

機関番号： 21601
研究種目： 基盤研究 (C)
研究期間： 2008 ~ 2010 年度
課題番号： 20570137
研究課題名 (和文) クロマチンダイナミクスにおけるCK2機能の解明

研究課題名 (英文) Involvement of CK2 for the nuclear dynamic function during the progression of cell cycle.

研究代表者

本間 美和子 (HOMMA Miwako K.)
福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号： 40192538

研究成果の概要 (和文)：

CK2 (カゼインキナーゼ2) は種を超えて広範な分布がみられ、遺伝学的解析からも個体の生存と増殖に必須な酵素である。増殖プロセスに関連する細胞周期におけるCK2機能の解析から、申請者はすでに家族性大腸腺腫症 (FAP) 原因遺伝子APCとCK2の相互作用や、CK2下流にある直接のターゲットとしてeIF5 (翻訳開始因子の一つ、eukaryotic translation initiation factor 5) を同定し、増殖機能にCK2が重要な役割を果たすことを明らかにした。本研究では3年間の研究期間において、細胞周期進行の時間軸に照らしたCK2機能の詳細な解析を行った結果、CK2のリン酸化が核への移行に関与すること、核内においてCK2と相互作用し、ヒストン交換反応、ヌクレオソーム形成などのクロマチン制御機能に関するタンパク群を見出した。

研究成果の概要 (英文)：

Protein kinase CK2 is a highly conserved serine/threonine kinase that functions in multiple cellular processes including cell growth and development. It is typically found in tetrameric complexes consisting of two catalytic α and/or α' subunits, and two regulatory β subunits. We reported the cell-cycle dependent association of CK2 with adenomatous polyposis coli (APC) that regulates CK2 activity, and identified its downstream target as eukaryotic translation initiation factor 5 (eIF5). Here we demonstrate that a pool of CK2 α subunits translocate into the nucleus in G1 phase of the cell cycle, when serum-starved normal human fibroblasts are simulated by FBS, whereas the β subunits localize to the nuclear fraction later than α . Translocation of $\alpha\beta$ subunits associate with enhanced phosphorylation of these molecules. Pretreatment with a potent ATP competitive inhibitors reduce nuclear localization of CK2 α after FBS stimuli. Similarly, phosphorylation site mutants in CK2 α partially inhibit their accumulation in the nuclear fraction following FBS stimuli. These results suggest the involvement of multiple kinases that phosphorylate CK2 for the growth factor-induced nuclear localization. Co-immunoprecipitation experiments using anti-CK2 α antibodies, followed by mass spectrometry analysis, identified nuclear proteins that associate with CK2 α in a cell cycle dependent manner. As one of these proteins, hnRNPs is also a phosphoprotein *in vivo*. FRAP experiments on living stable

cell lines expressing GFP-CK2 α protein indicate that the nucleocytoplasmic distribution of CK2 subunits may be regulated in a cell cycle-dependent manner. These results support a role for CK2 in response to growth stimuli, and also the possible involvement of CK2 α subunit as isolated entities exerting specific functions in complex with other cellular partners in the nuclear fraction, during the progression of cell cycle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：機能生物化学

科研費の分科・細目：ライフサイエンス（共通基礎研究）・機能生物化学

キーワード：カゼインキナーゼ 2、CK2、キナーゼ、細胞周期、クロマチン

1. 研究開始当初の背景

(1)細胞周期におけるCK2機能の解析から、申請者はすでに家族性大腸腺腫症(FAP)原因遺伝子APCとCK2の相互作用や、CK2下流にある直接のターゲットとしてeIF5(翻訳開始因子の一つ、eukaryotic translation initiation factor 5)を同定し、CK2によるeIF5のリン酸化が、翻訳開始と細胞周期進行を指標とする増殖機能に重要な役割を果たすことを明らかにした。

(2)CK2は触媒サブユニットであるalpha(α または α')と制御サブユニットbeta(β)がヘテロ4量体を形成するとholoenzymeとして最大活性を示すことが知られている。これまでCK2は恒常的に活性化されたキナーゼのひとつと考えられていたが、申請者は、同調的に細胞周期を進行させた場合に、G1初期に著しいCK2活性上昇がみられること、その理由として、各サブユニットのタンパク発現量の変動ではなく、両サブユニットが会合したholoenzymeのコンテントが増加することで、細胞内での著しいCK2活性化がみられる事を明らかにし、外的刺激に応じた機能的な集合体が形成される事を報告した。

(3)申請者は、細胞周期進行に伴いCK2が細胞内局在を変動させることを見出した。CK2が細胞質からの移動先である核内において、クロマチン制御タンパク質をターゲットとしてリン酸化し、それらの機能制御に関与

する可能性が浮上した。

2. 研究の目的

本研究では、増殖プロセスである細胞周期進行の時間軸に照らし、CK2機能の詳細について解析することを目的とした。特に、厳密な細胞周期進行という観点から、特定の時間軸においてCK2がわざわざ核内へ移行することで、リン酸化されるクロマチン制御タンパクなど核内ターゲットに焦点を絞って同定し、その機能を明らかにすることを目的とする。また、CK2によるリン酸化が核機能を含む増殖応答に必須であるかどうかを検討する。

3. 研究の方法

(1)本研究の目的は、細胞周期進行におけるクロマチン制御という観点から、特定の時間軸においてCK2と相互作用し、リン酸化される核内クロマチン制御タンパクについて、生化学的ならびに細胞生物学的性状と、機能制御の仕組みを明らかにすることである。以下の2つの方法で時間軸に対応するCK2核内ターゲットの同定を試みた。

①細胞周期を同調させた細胞ライゼートから核画分を調製し、抗CK2抗体を用いた免疫沈降法によりCK2複合体を調製し、特定の細胞周期にCK2と相互作用する核内タンパクの二次元電気泳動法による比較同定とMass spectrometryによる解析、

②正常 eIF5 と変異 eIF5 をそれぞれ細胞に発現させた同調細胞を用いて、特定の phase (特に G1 期から S 期)においてタンパク発現量が変化する核内分子の抗体アレイによる検索、以上の 2 つの方法により、細胞周期特異的な核内 CK2 複合体構成分子を同定した。

(2) CK2 が関与する核内分子機能の解析。上記の方法で同定したこれらのタンパクが、*in vivo* でリン酸化タンパクとして存在する事を確認する。特に、細胞周期進行に伴うリン酸化レベルの変化について、*in vivo* ³²P-labelling による解析を行うとともに、CK2 を含む上流のキナーゼとリン酸化部位を同定する。さらに、核移行できない CK2 変異体を発現させた場合の機能変化を検討する。

4. 研究成果

(1) CK2 の核機能への関与を検討するために、CK2 自体の核移行を詳細に検討した結果、細胞周期進行に伴う CK2 の細胞内局在変化は、CK2 α および β サブユニットの高度なリン酸化を伴うことが明らかになった。この現象を契機として CK2 リン酸化部位を Mass 解析により決定するとともに、リン酸化部位変異体を複数作製した。その結果、CK2 が細胞質から核内へ局在を変動させる際には CK2 がキナーゼ活性を保持する事が必須であり、特定のアミノ酸残基リン酸化も関与する事を明らかにした。CK2 自己リン酸化も重要な役割を果たすことを見出した (論文投稿中)。

(2) CK2 複合体の構成要素は細胞周期進行の時間軸とともに変化する。当初は二次元電気泳動スポットを Mass 解析により同定していたが、Nano LC-Mass 解析技術の進歩により、時系列に即した複合体解析が可能となった。その結果、核内において CK2 と相互作用し、ヒストン交換反応、ヌクレオソーム形成などのクロマチン制御機能に関するタンパク群を見出すとともに、リン酸化されるクロマチン制御タンパクを同定した (投稿論文準備中)。一部のタンパクについては、*in vivo* でリン酸化されることを確認したので、現在、リン酸化によるタンパク機能の変化を解析中である。



(3) 今後は、生存と増殖に必須な役割を果たす CK2 が、厳密な細胞周期制御の具体的な作用点として、核のダイナミックな機能に関与するメカニズムを明らかにする。核移行を契機として、ヒストン交換反応とヌクレオソーム形成という、生命機能の根幹を成すクロマチン機能制御や増殖応答について CK2 が関与する機能の詳細についての知見を得ることが出来ると期待される。

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 5 件)

①Kabuyama Y., Nakazawa N., Yamaki J., Homma M. K., and Homma Y., Dysregulation of very long chain acyl-CoA dehydrogenase coupled with lipid peroxidation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 査読有, 298(1), 107-113, 2010.

②Kabuyama Y, Kitamura T, Yamaki J, Homma M. K., Kikuchi S and Homma Y. Involvement of thioredoxin reductase 1 in the regulation of redox balance and viability of rheumatoid synovial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 367: 491-496, 2008.

③Homma M. K., and Homma Y. Cell Cycle and activation of CK2, *Mol. Cell. Bio.*, 査読有, 316(1-2), 49-55, 2008.

④Kitamura T, Kabuyama Y, Kamataki A, Homma M. K., Kobayashi Y., Aota S, Kikuchi S and Homma Y., Enhancement of lymphocyte migration and cytokine production by ephrinB1 system in rheumatoid arthritis. *Am J Physiol Cell Physiol.* 査読有, 294(1), C189-196, 2008.

⑤本間 美和子、細胞周期の制御を中心とする増殖シグナル伝達機構に関する研究 (総説) *日本女性科学者の会学術誌*、査読有、9(1):1-5, 2008. (ISSN1346-9827)

[学会発表] (計 7 件)

①Homma M. K., et al. Involvement of CK2 phosphorylation for its activity and nuclear localization during the cell cycle progression of normal human fibroblasts. Keystone Symposia "The Evolution of Protein Phosphorylation" Keystone, CO, USA, 2011年1月23日.

② Homma M.K., Yamaki J., Homma Y. Autophosphorylation of CK2 N-terminal region controls activation and nuclear localization during the progression of cell cycle. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会、神戸、2010年12月10日.

③ 本間美和子、八巻淳子、本間好 細胞周期進行におけるCK2機能の解析、第75回日本生化学会東北支部会例会、仙台、2010年5月8日.

④ Homma M.K., Yamaki J., Homma Y. Nuclear protein target for CK2 in relation to the progression of cell cycle. 第82回日本生化学会大会、神戸、2009年10月24日.

⑤ Homma M.K., Yamaki J., Homma Y. Phosphorylation-dependent activation of nuclear CK2. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会、神戸、2008年12月.

⑥ Homma M.K., Wada, I. and Homma, Y., Regulatory mechanisms involved in the activation of nuclear CK2. The 14th Meeting on Protein Phosphorylation and Cell Signaling, La Jolla USA, 2008年8月.

⑦ Homma M.K., Yamaki J., Homma, Y., CK2 changes its cellular localization during the progression of cell cycle. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Cell Cycle, Cold Spring Harbor Laboratory, NY USA, 2008年5月.

[その他]

ホームページ等

<http://www.fmu.ac.jp/home/biomol/HTML/index.html>

<http://www.fmu.ac.jp/univ/chiiki/kenkyuseika/2008001.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本間 美和子 (HOMMA Miwako K.)
福島県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 40192538

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし