

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：16301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18413

研究課題名(和文) 動静脈奇形で高発現するSNX9の分解促進剤の開発

研究課題名(英文) Exploration of degraders of SNX9 that highly expresses in arteriovenous malformations

研究代表者

眞田 紗代子 (SANADA, SAYOKO)

愛媛大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60866044

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：SNX9と結合するユビキチンリガーゼ複合体の足場タンパク質としてSPOPを同定した。SPOPがヒト角化細胞の細胞分裂周期を制御することが明らかとなり、ヒト不死化角化細胞HaCaTを用いてSPOPのDNA損傷と複製過程における機能解析を行った。SPOPを発現抑制すると、G1期で止まる細胞の割合が増加し、S期の割合が減少した。また、DNAの新規合成が阻害された。さらに複製ライセンス因子であるCDT1とCDC6の翻訳が阻害されることが分かった。HaCaT細胞におけるSPOPの発現低下はDNA複製異常をもたらすことが示唆された(Sanada, et al., BBRC. 2023)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SPOPはHaCaT細胞においてDNA複製開始前段階からライセンス化因子であるCDT1とCDC6のタンパク質発現レベルを翻訳過程で適切に制御することで、DNA複製ストレスを緩和させる機能を発揮している可能性がある。日本版がんゲノムアトラスでは皮膚扁平上皮癌の約30%でSPOP遺伝子のコピー数の減少を認めており、SPOPの機能低下はDNA複製ストレスを増幅することで、発癌感受性の増大を来すことが本研究において示唆された。今後、SPOPが皮膚扁平上皮癌の診断マーカーや治療薬候補になると期待される。

研究成果の概要(英文)：SPOP is a scaffold protein for the ubiquitin ligase complex that binds to SNX9. We investigated the physiological roles of SPOP during DNA replication and DNA repair process in non-cancerous human keratinocytes-derived HaCaT cells. We found that SPOP knockdown remarkably reduced cell proliferation and arrested their cell cycles at G1/S phases in HaCaT cells. As mechanisms, the protein expression of DNA replication licensing factors CDT1 and CDC6 were suppressed remarkably as their translation was inhibited in SPOP-depleted HaCaT cells (Sanada, et al., BBRC. 2023). Our results suggest that SPOP is essential for DNA replication licensing in HaCaT cells.

研究分野：DNA合成

キーワード：血管新生 ケラチノサイト 動静脈奇形 皮膚悪性腫瘍

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景研究代表者らは、血管腫血管奇形や皮膚悪性腫瘍の診療を行っていた。血管腫血管奇形における血管内皮細胞の質的変化の分子基盤は未解明であり、特異的な分子標的薬は開発されていない。代表者の研究チームは血管内皮細胞の性状を規定する4つのCUL3型ユビキチンE3複合体軸を同定することに成功していた。そこで、血管奇形におけるCUL3型ユビキチンE3複合体軸の発現解析を目的に研究を始めた。

当初、血管新生因子であるSNX9に直接結合するユビキチンリガーゼ複合体の足場タンパク質の探索を行っていた。解析を進める中で、CUL3型ユビキチンE3リガーゼ複合体(CRL3)を構成する基質認識受容体の一つであるSPOP (speckle-type POZ protein)に着目した。CRL3 SPOPの機能は多岐に渡るが、SPOPの遺伝子変異が前立腺癌や子宮体癌で見つかっており、発癌との関連が示唆されている。研究代表者らのチームは過去に、前立腺癌細胞ではSPOPがDNA複製時にトポイソメラーゼ2AのDNA鎖からの解離に必須であることを報告した(Mol. Biol. Cell. 2020)。引き続き、研究代表者らはSPOPのDNA損傷・複製過程における機能解析を中心とした研究に取り組んでいた。同時に、研究代表者は表皮細胞における発癌リスクや老化について興味があり、SPOPのDNA障害に対する生理機能について、DNA障害に曝露されやすい表皮角化細胞由来の細胞株を用いて解析する発想に至った。

2. 研究の目的

SPOPは標的基質タンパク質をユビキチン化し、DNA複製、DNA修復、細胞分裂、分化、細胞骨格のリモデリング等を制御する。基質認識受容体の標的基質タンパク質にはoncogenicな基質タンパク質も含まれる。皮膚悪性腫瘍には様々な組織型があるが、紫外線をはじめとするDNA損傷は皮膚悪性腫瘍の発症原因の一つである。正常角化細胞においては、DNA損傷に対する修復機構が備わっており、DNA複製が正しく進むように制御されている。一方で、色素性乾皮症で見られるように、DNA修復経路とDNA複製の異常は皮膚悪性腫瘍発症のリスクとなる。CUL3型ユビキチンリガーゼの角化細胞における生理機能や、その皮膚悪性腫瘍の発症に対する寄与は全く分かっていない。本研究では、SPOPが角化細胞のDNA複製において生理的役割を担っていると仮説を立て、その機能解析を行った。

