

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06993

研究課題名(和文)細胞周期進行促進因子Cdc25Bの安定化に関わるPPaseの解明

研究課題名(英文) Identification of the responsible PPase that stabilize cell cycle regulator Cdc25B

研究代表者

山下 克美 (Yamashita, Katsumi)

金沢大学・薬学系・准教授

研究者番号：10191280

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Cdc25Bの安定性がN-末端側の85番めから103番めまでの領域のリン酸化状態に依存することを発表した。本研究では、Cdc25Bの安定化に働くPPaseの同定を目指した。

Cdc25Bの安定性の検定は、GFP融合Cdc25Bを発現させ蛍光強度をモニターすることで行なう。GFP融合Cdc25B発現を指標に単離したクローンは、継代によりGFPシグナルが減弱するため現在まで求める細胞株は得られていない。オキサダ酸処理による予備的な結果をもとに、当該PPaseの第一候補としてPP2Aを選択している。このサブユニットタンパク発現ベクターを樹立しており、細胞株を樹立次第予定の研究を開始できる状態にある。

研究成果の概要(英文)：We have reported that stability of Cdc25B is depending on the phosphorylation state of its N-terminus region; unstable in high phosphorylation level and stable in low situation.

In this project, we aimed to identify PPase that stabilize Cdc25B, preliminary results being strongly indicating PP2A is a primary candidate. We planned to monitor Cdc25B expression with green fluorescence (GF) of GFP-fused Cdc25B. We isolated several positive clone but gradual decrease of GF signal was observed in all cloned isolated. The reasons of which have not yet verified but high level Cdc25B expression would be toxic to cells. We have been trying to isolate suitable clone for detecting Cdc25B expression whose protein level would be low but detectable, and healthy for established cells.

Along with the clone isolation, we have established plasmids, by using which we can inducibly express PP2A subunit protein. As soon as cell lines will be isolated, we start the project to clarify responsible PPase.

研究分野：細胞生物学

キーワード：タンパク質安定化 リン酸化 脱リン酸化 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

Cdc25 は細胞周期進行に必須なCDKを脱リン酸化し活性化する酵素であり、哺乳動物では、A、B、C の3種のパラログが存在する。Cdc25Aはまたゲノム損傷の標的でもあり、細胞がDNA損傷を受けるとユビキチン化を受けた後分解され、細胞周期停止が起る。Cdc25Bもゲノム損傷応答との多様な関わりが考察されていたが、私達はCdc25Bはゲノム損傷に応答する因子でない可能性を示す一方、ゲノム損傷を誘発しない細胞へのストレス応答によりCdc25Bがユビキチン化依存的に分解され細胞周期停止が起こること、即ちCdc25Bはゲノム損傷ではなく非ゲノム損傷応答の標的であり、ユビキチン化を介して分解されるとの説を発表した。

さらに、Cdc25Bが非ゲノム損傷応答により分解されるためには、N-末端側の101番と103番のセリン残基 (Ser) のリン酸化が必要であることと、さらにその上流の3個のグルタミン酸 (Glu) と9個のSerから構成される12アミノ酸からなるストレッチ中の9個のSerがリン酸化されることが、効率的なユビキチン化に大きく寄与することを強く示唆する結果を得、これらを論文発表してきた。

これらの結果は、Cdc25Bの効率的な分解や安定化はCdc25BのN-末端側のリン酸化状態に支配されることを強く示唆する。私達は、S101とS103のリン酸化はストレス依存的に活性化されるJNKやp38により行なわれることを示したが、その上流の9個のSerをリン酸化し不安定化する (仮想的な) キナーゼや、S101/103の脱リン酸化や、上流の9個のSerを脱リン酸化しCdc25Bを安定化することが期待される

(キナーゼと同様に仮想状の) ホスファターゼ (PPase) については全く不明であった。

Cdc25B は多くの腫瘍細胞で発現の亢進が報告されている。発現亢進の原因の一部は、転写促進、即ち mRNA の発現上昇との報告もある。しかしながら上述のようなこれまでの私達の研究結果で ha

Cdc25B タンパク質レベルの安定性の制御が発現の亢進に寄与している可能性も考えられる。Cdc25B タンパク質の安定性制御機構の異常により発現の亢進が観察されるなら、上述の部位のリン酸化抑制または脱リン酸化亢進が有力な原因と推察される。しかしながらこれまで論文として発表されてきた研究では、その点は明らかではない。

2. 研究の目的

本研究は、1に述べたような私達の研究結果に基づき、Cdc25Bの安定性制御機構の解明を目指したものである。Cdc25Bの発現は、正常な細胞周期では低レベルに保たれており、恒常的な発現亢進は染色体異常を誘発する。したがって、安定化制御機構の解明は、正常な細胞周期制御ならびに発がんにおける Cdc25B の寄与を考察するうえで重要な情報をもたらす。

そこで、本研究では (背景の項で述べたように) Cdc25B のリン酸化による安定性制御に着目し、その中でも安定化に寄与する可能性が高い PPase を同定することを目的とした。

本研究を開始するまでに得られた予備的な実験結果より、オカダ酸感受性の PPase が Cdc25B の脱リン酸化酵素の候補と予測された。そこで、もっとも代表的なオカダ酸感受性 PPase である PP2A に着目し、その証明を第一目的とした。そして PP2A が責任 PPase として同定された場合は、そのサブユニット構成、特に基質特異性に関わる B サブユニットの分子種の解明を最終目標とした。

3. 研究の方法

(1) オカダ酸感受性 PPase を検索するための細胞株の構築とオカダ酸をはじめとした PPase 阻害剤処理

予備実験の結果から得られた責任 PPase がオカダ酸感受性の可能性が高いことの再現性および、候補 PPase (本研究の場合は PP2A) を同定するための細胞株の構築を試みた。Cdc25B の安定性の検討は、Cdc25B の N-末端側に GFP (本研究では GFP 誘導体であり、EGFP より蛍光強度が高い Venus) を融合させた遺伝子を細胞へ導入し、Venus-Cdc25B を安定発現する細胞株を使用する計画とした。上述のような細胞株へのオカダ酸処理や、PPase の触媒サブユニット (C サブユニット) の遺伝子を発現させ、蛍光強度の変動を追跡することで安定性を検討することを計画した。

蛍光強度の変動は、まず蛍光顕微鏡を使用して定性的な検討と、FACS を使用して定量的な蛍光強度の変化の測定を計画した。

(2) PPase、特に PP2A ホロ酵素を構成し基質特異性の決定に関わる B サブユニットタンパクを誘導的に発現可能な細胞株の樹立

本研究では、誘導発現系として Tet/ON システムを採用することとし、蛍光量の変動は PPase の B サブユニットタンパクを誘導後に、蛍光顕微鏡観察で定性的に、FACS により定量的に測定することとした。即ち、(1) で樹立された Venus-Cdc25B の安定発現細胞に PPase B サブユニットタンパクを誘導発現発現でみる細胞株の構築である。この方法では、原則的には全ての細胞で B サブユニットタンパクを発現させることが可能である。さらに発現量をコントロールできるため、一時発現系により強制的にタンパクを発現させて蛍光量の変動を測定するよりも定量的であることが期待できた。

(3) PPase サブユニット発現ベクターの構築

予備実験の結果から導かれた、PP2A が Cdc25B 脱リン酸化の責任 PPase であるとの仮説をもとに、以下サブユニット発現ベクターを構築した。これらのベクターは全て、上述のように Tet/ON 誘導発現系として使用可能

な pTRE3G ベクターを (クロンテック社製) を一部改変したベクターで構築されている。この実験に採用したのは Tet-ON 発現制御系触媒サブユニットの C サブユニットは、単独発現では細胞毒性が生じるとの論文報告が複数なされており、また、連携研究者の島礼博士 (宮城県立がんセンター研究所) のアドバイスも考慮して、C サブユニット誘導発現系は、ネガティブコントロール候補として発現ベクターへの構築を行なった。C サブユニット発現系以外に作製したベクターは以下に示されている。

①B サブユニット (制御サブユニット) 発現ベクター

構築した分子種は、 α 、 β 、 δ 、 ϵ 、 γ の 5 種類である。これらは全て、N-末端側に FLAG タグを付した構造となっており、タンパク発現は抗 FLAG 抗体で検出できる。

②A サブユニットと B サブユニットの融合タンパク発現ベクター

①で作製した 5 種のうち、最も代表的な B サブユニットである α サブユニットを選択し、B サブユニット遺伝子の下流にリンカー配列を挿入し、その下流に T7 タグを配した C サブユニット遺伝子を挿入した。C サブユニットは活性化状態で C-末端がメチル化されているために、C-末端がフリーになるように B サブユニットの下流に配置した。即ち、NH₂-FLAG- α サブユニット- (リンカー) -サブユニットとして発現される予定である。

③A、B、C サブユニット融合タンパク発現ベクター

②で作製した B-C サブユニット融合タンパク発現ベクターを基礎にして、B サブユニットと C サブユニットの間に、スキップフォールドサブユニットである A サブユニットの遺伝子を、N-末端側に Myc タグを配した形で N-末端側と C-末端にリンカー配列を介して B、A の両サブユニットに挟まれるように挿入した。この 3 サブユニットで構成されるタンパクが完全長で発現されれば、ウエスタンブロッティングにより、約 150KD の位置に抗 FLAG、抗 Myc、抗 T7 の各抗体全てで認識されるタンパクとして検出されることになり、実際にそのようなバンドが検出されている。

4. 研究成果

(1) Venus-Cdc25B 安定発現細胞の構築を行なった。ベクターには Bsd 抵抗性遺伝子があるため、Bsd 抵抗性をマーカーにクローンを選択し、それぞれの細胞について培地への Dox 添加後の抗 Venus (GFP) 抗体によるウエスタンブロッティングを用いたタンパク発現と緑色蛍光の出現を確認した。蛍光の出現は、蛍光顕微鏡下に Venus 由来の緑色蛍光を確認し最終的に実験に供する細胞を選択した。ウエスタンブロッティングと蛍光検出の両方が陽性となったクローンを選択し、最終的には 10 クローンを選択した。しかしながら 10 クローン全てにおいて、選択中には強

い緑色蛍光並びに、ウエスタンブロッティングでの明瞭なバンドが検出されたが、最終的には微弱な緑色蛍光を発する細胞しか残らなくなった (3 ライン)。

このような弱い蛍光を発する細胞をオカダ酸で処理しても、予備実験で得られたような明確な蛍光増強は確認できなかった。さらにウエスタンブロッティングで検出されるバンドが減弱していた。

現在のところその理由は不明であるが、Venusu-Cdc25B が CMV プロモーターと強力なプロモーターで発現されているため、Cdc25B の長期間にわたる高レベルの発現により細胞が死滅または、Venus-Cdc25B の発現抑制を生じた可能性が考察された。これらの結果を総合して、蛍光タンパクの蛍光量を指標に研究を進めることは困難と考えた。

以前の私達の研究で、外来 Cdc25B の安定発現細胞は、クローンの選択当初には比較的高レベルの Cdc25B の発現が認められるが、細胞分裂を経るに従って発現が低下するという結果が得られていた。今回も同様な結果になったため、Cdc25B 安定発現細胞の樹立には、Cdc25B の発現量を低レベルに保つ工夫が必要と考えられた。即ち、CMV プロモーターより弱いプロモーターを採用することでこの問題が解決することが期待された。しかしながら、PPase 阻害剤処理や遺伝子発現による Cdc25B タンパクの増減を緑色蛍光の増減として検討することはできない可能性が高いことが考えられる。

その対策として私達は、CMV よりも弱い SV40 プロモーターにより転写をコントロールするベクターを作製しさらに、Venus 配列を外し、代わりに N-末端側に Myc タグを付した Cdc25B を細胞に導入し、抗 Myc 抗体によるウエスタンブロッティングで発現細胞を選択する実験を進めている。この改良で適切な細胞株が得られない場合は、さらに転写活性が弱い TK プロモーターの採用も考えているが、現在は SV40 プロモーター系で研究を進めている。

(2) (3) 研究開始時に (1) のような結果になったために、当初の目的である PP2A 遺伝子発現実験により PP2A の Cdc25B 安定性への関与に関する研究がほとんど進まなかった。即ち、PP2A の構成サブユニットは、Cdc25B 発現細胞中で誘導発現させることで Cdc25B 安定化への寄与を検定する予定であったが、その研究へ進むことができなかった。

そのため、それ以降は本研究において Myc-Cdc25B 発現細胞の樹立と平行して、方法の (2) と (3) の研究、即ち誘導発現ベクターの構築を進め、Myc-Cdc25B 発現細胞の樹立時には当初の研究計画を即座に実行できる状態にしておくことに研究方針を変更し、最終的に全てのベクターを作製した。即ち、5 種類の PP2A-B サブユニット誘導発現ベクター、 α B サブユニットと C サブユニットの融

合タンパク発現ベクター、さらにスキップ
ワールドのAサブユニットとの融合タンパク
(B-A-C 融合タンパク) 発現ベクターを作製
した。これらのタンパクは transient 誘導発
現系で発現が確認されており、目的細胞の樹
立可能な状態にある。

一方、これらの遺伝子を誘導発現できる細
胞株を作製し内在の Cdc25B の発現変動の検
定を試みたが、内在の Cdc25B を感度よく検
出できる市販の抗体がないために、非発現柔
道細胞中の Cdc25B タンパクすら検出できな
いため、これまでのところ Cdc25B の安定性
の変動に関する研究は進展していない。

これらの研究の過程で、PPase の一つであ
る PPM1D タンパクが Cdc25B の安定性に影響
を与える可能性を考えた。PPM1D は腫瘍での
発現亢進が報告されておりまた、Cdc25B も腫
瘍での発現亢進の報告が多数あることから、
両者の発現に相関がある可能性も検討する
ことにした。

PPM1D タンパクも PP2A サブユニットと同様
に誘導発現系を用いて検定を行なうことと
して、FLAG タグとして発現させるベクターを
構築した。PPM1D タンパクもまた PP2A のサブ
ユニット同様に、一時発現系での誘導発現を
確認している。

以上のように Myc-Cdc25B 安定発現細胞を
分離でき次第、当初の計画通りの研究が進め
られる状態にはなっている。現在は、鋭意
Myc-Cdc25B 安定発現細胞を分離中である。

PP2A の基質特異性に関する研究は進展し
ているとはいえない。私達は、この研究の過
程で、B サブユニットと A サブユニットの融
合タンパクや A、B、C サブユニットを融合タ
ンパクとして発現できるベクターを作製し
た。これらの融合タンパクがホスファターゼ
活性を持つことが示されれば、PP2A の基質特
異性の検討に有力なツールとなりうる。私達
はまだ PPase 活性の検出を試みていないが、
今後そのような研究を進める予定である。

以上、本研究の3年の間には、当初計画し
ていた研究を進めることはできなかったが、
研究のスピンオフのような研究成果が得ら
れてきている。今後はこれらの研究資材を用
いて、本研究として当初計画していた研究を
積極的に進めて行く予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に
は下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下 克美 (YAMASHITA Katsumi)
金沢大学・医薬保健研究域・准教授
研究者番号：10191280

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

持田 悟 (MOCHISDA Satoru)
熊本大学・大学院先端機構・准教授
研究者番号：69590304

島 礼 (SHIMA Hiroshi)
宮城県立がんセンター研究所・所長
研究者番号：10196462

善岡 克次 (YOSHIOKA Katsuji)
金沢大学・がん進展制御研究所・教授

(4) 研究協力者

なし