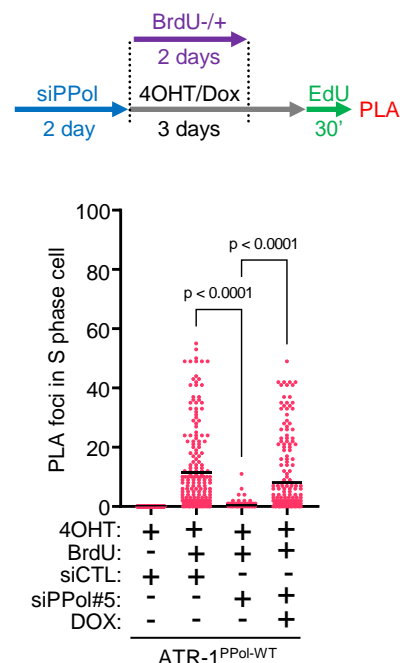


Fig. 96



PrimPolはH3K27me3近傍で生じるssDNAギャップに必要十分に関与する

Fig. 94 ATR-1細胞に1 nMのsiControlとsiUTR-PrimPol (siPPol #5) を24時間トランスフェクションし、RT-qPCRとWBでPrimPolの発現レベルを解析した。データは平均値±SD (n=3) で示した。検定はtwo-tailed unpaired t testによる。

Fig. 95 Doxycycline誘導性myc-PrimPol^{WT}を発現するATR-1細胞に、1 nMのsiControlまたはsiPPol #5を24時間トランスフェクトし、1 μg/mlのDoxycyclineで24時間処理した。myc-tag PrimPolとα-Tubulinの発現をWBで検出した。

Fig. 96 1 nMのsiControlまたはsiUTR-PrimPol (siPPil #5) で2日間トランスフェクションした後、0.1 μMの4OHTと1 μg/mlのDoxycyclineを3日間併用処理した、Doxycycline誘導性myc-PrimPol^{WT}を発現するATR-1細胞のS期細胞におけるPLAシグナルの数。3回の独立した再現実験の代表的結果を示す。黒線は平均値を示す；n = 200；検定はone-way ANOVA Tukey's testによる。

Fig. 97

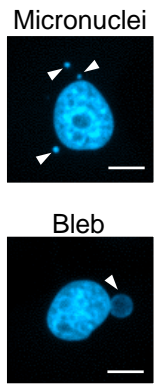


Fig. 98

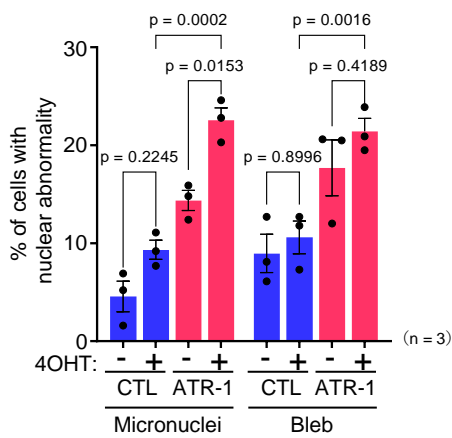


Fig. 99

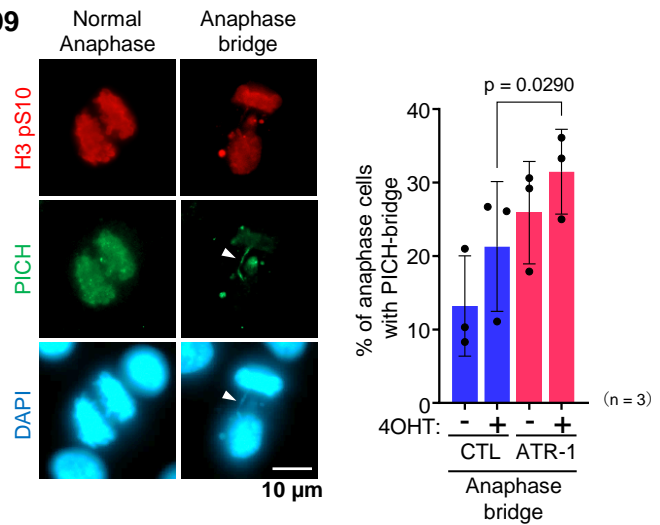


Fig. 100

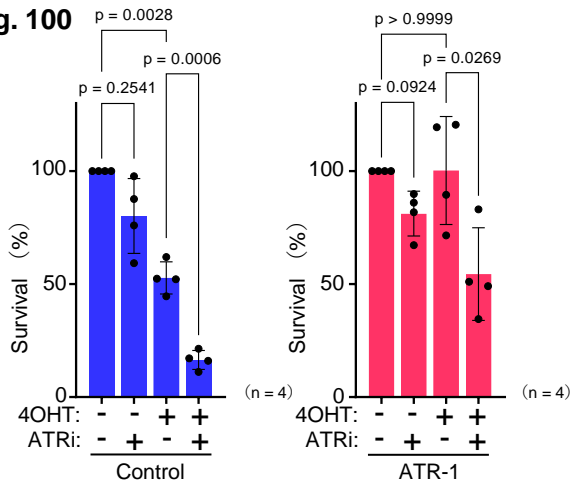


Fig. 101

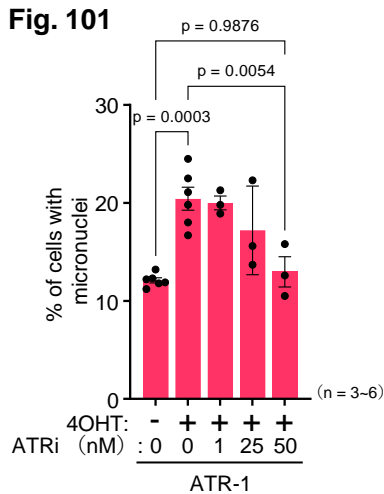
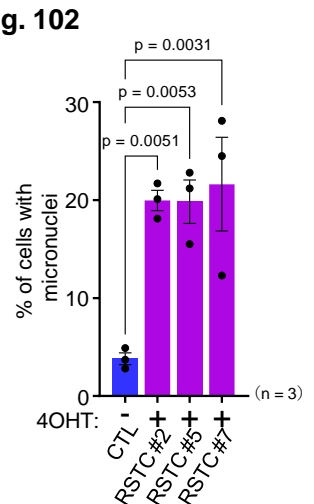


Fig. 102



ATRの高発現とキナーゼ活性に依存してゲノムの不安定性が亢進する

Fig. 97 MNとblebの代表像 (白矢印). スケールバー = 10 μ m.

Fig. 98 0.1 μ Mの4OHTで3日間処理したコントロール細胞とATR-1細胞におけるMNとbleb陽性細胞の定量. 結果は3つの独立した実験の平均値 \pm SEMを表す. 検定はtwo-way ANOVA Tukey's testによる.

Fig. 99 (左) phospho-HistoneH3 (Ser10), PICHおよびDAPIの共染色の代表的な画像. 白矢印はanaphase bridgeを示す. スケールバー = 10 μ m. (右) M期細胞におけるanaphase bridge陽性細胞の割合の定量化. 結果は3回の独立した実験の平均値 \pm SEMを表す. 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる.

Fig. 100 0.1 μ Mの4OHTおよび25nMのATRiで6日間併用処理したコントロール細胞およびATR-1細胞のコロニー形成効率アッセイの定量. 結果は4回の独立した実験の平均値 \pm SEMを表す. 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる.

Fig. 101 0.1 μ Mの4OHTと低濃度のATRiで3日間処理したATR-1細胞におけるMN陽性細胞の定量. 結果は, ATRi非存在下での6回の独立した実験と, ATRi存在下での3回の独立した実験の平均値 \pm SEMを表す. 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる.

Fig. 102 0.1 μ Mの4OHT含有培地で培養したRSTCsクローン#2, #5, #7におけるMN陽性細胞の定量. 結果は3回の独立した実験の平均値 \pm SEMを表す. 検定はone-way ANOVA Tukey's testによる.

Fig. 103

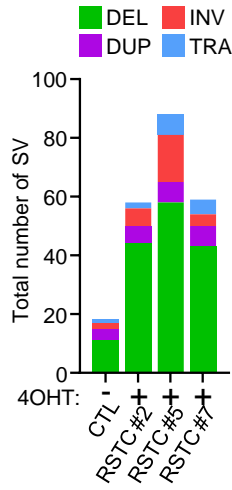


Fig. 105

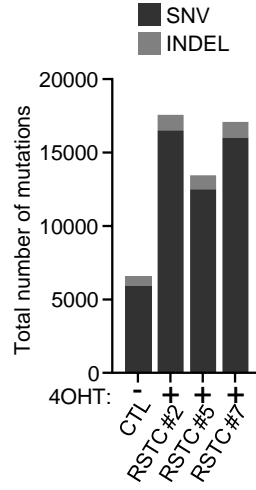


Fig. 106

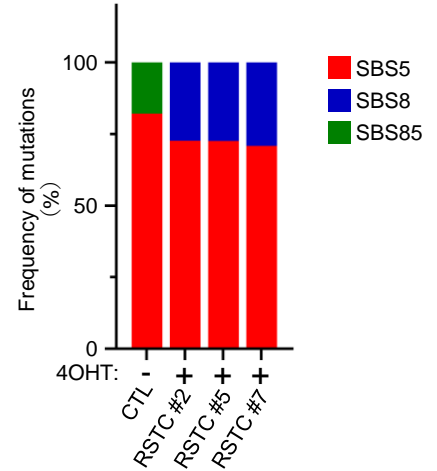
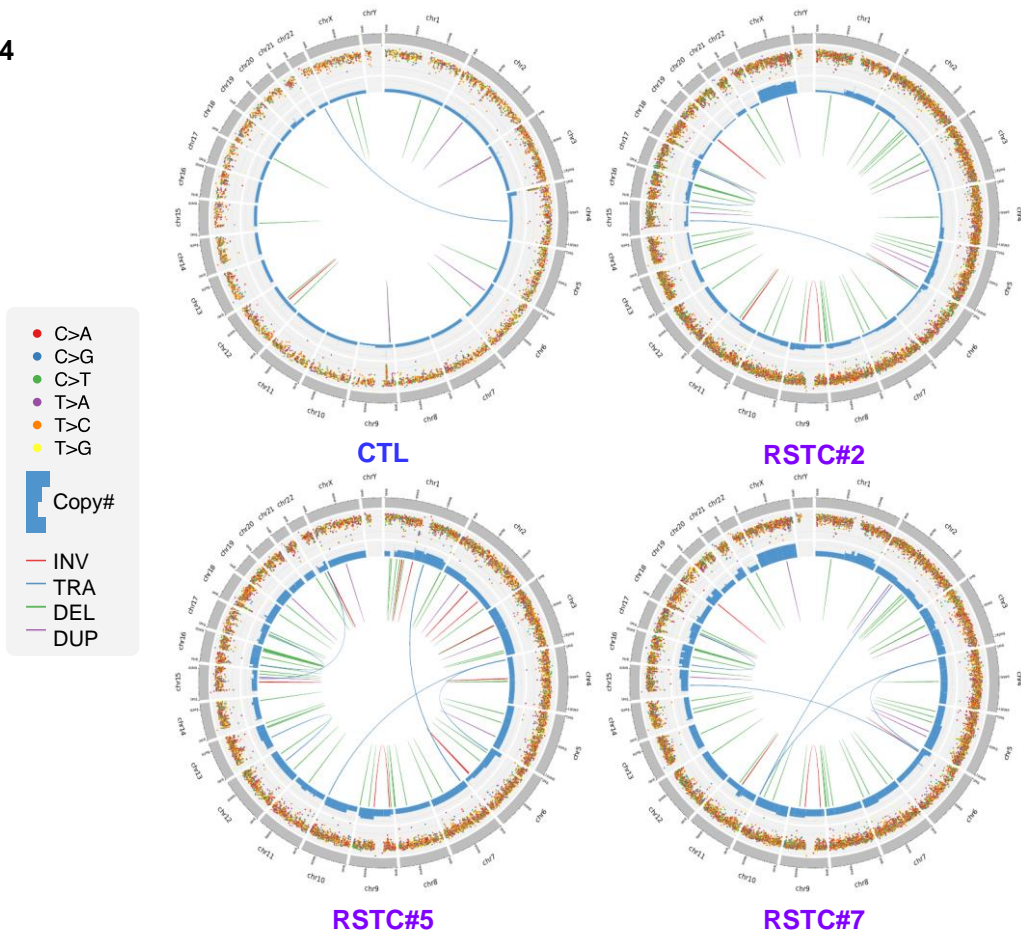


Fig. 104



RSTCではゲノムの不安定性が亢進する

Fig. 103 RSTCクローン#2, #5, #7における構造変異 (SV) の総数. DELは欠失, INVは逆位, DUPは重複, TRAは転座.

Fig. 104 全ゲノム配列から明らかになったRSTCクローン#2, #5, #7のCIRCOSプロット.

Fig. 105 RSTCクローン#2, #5, #7における変異の総数. SNVはsingle nucleotide variants, INDELは挿入および/または欠失.

Fig. 106 RSTCクローン#2, #5, #7の変異のうち, SBS5, SBS8, SBS85のシグネチャーに割り当てられた頻度を示す

Fig. 107

Cell line	Driver Gene	Driver aberration
H1975	EGFR	L858R / T790M
H1819	ERBB	amp.
H3122	EML4-ALK	fusion
A427	KRAS	G12D
H358	KRAS	G12C
H2009	KRAS	G12A

Fig. 108

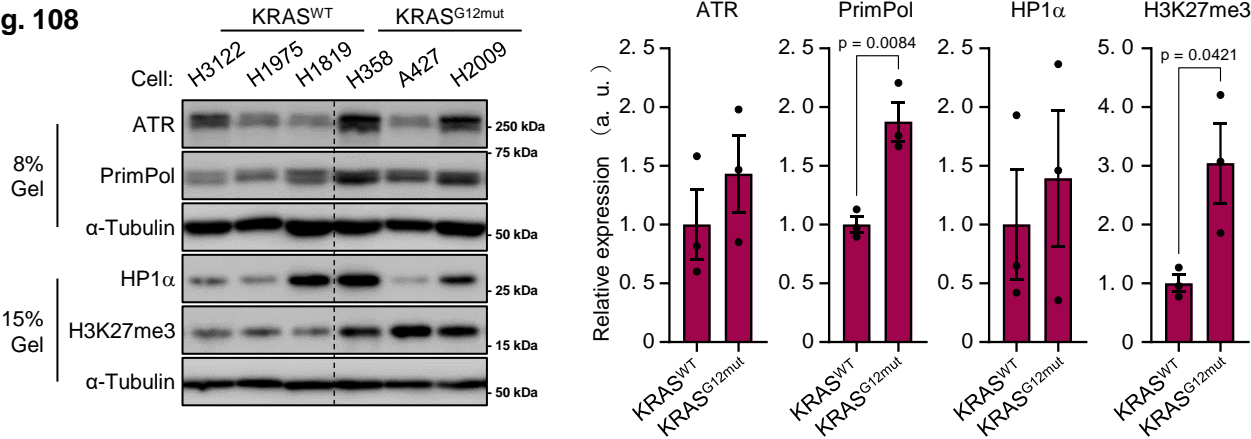


Fig. 109

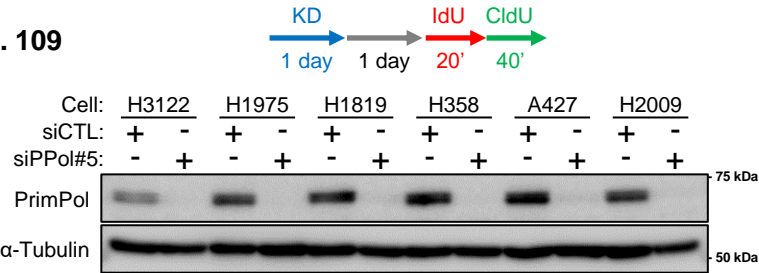
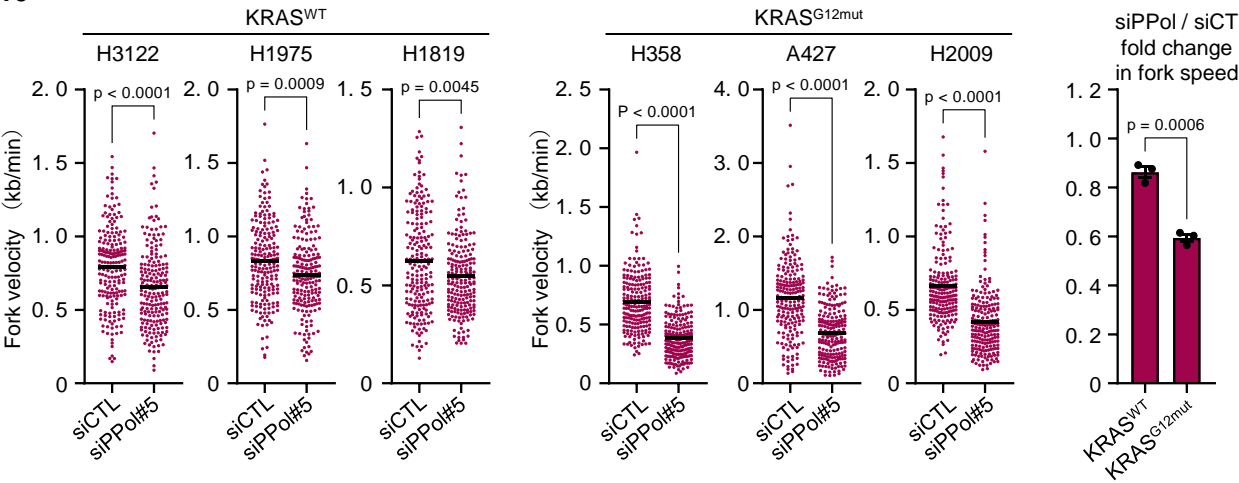


Fig. 110



発がん性KRASによりドライブされるがん細胞はPrimPol依存的な複製を慢性的に行う

Fig. 107 KRAS^{WT}細胞（H3122, H1975, H1819）とKRAS^{G12mut}細胞（H358, A427, H2009）の特徴. 変異情報はCellosaurus（PMID: 29805321）から取得した.

Fig. 108（左）KRAS^{WT}細胞（H3122, H1975, H1819）とKRAS^{G12mut}細胞（H358, A427, H2009）を2日間培養したタンパク質の発現レベルをWBで検出した結果.（右）各発現レベルの定量化. 結果は3細胞の平均値±SEMを表す. 検定はUnpaired t-test. による.

Fig. 109 細胞を1 nMのsiControlまたはsiPPol #5で24時間トランスフェクションし, 24時間siRNA非含有培地で培養した. タンパク質発現量をWBで検出した. 2回の独立した再現実験結果を示す.

Fig. 110（左）1 nMのsiControlまたはsiPPol#5を24時間トランスフェクションしたKRAS^{WT}細胞およびKRAS^{G12mut}細胞におけるフォーク速度のドットプロットと平均値. 2回の独立した再現実験の代表的な結果を示す. 黒線は平均を示す; n = 200; 検定はtwo-tailed Mann-Whitney t-testによる.（右）PrimPol KDによるフォーク速度の相対変化. 結果は3細胞の平均値±SEMを示す. 検定はtwo-tailed unpaired t-testによる.

Fig. 111

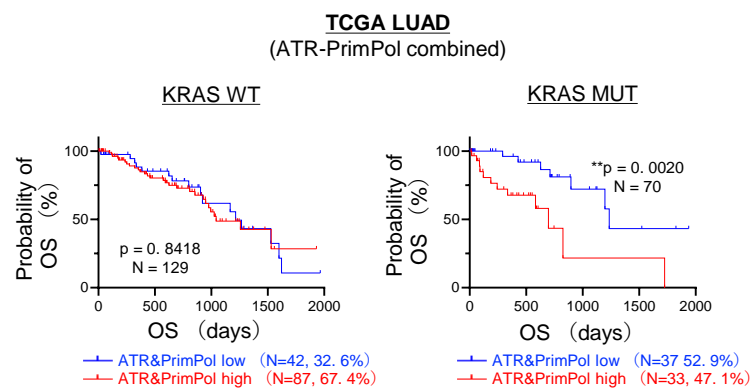


Fig. 112

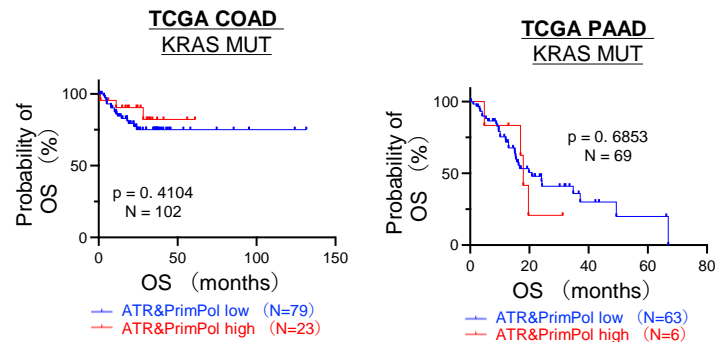


Fig. 113

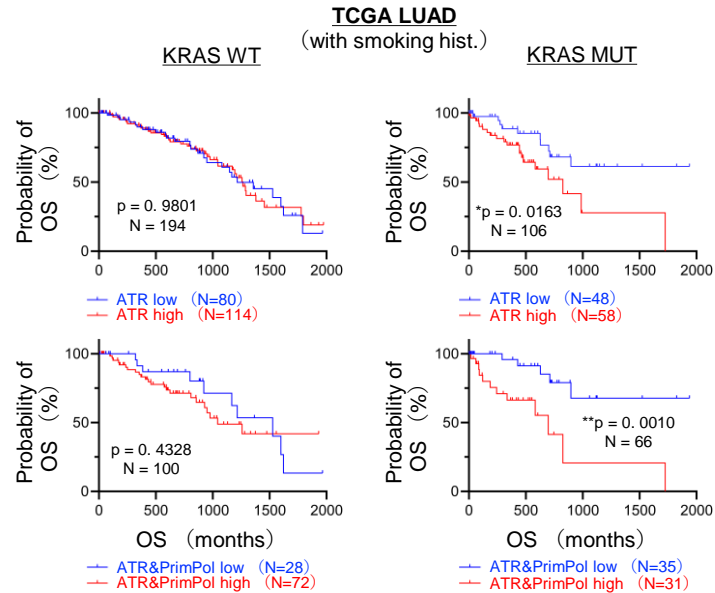


Fig. 114

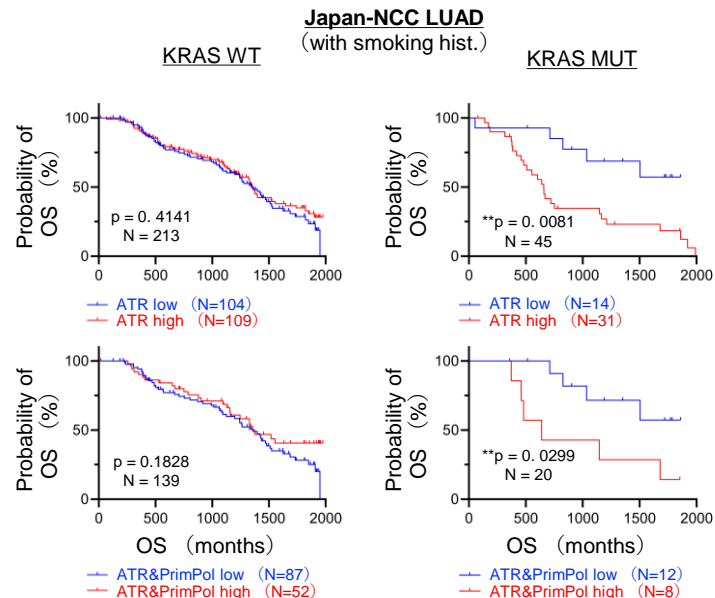
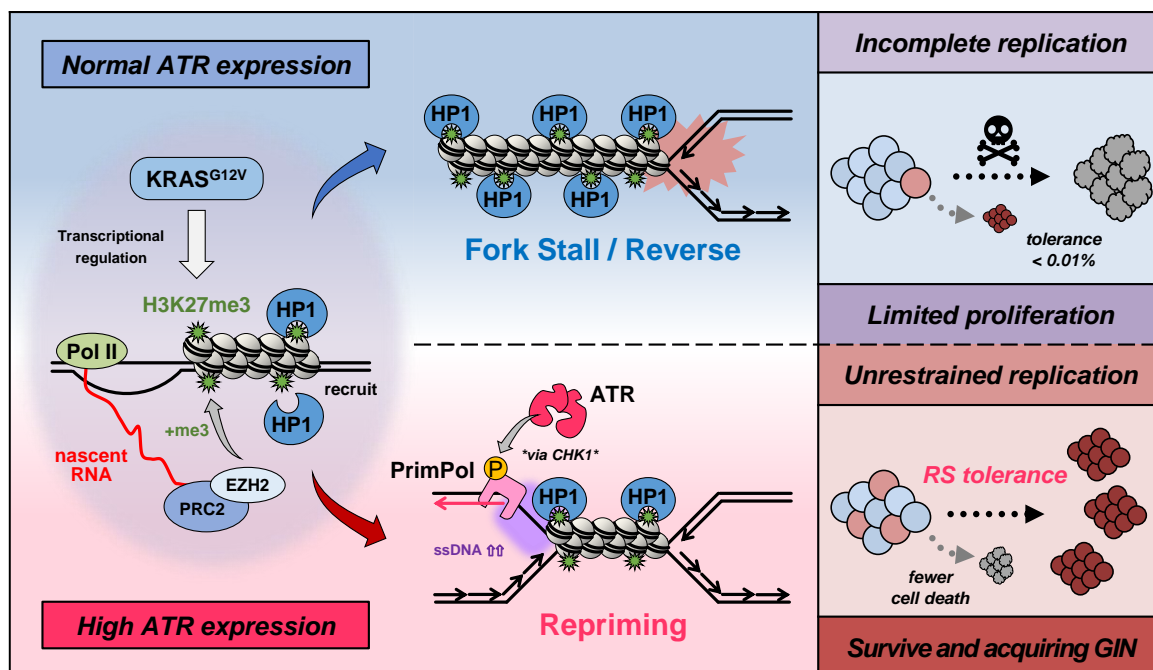


Fig. 115



ATRとPrimPolの高発現は、LUAD患者の予後不良と関連する

Fig. 111 KRAS^{WT}またはKRAS^{mut}をもつLUAD患者199例のATRおよびPrimPolのmRNA発現をもとに2群に分け、全生存期間（OS）を解析した。Log-rank p-valuesを示す。

Fig. 112 KRAS^{mut}をもつ結腸腺がん（COAD）患者102例および、膵臓腺がん（PAAD）患者69例のATRおよびPrimPolのmRNA発現をもとに2群に分け、全生存期間（OS）を解析した。Log-rank p-valuesを示す。

Fig. 113 TCGA（LUAD）コホートの喫煙経験者のうち、KRAS^{WT}またはKRAS^{mut}を発現しているLUAD患者のATR、またはATRおよびPrimPolのmRNA発現をもとに2群に分け、OSを解析した。Log-rank p-valuesを示す。

Fig. 114 NCC（日本、LUAD）コホートの喫煙経験者のうち、KRAS^{WT}またはKRAS^{mut}を発現しているLUAD患者のATR、またはATRおよびPrimPolのmRNA発現をもとに2群に分け、OSを解析した。Log-rank p-valuesを示す。

Fig. 115 KRAS^{G12V}発現の初期段階において、KRAS^{G12V}はH3K27me3を伴う転写依存的なヘテロクロマチン領域を誘導し、RSを惹起する。細胞が正常レベルのATRを発現している場合、複製フォークが減速/停滞するため、複製は未完了な状態となる。反対に、細胞が高レベルのATRを発現している場合、ATR-PrimPol経路が複製フォークにおける制御モジュールとして機能するため、reprimingを促進することで複製を完了させ、ゲノム不安定性を獲得しながら、KRAS^{G12V}が誘導するRS下で細胞が生き残ることを可能にする。