3. 研究の方法

ヒト不死化角化細胞HaCaT細胞を用いて、主にSPOPの発現低下が角化細胞に及ぼす細胞増殖動態について解析を行った。SPOPをはじめとする各種遺伝子の発現は定量PCR法により、タンパク質の発現はウェスタンブロット法により解析した。各種遺伝子発現抑制は、標的とする遺伝子特異的siRNAによるRNA干渉法を用いて行った。細胞増殖、DNA複製、細胞分裂周期解析はそれぞれ細胞数カウント、ATPアッセイ、EdU取り込みによるDNA標識、FACS解析により行った。また、タンパク質翻訳・合成はシクロヘキシミドを用いたパルスチェイス解析やL-homopropargylglycineとアルキン/アジドClick反応解析により行った。

4. 研究成果

(1) SPOP発現抑制による細胞増殖抑制

SPOP遺伝子を発現抑制することでHaCaT細胞の細胞増殖は顕著に抑制された(図1)。EdU取り込みによるDNA標識、並びにFACS解析から、SPOP遺伝子発現抑制HaCaT細胞は、G1/S期で細胞周期進行が停止していることが示された(図2、図3)。

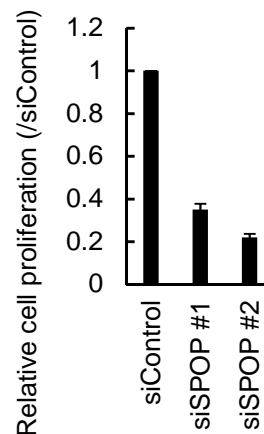
(2) SPOP発現抑制による各DNA複製ライセンス因子の発現動態

DNA複製開始に着目し、これを制御するDNA複製ライセンス因子であるMCM2-7、CDT1、CDC6の遺伝子発現およびタンパク質発現を解析した。その結果、これらの全ての因子の遺伝子発現に大きな変動は認められなかったものの、CDT1およびCDC6のタンパク質量が顕著に減少していることが明らかとなった(図4)。

(3) SPOP発現抑制による複製ライセンス因子CDT1とCDC6の翻訳阻害

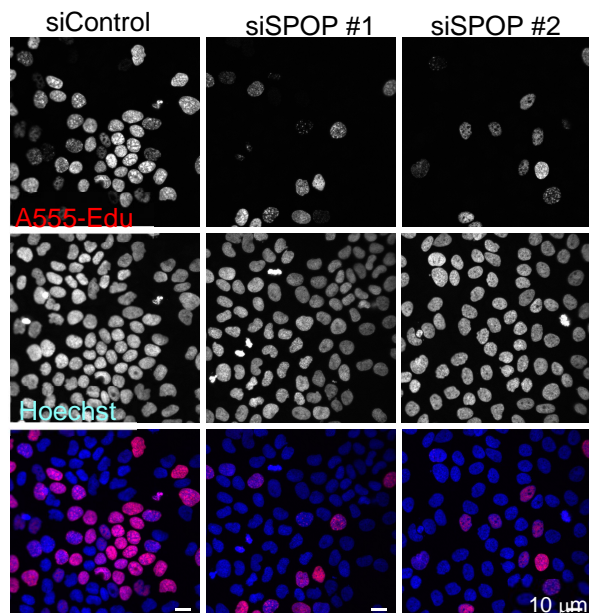
CDT1およびCDC6のタンパク質の分解、合成、並びにハーフライフを解析した。その結果、CDT1およびCDC6のタンパク質の分解速度に変化はなく(図5)、新規合成が特異的に抑制されていることが示された(図6)。

(4) SPOP発現抑制によるp21遺伝子上昇

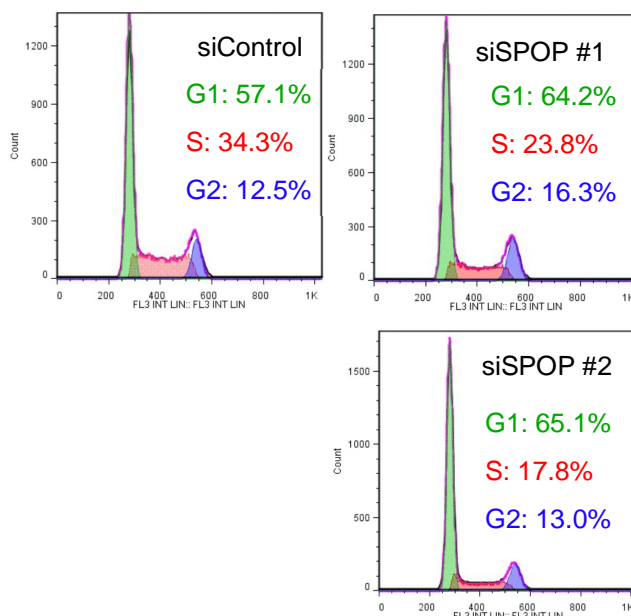


(図1)

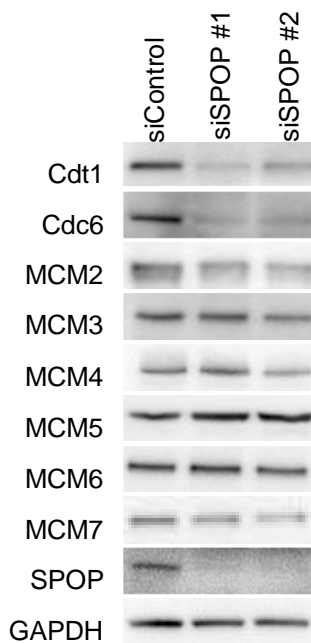
さらに、細胞周期チェックポイント因子であるサイクリン依存性キナーゼ阻害因子群を解析した結果、p21 Waf1/Cip1 の発現が顕著に増幅していること、p21 Waf1/Cip1 の転写促進因子である p53 の活性化は認められなかったこと、p21 Waf1/Cip1 の発現増幅が CDT1 および CDC6 のタンパク質量減少に依存していることが明らかとなった (図 7)。



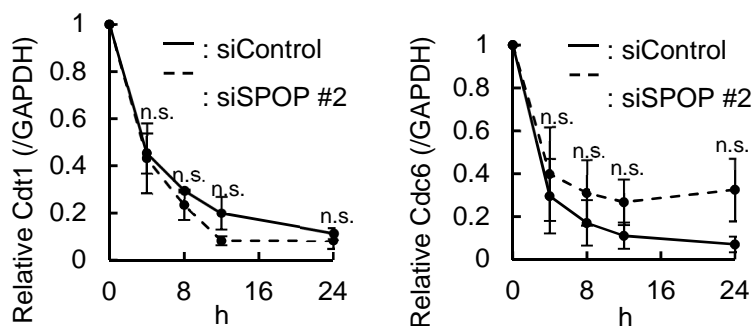
(図 2)



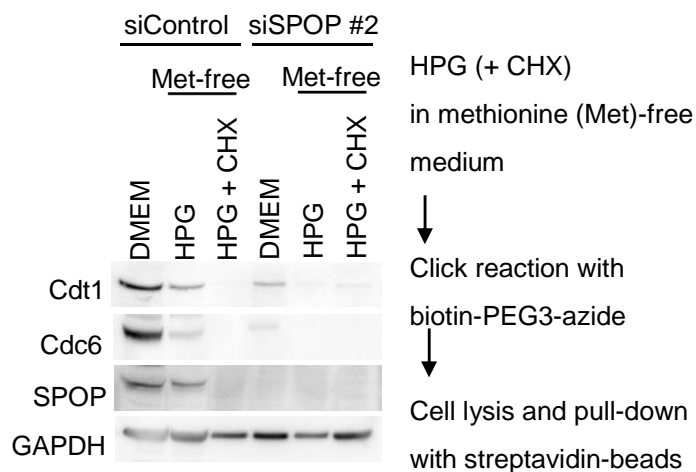
(図 3)



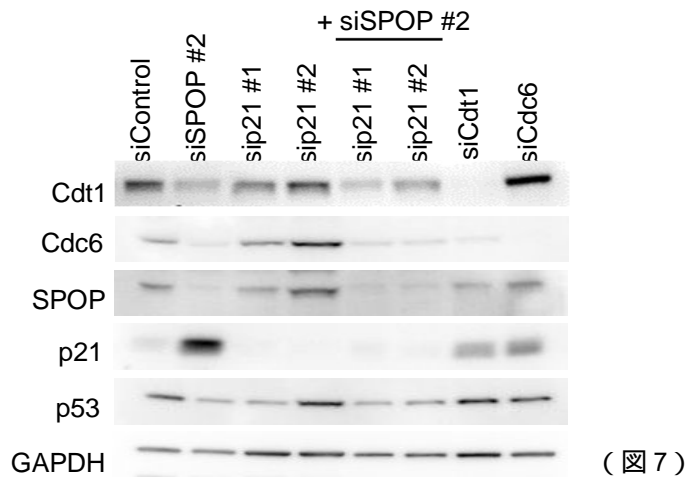
(図 4)



(図 5)



(図 6)



(5)まとめ

HaCaT 細胞での SPOP 発現抑制は、DNA 複製ライセンス化因子の CDT1 および CDC6 のタンパク質翻訳を特異的に阻害することで DNA 複製ストレスを増大させるとともに、細胞周期チェックポイント因子 p21 Waf1/Cip1 の発現を p53 非依存的に増幅することで細胞周期進行を G1/S 期で停止させる。SPOP は複製開始前段階からライセンス化因子の CDT1 および CDC6 のタンパク質発現レベルを翻訳過程で適切に制御することで、DNA 複製ストレスを緩和させる機能を有する可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sanada Sayoko, Maekawa Masashi, Tate Sota, Nakaoka Hiroki, Fujisawa Yasuhiro, Sayama Koji, Higashiyama Shigeki	4. 巻 651
2. 論文標題 SPOP is essential for DNA replication licensing through maintaining translation of CDT1 and CDC6 in HaCaT cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 30~38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.02.012	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 眞田 紗代子
2. 発表標題 ヒト角化細胞におけるSPOPの生理機能の解明
3. 学会等名 第81会日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 眞田 紗代子
2. 発表標題 ヒト角化細胞におけるSPOPの生理機能の解明
3. 学会等名 第31回日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------