

平成21年4月7日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19590328

研究課題名（和文） がん化における新規 Chk1 リン酸化機構の役割

研究課題名（英文） Roles of Chk1 phosphorylation at novel sites in carcinogenesis.

研究代表者

後藤 英仁（GOTO HIDEMASA）

愛知県がんセンター（研究所）・発がん制御研究部・室長

研究者番号：20393126

研究成果の概要：Chk1 は、DNA 複製／障害チェックポイントの際に ATR によってそのセリン 317 およびセリン 345 がリン酸化されて活性化される。今回、我々は、チェックポイント反応の際、Chk1 のセリン 286 およびセリン 301 がサイクリン依存性キナーゼ 2 (Cdk2) によってリン酸化させることを明らかにした。また、Cdk2 依存性のリン酸化反応と ATR 依存性のリン酸化反応は、Chk1 の同一分子上で引き起こされるが、これらの2つの反応の間に強い依存性は認められなかった。以上の結果は、Chk1 の機能制御は、多くの部位のリン酸化反応を介して制御されていることを示唆している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子腫瘍学、細胞周期、チェックポイント、Chk1、サイクリン依存性キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

細胞は、染色体（ゲノム）の複製・分配の周期を巧妙に制御しながら、分裂している。この細胞周期の制御機構に異常が生ずることが、発がん過程やがんの染色体不安定性の進展に重要な役割を担っていることが知

られている。近年の研究成果の蓄積により、細胞周期の進行には、サイクリンとそれに依存する蛋白質リン酸化酵素（キナーゼ）群が重要な役割を担っている。例えば、G2期からM期（分裂期）への進行には、サイクリン B とサイクリン依存性キナーゼ

(Cdk) 1 の複合体の活性化が必須である。ゲノムの複製状態および障害の有無を監視し、細胞周期を停止するチェックポイント機構においては、ATR/ATM から Chk1/Chk2 に至るキナーゼカスケードがそれぞれ中心的な役割を演じている。紫外線による障害 DNA や複製を停止した DNA に反応して、ATR は、Chk1 のセリン 317 およびセリン 345 をリン酸化し、Chk1 を活性化させる。このようにして活性化された Chk1 は (Cdk の活性化に必須の) Cdc25 ファミリーのホスファターゼをリン酸化し抑制することで、細胞周期を停止させる。しかしながら、その他のリン酸化反応による Chk1 の制御はほとんどわかっていないのが現状といえる。

2. 研究の目的

以前、我々の研究グループは、分裂期において Chk1 のセリン 286 およびセリン 301 がサイクリン依存性キナーゼ 1 (Cdk1) によってリン酸化されることを報告した。本研究では、DNA 障害/複製チェックポイント反応時のセリン 286 およびセリン 301 のリン酸化反応の制御機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Chk1 の各部位のリン酸化反応を特異的に認識する抗体の作製

目的とする部位のリン酸化アミノ酸およびその前後 5 残基のアミノ酸配列を含むリン酸化ペプチドを作製し、これをラットに免疫して、リン酸化ペプチドに反応し、非リン酸化ペプチドに反応しないモノクローナル抗体を作製した。

(2) 紫外線照射またはヒドロキシウレアによる細胞の処理法

DNA 複製チェックポイントを活性化するた

め、HeLa 細胞を 3 mM のヒドロキシウレア存在下で 2 時間反応させた。また、DNA 障害チェックポイントを活性化させるため、細胞から培養上清を取り除いた後、フナコシの FUNA-UV-linker で 254nm の紫外線を 10J/m² 照射した。照射後、培養上清を戻し、さらに、2 時間培養した。

(3) 細胞内に置けるリン酸化 Chk1 の検出

各処理細胞を RIPA バッファーで破碎処理後、遠心し、上清を得た。このような細胞抽出液から、抗 Chk1 抗体をコンジュゲートした Protein-G ビーズを用いて、Chk1 を免疫沈降した。免疫沈降した Chk1 は、各リン酸化抗体でプロットした。

(4) GST-Chk1-Myc の精製および Cyclin A2/Cdk2 によるリン酸化反応

pGEX-Chk1-Myc 遺伝子によって形質変換された Arctic Express (Staragene 社) からプロトコールに従い、GST-Chk1-Myc を精製した。その GST-Chk1-Myc を Mg²⁺・ATP 存在下で反応させた。その後、オートラジオグラフィ、ウェスタンブロット、2次元ホスホペプチドマップにてリン酸化反応を評価した。

(5) HeLa Tet-ON 細胞の確立

Myc-Chk1 野生型 (WT) , S286A/S301A, S317A/S345A をテトラサイクリン依存性に誘導発現する HeLa Tet-ON 細胞をレトロウイルスによる遺伝子導入法にて確立した。

4. 研究成果

今回、我々は、Chk1 のセリン 286 およびセリン 301 のリン酸化反応が、分裂期だけでなく、紫外線照射における DNA 障害時およびヒドロキシウレアによる DNA 複製障害時にも引き起こされることを見出した。しかし、分裂期の場合とは異なり、上記のチェックポイント反応の際には、ATR による

セリン 317 およびセリン 345 のリン酸化反応も同時に認められた。次に、チェックポイント反応時の Chk1 のセリン 286/301 のリン酸化反応を遂行しているプロテインキナーゼを検討したところ、Cdk2 がこの反応を遂行している可能性が高いことが判明した。さらに、チェックポイント反応時の Cdk2 依存性のリン酸化反応と ATR 依存性のリン酸化反応の関係について検討を加えたところ、これらのリン酸化反応は同一 Chk1 分子上で引き起こされているにもかかわらず、互いのリン酸化反応は比較的非依存的に引き起こされていることが判明した。以上の結果は、リン酸化反応による Chk1 の機能制御は当初考えられていたものより複雑で、少なくとも活性化に必要な ATR からのみならず、Cdk によっても制御されていることが判明した。(セリン 286/301 のみのリン酸化反応が引き起こされている) 分裂期における検討から、Cdk による Chk1 のリン酸化反応は、ATR とは異なり、Chk1 を核外に移行させることによって Chk1 の機能を負に制御している可能性が高いと考えられる。しかし、チェックポイント時のように、ATR からのリン酸化反応も同時に引き起こされると、この Cdk による局在変化はほとんど認められなくなる。そのため、チェックポイント時におけるセリン 286/301 のリン酸化反応が Chk1 にどのような機能変化を与えているかについては、まだ不明な点が多い。がんにおけるリン酸化反応の異常の解析も含め、今後の検討課題といえる。

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 4 件)

1. Ikegami Y., Goto H., Kiyono T., Enomoto M., Kasahara K., Tomono Y., Tozawa K., Morita A., Kohri K. and Inagaki M.: Chk1 phosphorylation at Ser286 and Ser301 occurs with both stalled DNA replication and damage checkpoint stimulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 1227-1231, 2008.
2. Yamashiro S., Yamakita Y., Totsukawa G., Goto H., Kaibuchi K., Ito M., Hartshorne D.J. and Matsumura F.: Myosin phosphatase-targeting subunit 1 regulates mitosis by antagonizing polo-like kinase 1. *Dev. Cell.* 14: 787-797, 2008.
3. Toyo-oka K., Mori D., Yano Y., Shiota M., Iwao H., Goto H., Inagaki M., Hiraiwa N., Muramatsu M., Wynshaw-Boris A., Yoshiki A. and Hirotsune S.: Protein phosphatase 4 catalytic subunit regulates Cdk1 activity and microtubule organization via NDEL1 dephosphorylation. *J Cell Biol.* 180: 1133-1147, 2008.
4. Goto H. and Inagaki M.: Production of a site- and phosphorylation state-specific antibody. *Nature Protocols* 2: 2574-2581, 2007.

[学会発表] (計 7 件)

1. Hidemasa Goto & Masato Enomoto. "Chk1 phosphorylation by Cyclin-dependent kinases (Cdks) promotes mitotic entry." Cell Cycle and Cell Architecture (MEXT Priority Research Project "Cell Proliferation Control" International Symposium), Nagoya, 2009.2.26 (招待口

- 演)
2. Goto H., Enomoto M., Tomono Y., Kasahara K., Ikegami Y., Tsujimura K., Kiyono T. and Inagaki M.
“Chk1 phosphorylation by Cyclin-dependent kinase 1 promotes mitotic entry.” The 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. San Francisco, CA, USA. 2008.12.14. (ポスター)
 3. 後藤英仁、稲垣昌樹
「サイクリン依存性キナーゼ(Cdk)による Chk1 のリン酸化反応」、第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会 合同大会、横浜、2007 年 12 月 11 日 (ワークショップ)
 4. Hidemasa Goto & Masaki Inagaki.
“Chk1 phosphorylation by Cyclin-dependent kinases (Cdks)” 第 67 回日本癌学会総会、名古屋、2008 年 10 月 28 日 (シンポジウム)
 5. Enomoto M., Goto H., Ikegami Y., Kasahara K., Tomono Y., Tsujimura K., Kiyono T. and Inagaki, M.
“Chk1 phosphorylation by Cyclin-dependent kinases (Cdks).” International Symposium on Chromosome Dynamics in Ise. Shima, Mie, Japan. 2008.5.29. (ポスター)
 6. Goto H.
“Functional analyses of mitotic kinases in chromosomal instability (The Incitement Award of JCA)” 第 65 回日本癌学会総会、横浜、2007 年 10 月 5 日 (ワークショップ)
 7. 後藤英仁、榎本将人、池上要介、山口知也、友野靖子、清野透、稲垣昌樹。
「サイクリン依存性キナーゼによる

Chk1 リン酸化反応」第 40 回日本発生生物学会・第 59 回日本細胞生物学会合同大会、福岡、2007 年 5 月 30 日 (ワークショップ)

[図書] (計 4 件)

1. 笠原広介, 後藤英仁. リン酸化による M 期制御-染色体サイクル ゲノムの恒常性維持、敬称とダイナミックス-正井久雄、升方久夫、釣本敏樹、仁木宏典、篠原彰 編, 蛋白質核酸酵素, 54 巻, 4 号, 441-446, 2009
2. 後藤英仁、稲垣昌樹. Close UP 実験法 特定部位の翻訳後修飾を特異的に認識する抗体作製法-抗リン酸化 (ペプチド) 抗体作製法, 実験医学, 26 巻, 18 号, 2965-2972, 2008
3. 笠原広介, 後藤英仁, 稲垣昌樹. 細胞の構造と分裂周期-図説 分子病態学 - 一瀬白帝、鈴木宏治 編, 34-39, 中外医学社, 2008
4. 後藤英仁、稲垣昌樹. リン酸化-特集 蛋白質修飾- 分子細胞治療 (先端医学社), 6 巻, 1 号, 4-9, 2007

[その他]

2007 年度 日本癌学会 奨励賞

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 英仁 (GOTO HIDEMASA)
愛知県がんセンター (研究所)・
発がん制御研究部・室長
研究者番号: 20393126

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし