

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10434

研究課題名(和文) SUMO翻訳後修飾による放射線細胞応答の制御機構の解明と感受性予測への応用

研究課題名(英文) Regulation of DNA damage responses through Sumo modification and its application for radiosensitization

研究代表者

榎本 敦 (Enomoto, Atsushi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・講師

研究者番号：20323602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、正常細胞と様々な癌培養細胞を用いて、放射線や温熱などの処理によるタンパク質の挙動についてプロテオーム解析を実施した。その結果、温熱処理あるいはエックス線・温熱併用時に発現量が低下する因子としてSerine-Threonine Kinase 38 (STK38)を同定した。STK38の発現低下はタンパク質分解酵素の阻害剤で抑制された。またin vitro cleavage assayではCalpainがSTK38をダイレクトに分解した。さらにSTK38の相互作用分子であるMAPKファミリーに属するMEKK2がカルパインによる分解をリン酸化により制御していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では温熱処理により細胞内においてタンパク質リン酸化酵素の一種であるSTK38がタンパク質分解酵素カルパインによって分解されることを明らかにした。生命科学研究の進展により、温熱に対する細胞応答の分子メカニズムが少しずつ明らかになってきている(8, 9)。温熱耐性や抗腫瘍効果をもたらす因子・マーカーの同定が進むことによって、温熱療法と同等以上の効果を生み出す創薬への道も開ける。また放射線や抗がん剤などとの併用を行う上で、温熱標的因子や誘導因子の性質・挙動を把握しておくことは治療スケジュールの計画に重要な指針を与えるであろう。

研究成果の概要(英文)：Serine-threonine kinase 38 (STK38) is a member of the protein kinase A (PKA) /PKG/PKC-family and is implicated in the regulation of cell division and cell morphogenesis. Here, we show treatment with heat induced degradation of STK38. The calpain inhibitor calpeptin suppressed heat-induced STK38 cleavage. Moreover, in vitro cleavage assay demonstrate that calpain I directly cleaves STK38 at the proximal N-terminal region. Deletion of the N-terminus region increases its stability against heat. We further demonstrate that a MAPKK kinase (MAP3K), MEKK2 prevents heat-induced cleavage of STK38. MEKK2 knockdown enhanced heat-induced degradation of STK38. We performed in vitro MEKK2 assay and identified a key regulatory phosphorylation site in STK38 by MEKK2. Experiments with phosphorylation-defective mutant demonstrate that phosphorylation of Ser 91 is important for STK38 stability, as it is susceptible to attack by the calpain degradation pathway unless this residue is phosphorylated.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線 ハイパーサーミア タンパク質分解 STK38 Calpain

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質は、リン酸化、アセチル化、ユビキチン化など様々な翻訳後修飾を受けて、品質管理や機能の調節がなされている。リン酸化の研究は以前から盛んに行われており、放射線による DNA 損傷やそのシグナル伝達においてセンサー・トランスデューサー・エフェクター分子のリン酸化カスケードを介した活性化が、タンパク質レベルでの機能発現や細胞レベルでの応答を誘導するのに重要であることが明らかになってきている。研究代表者も、これまでリン酸化プロテオーム情報を基盤とした放射線シグナル伝達の研究とリン酸化による細胞応答制御のメカニズムについて研究を進めてきた。その中で放射線によって活性化する新規の酵素 STK 38 (Serine Threonine Kinase 38) を同定し (Enomoto et al, Oncogene, 2008)、さらに STK38 は GSK-3 によってネガティブに制御されること (Enomoto et al, Free Radic Mol. Med, 2012) や基質として CDC25A をリン酸化し、DNA 損傷後の G2 チェックポイントの制御に関わっていることなどを明らかにしてきた (Fukawasa et al, Cell Signal, 2015)。

リン酸化プロテオームの研究を進める一方で、リン酸化では説明できない泳動パターンや質量分析の結果にしばしば直面した。そこで放射線によって活性化するキナーゼ STK38 のバンドパターンが変化することを指標にユビキチン化や SUMO (small ubiquitin-related modifier) 化の検討を行った結果、放射線によって活性化する STK38 は SUMO 化修飾されることが判明した。さらに HEK293T 細胞を用いて、SUMO1-3 をそれぞれ過剰発現させると、SUMO1,-2 を過剰発現させた時にのみ STK38 の発現量が増大した。一方、先行研究において STK38 の発現量は放射線感受性と相関があることが判明した (Enomoto et al, Eur. J. Cancer 2013)。近年、DNA 修復に関わる複数のタンパク質が SUMO 化されることが示されたことから (Morris et al, Nature 2009; Sarangi et al, 2015 Trends. Biochem. Sci)、SUMO をはじめタンパク質の翻訳後修飾が放射線感受性を制御するのではないかと考えた。

2. 研究の目的

SUMO はユビキチンと構造的に高い相動性を有するタンパク質であり、基質タンパク質のリジン (K) 残基に結合し、そのタンパク質の安定性や機能調節に関わっている。哺乳類細胞においては、SUMO1-4 まで知られているが、各々の特異性や相補性などの詳細については未知の部分が多い。一方、SUMO 化の破綻は発生異常を呈し、老化に伴う癌や神経変性と深く関わっている。そこで本研究においては、SUMO 化やユビキチン化タンパク質の相同性の高いアミノ酸領域をエピトープとした抗体カラムを用いて、放射線によって修飾されるタンパク質の同定とその意義を明らかにし、感受性の制御や応答のメカニズムに解明するとともに SUMO ユビキチン化を指標とした感受性予測法を開発する。DNA 損傷応答における SUMO 化の解明は、放射線感受性や癌化のメカニズム機構のみならず新しい治療法の開発に有用な情報を与えることが大いに期待される。

3. 研究の方法

これまでに申請者は、リン酸化プロテオーム解析を通じて、X 線照射によりリン酸化状態が変化するタンパク質を複数同定してきた。本研究においては SUMO 化に焦点を当て、様々な条件下 (未処理、X 線単独照射、FLAG-tagged SUMO を導入後に X 線照射) の細胞からトータルタンパク質を調製し、抗 SUMO あるいは抗ユビキチン化抗体結合カラムを用いてタンパク質画分を濃縮・精製する。これにより、トータルタンパク質の網羅的解析において見られるようなスポットの不分離やノイズの削減を期待できる。精製した SUMO 化タンパク質画分を高分離能 ZOOM

IEF Fractionator (Invitrogen)を用いて等電点ごとに濃縮しながら、等電点（一次元）電気泳動を行う。続いて二次元目の電気泳動を行い、分子量毎に篩い分けする。このように等電点・分子量に従って分離したタンパク質を高感度蛍光色素（Sypro Ruby, Thermo Fisher Sci）を用いて可視化する。そしてゲル画像解析装置（BioRad）を用いて、X線照射時に特異的に変化する翻訳後修飾化タンパク質のスクリーニングを行い、候補となるタンパク質をゲルスポットカッター（BioRad）により切り出し、精製する。次に精製したタンパク質をトリプシンで消化後、質量分析装置（島津製作所、AXIMA-CFR MALDI-TOF/MS）による解析を行い、分子量情報を得る。トリプシン消化物の分子量データベースをもとにした質量分析用検索エンジン（MASCOT Research）を用いて、同一の消化パターンを持つタンパク質を探索する。DNA 損傷の初期過程では、AT（Ataxia Telangiectasia）の原因遺伝子産物である ATM のリン酸化を始めとした翻訳後修飾や DNA 修復複合体形成（MRN complex; Mre11, Rad50, Nbs1 complex）などのタンパク質-タンパク質間相互作用が DNA 損傷シグナル伝達のイニシャルイベントとして起こる（Enomoto and Miyagawa, Prog.Theor. Phys. 2008）。これらのイニシャルイベントに続いて、細胞・損傷の重篤度に応じた特異的なシグナル伝達経路の活性化が起こり、DNA 修復、細胞周期停止、細胞死などの細胞応答が誘導される。そこで同定したタンパク質のうち、放射線感受性に影響を与える因子について、翻訳後修飾部位変異体における放射線応答を詳細に分析し、その意義を明らかにする。具体的には、DNA 二重鎖切断のマーカーである γ -H2AX を指標とした免疫染色や Comet assay による DNA 修復能の解析、フローサイトメーターを用いて細胞周期分布を指標としたチェックポイント制御や細胞死の解析を通じて、放射線感受性の修飾がどの応答プロセスの破綻あるいは保護によるものかを検討する。

4 . 研究成果

本研究は、細胞致死あるいは放射線増感に直結する翻訳後修飾タンパク質を生化学的アプローチにより同定し、放射線あるいは他の療法との併用による抗腫瘍効果における真の標的を明らかにするとともに創薬に向けた土台を構築することを目的とする。正常細胞と様々な癌組織由来の培養細胞を用いて、エックス線、紫外線、抗がん剤や温熱などの単独あるいは併用時によるタンパク質の挙動について二次元電気泳動および質量分析装置を使用したプロテオーム解析を実施した。その結果、温熱処理あるいはエックス線・温熱併用時特異的に発現量が低下する因子として Serine-Threonine Kinase 38（STK38）を同定した。STK38 の発現低下はタンパク質分解酵素の阻害剤である ALLN や Calpeptin などによって抑制されたことから、遺伝子発現レベルによる調節ではなく、タンパク質分解経路による翻訳後修飾によるものと推測された。次に *in vitro* においてリコンビナント STK38 がカルパインやユビキチン化によって修飾されるかを調べた結果、ユビキチン化と並行して、カルパインが STK38 をダイレクトに分解することを明らかにした。またカルパインが活性化するような条件であるカルシウムイオノフォア A23518 を細胞に処理した結果、STK38 の部分分解が誘導された。これらのことから、STK38 のタンパク質管理はユビキチン化とカルパインにより制御されていることが示唆された。さらに STK38 の相互作用分子であり MAPK ファミリーに属する MEKK2 がカルパインによる分解をリン酸化により正に制御していることを明らかにした（A. Enomoto, et al. Prevention of calpain-dependent degradation of STK38 by MEKK2-mediated phosphorylation. Sci. Rep. (2019) 10.1038/s41598-019-52435-8）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 A. Enomoto, T. Fukasawa, H. Tsumoto, M. Karube, K. Nakagawa, A. Yoshizaki, S. Sato, Y. Miura, K. Miyagawa	4. 巻 10
2. 論文標題 Prevention of calpain-dependent degradation of STK38 by MEKK2-mediated phosphorylation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 1038
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1038/s41598-019-52435-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 榎本 敦	4. 巻 39
2. 論文標題 温熱による抗腫瘍効果の真の標的解明と臨床・創薬への応用	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本健康開発雑誌	6. 最初と最後の頁 30-36
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 A. Morita, I. Takahashi, M. Sasatani, S. Aoki, B. Wang, S. Ariyasu, K. Tanaka, T. Yamaguchi, A. Sawa, Y. Nishi, T. Teraoka, S. Ujita, Y. Kawate, C. Yanagawa, K. Tanimoto, A. Enomoto, M. Neno, K. Kamiya, Y. Nagata, Y. Hosoi, T. Inaba.	4. 巻 -
2. 論文標題 A chemical modulator of p53 transactivation that acts as a radioprotective agonist.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol. Cancer Ther.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1535-7163.MCT-16-0554	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Y. Furusawa, Y. Yamanouchi, T. Iizumi, Q. L. Zhao, Y. Mitsuhashi, A. Morita, A. Enomoto, Y. Tabuchi, and T. Kondo.	4. 巻 -
2. 論文標題 Checkpoint kinase 2 is dispensable for regulation of the p53 response but is required for G2/M arrest and cell survival in cells with p53 defects under heat stress.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Apoptosis	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10495-017-1402-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 榎本敦、深澤毅倫、宮川清
2. 発表標題 ストレス応答キナーゼSTK38お安定性と放射線増感への応用
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会第57回生物部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榎本敦、深澤毅倫、宮川清
2. 発表標題 ストレス応答キナーゼSTK38の安定性制御メカニズム
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榎本敦、深澤毅倫、宮川清
2. 発表標題 STK38の安定性制御メカニズム
3. 学会等名 日本分子生物学会第42回年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 榎本敦、深澤毅倫、宮川清
2. 発表標題 温熱によるCa ²⁺ /カルパインを介した放射線増感メカニズム
3. 学会等名 第20回癌治療増感シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 榎本 敦、深澤 毅倫、宮川 清
2. 発表標題 ストレス応答キナーゼSTK38の安定性と放射線増感への応用
3. 学会等名 日本放射線腫瘍学会生物部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎本 敦、深澤 毅倫、宮川 清
2. 発表標題 ストレス応答キナーゼSTK38の安定性と放射線増感への応用
3. 学会等名 日本放射線影響学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎本敦、深澤毅倫、宮川清
2. 発表標題 ストレス応答キナーゼSTK38の安定性と放射線増感への応用
3. 学会等名 国際癌治療増感研究協会・第20回癌治療増感シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 榎本敦、深澤毅倫、宮川清
2. 発表標題 STK38/NDR1の安定性制御メカニズム
3. 学会等名 日本分子生物学会・第40回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 榎本敦、深澤毅倫、宮川清
2. 発表標題 ストレス応答キナーゼSTK38の安定性と放射線増感への応用
3. 学会等名 日本放射線影響学会・第60回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----