

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 24 日現在

機関番号：83901

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790103

研究課題名（和文）細胞周期制御における多機能性蛋白質 14-3-3 の役割

研究課題名（英文）Role of 14-3-3 family in regulation of cell cycle progression

研究代表者

笠原 広介（KASAHARA KOUSUKE）

愛知県がんセンター（研究所）・発がん制御研究部・研究員

研究者番号：90455535

研究成果の概要（和文）：細胞の増殖・成長において、リン酸化やメチル化などの翻訳後修飾が蛋白質の機能調節に重要な役割を果たしている。本研究では、リン酸化蛋白質に結合する分子である 14-3-3 ファミリーに着目し、14-3-3 が結合する分子群を同定・解析することで、細胞の増殖・成長を制御する新たなリン酸化シグナル伝達の解析を進めた。その結果、DNA 障害チェックポイントや細胞分裂における中核因子である Chk1 や Plk1 といったリン酸化酵素の新たな制御メカニズムを明らかにすることに成功した。

研究成果の概要（英文）：To identify a novel phosphorylation signal in cell cycle progression, we searched for proteins which bound to 14-3-3 family proteins in a cell cycle-dependent manner. As a result, we found 14-3-3 participated in DNA damage checkpoint and mitotic progression through regulation of Chk1 kinase and Plk1 kinase, respectively.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：分子生物学

1. 研究開始当初の背景

細胞周期の進行／停止にはリン酸化シグナル伝達が中心的な役割を果たしており、細胞周期を制御するプロテインキナーゼの阻害剤は抗悪性腫瘍薬としての臨床応用が期待されている。実際に、細胞周期進行を促進するキナーゼ群 [サイクリン依存性キナー

ゼ、Polo 様キナーゼ (Plk)、Aurora キナーゼ] や、細胞周期停止を誘導するチェックポイントキナーゼ [Chk1 及び Chk2] の阻害剤は臨床試験段階である。以上のような背景から、細胞周期リン酸化シグナルの新規経路を同定すること及び、リン酸化シグナルの詳細な分子メカニズムを究明することは、抗悪性腫

瘍薬開発において極めて重要であると言える。

多くの細胞周期関連因子は、セリン/スレオニン残基もしくはチロシン残基がリン酸化されると高次構造や結合蛋白質が変化することでダイナミックな機能制御をうける。しかしながら、たとえ新たなリン酸化反応を同定したとしても、数多の細胞内蛋白質の中で何が結合しているのかを同定するのは難しく、リン酸化のメカニズムを解明する上で障壁となる。

2. 研究の目的

本研究では、細胞周期特異的にリン酸化結合蛋白質“14-3-3”と結合する分子群を同定・解析することで、細胞周期制御に関わる新たなリン酸化シグナル経路を見出し且つ、その詳細な分子メカニズムを解明することを目的とする。具体的には、以下の3つに焦点を絞り研究を進める。

- (1) DNA 障害チェックポイントの中核因子 Chk1 キナーゼと 14-3-3 の相互作用
- (2) 細胞分裂期 (M 期) の中核因子 Plk1 と 14-3-3 の相互作用
- (3) 特定の細胞周期に 14-3-3 と結合する新規因子の探索と解析

これらの解析を通じて、細胞周期リン酸化シグナルを標的とした抗悪性腫瘍薬開発の基礎となる知見を得ることを目指す。

3. 研究の方法

本研究では、特定の細胞周期で 14-3-3 と結合するリン酸化蛋白質を同定・機能解析することで、細胞周期における新規リン酸化シグナルを見出し、その分子メカニズム及び生理的意義を明らかにする。特に、14-3-3 γ と結合する蛋白質として既に同定済みである Plk1 (M 期)、Chk1 及び Cdc25A (DNA 障害チェックポイント) の機能解析を中心に進めるが、今後新たに同定される分子群についても

同様に解析を進める。具体的には、以下の項目について研究を進める。

- (1) 14-3-3 結合蛋白質の探索とその結合部位 (リン酸化部位) の同定
- (2) 14-3-3 結合の生理的意義および機能の解析
- (3) 抗リン酸化抗体によるリン酸化シグナルの時空間的解析

4. 研究成果

- (1) DNA 障害チェックポイントにおける 14-3-3 の役割

14-3-3 の γ サブタイプの結合蛋白質として、DNA 障害チェックポイントの中核因子である Chk1 キナーゼを同定した。この結合は、Chk1 の自己リン酸化部位 (Ser296) 依存的に引き起こされる。14-3-3 γ は Chk1 と結合すると同時にサイクリン B/サイクリン依存性キナーゼ 1 (Cdk1) の抑制因子である Cdc25A とも結合する。この 3 者複合体形成を介して、Chk1 は Cdc25A のリン酸化とそれに続く Cdc25A のユビキチン・プロテアソーム依存的な分解を引き起こす。これら一連のシグナルは、DNA 障害後の G2/M チェックポイントの解除に必要な不可欠であることを明らかにした。(Kasahara K. *et al.*, EMBO J. 2010)。

- (2) 細胞分裂期 (M 期) 進行における 14-3-3 の役割

14-3-3 γ の M 期特異的な結合分子として、M 期進行の中核因子 Plk1 キナーゼを同定した。さらに、14-3-3 γ は、Plk1 の新規リン酸化反応 (Ser99) 依存的に結合し、Plk1 の活性を亢進させる機能があることが分かった。Plk1 の Ser99 リン酸化は、PI3 キナーゼから Akt に至る細胞増殖シグナル依存的に引き起こされることを明らかにした。(Kasahara K. *et al.*, Nat. Commun 2013)。

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)

1. K. Kasahara, H. Goto, T. Kiyono, N. Watanabe, S. Elowe, E.A. Nigg, M. Inagaki (2013) PI 3-kinase-dependent phosphorylation of Plk1-Ser99 promotes association with 14-3-3gamma and is required for metaphase-anaphase transition. **Nat. Commn.** in press. 査読有り
2. P. Li, H. Goto, K. Kasahara, M. Matsuyama, Z. Wang, Y. Yatabe, T. Kiyono, M. Inagaki (2012) P90 RSK arranges Chk1 in the nucleus for monitoring of genomic integrity during cell proliferation. **Mol. Biol. Cell** 123: 1582-1592. PMID: 22357623 査読有り
3. M. Matsuyama*, H. Goto*, K. Kasahara*, Y. Kawakami, M. Nakanishi, T. Kiyono, N. Goshima, M. Inagaki (2011) Nuclear Chk1 prevents premature mitotic entry. **J. Cell Sci.** 124: 2113-2119. PMID: 21628425 査読有り
*These authors equally contributed to this work.
4. K. Kasahara, H. Goto, M. Enomoto, Y. Tomono, T. Kiyono, M. Inagaki (2010) 14-3-3 gamma mediates Cdc25A proteolysis to block premature mitotic entry after DNA damage. **EMBO J.** 29: 2802-2812. PMID: 20639859 査読有り
5. P. Bargagna-Mohan, R.R. Paranthan, A. Hamza, N. Dimova, B. Trucchi, C. Srinivasan, G.I. Elliott, C.G. Zhan, D.L. Lau, H. Zhu, K. Kasahara, M. Inagaki, F. Cambi, R. Mohan (2010) Withaferin A targets intermediate

filaments GFAP and vimentin in A model of retinal gliosis. **J Biol Chem.** 285: 7657-7669. PMID: 20048155 査読有り

[学会発表] (計 19 件)

1. 笠原広介: Emerging role of the ubiquitin-proteasome system in primary cilia assembly. 2012年2月1日 GCOE第五回NAGOYAグローバルリトリート (あいち健康プラザ・大府)
2. Kousuke Kasahara, Masaki Inagaki: Complex formation between Plk1 and 14-3-3 gamma is essential for metaphase-anaphase transition. Mini-symposium "STRESS SIGNALS & RESPONSES" (Abo University, Turku, Finland) 27 Sep, 2012
3. Kasahara, K.: Novel mitotic signalling crosstalk between PI3K-Akt pathway and Plk1. Global CEO the 4th International Symposium "Global COE Symposium on Nuro-Tumor Biology and Medicine" (Westin Nagoya Castle, Nagoya) **Poster**, Nov. 15, 2012
4. Goto H, Kasahara K, Izawa I, Kiyono T, Watanabe N, Elowe S, Nigg EA, Inagaki M.: Novel mitotic signalling crosstalk between PI3K-Akt pathway and Plk1. The 52nd Annual Meeting of the American Society for Cell Biology. (Moscone Center, San Francisco) **Poster**, Dic. 17, 2012
5. 笠原広介、後藤英仁、井澤一郎、渡邊信元、清野透、稲垣昌樹: PI3K-Akt pathway controls mitotic progression through Plk1. 2012年9月19日 第71回日本癌学会学術総会 (ロイトン札幌ホテル・札幌)

6. 笠原広介、後藤英仁、井澤一郎、渡邊信元、清野透、稲垣昌樹：PI3K-Akt pathway controls Polo-like kinase 1 (Plk1). 2012年5月28日 第45回日本発牛生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会・ポスターフラッシュトーク（国際会議場・神戸）
7. 後藤英仁、李萍、笠原広介、松山真、王中華・谷田部恭、清野透、稲垣昌樹：P90 RSK arranges Chk1 in the nucleus for monitoring of genomic integrity during cell proliferation. 2012年5月29日 第45回日本発牛生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会（国際会議場・神戸）
8. 笠原広介、後藤英仁、井澤一郎、渡邊信元、清野透、稲垣昌樹：PI3K-Akt pathway controls Polo-like kinase 1 (Plk1). 2012年5月28日 第45回日本発牛生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会・ポスターフラッシュトーク（国際会議場・神戸）
9. 後藤英仁、李萍、笠原広介、松山真、王中華・谷田部恭、清野透、稲垣昌樹：P90 RSK arranges Chk1 in the nucleus for monitoring of genomic integrity during cell proliferation. 2012年5月30日 第45回日本発牛生物学会・第64回日本細胞生物学会合同大会・ワークショップ（国際会議場・神戸）
10. Kasahara, K., Goto, H., Izawa and Inagaki, M.: 14-3-3 gamma activates Plk1 and controls mitotic progression. The 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (Nagoya Congress Center, Nagoya) **Poster**, Oct. 3, 2011
11. Goto, H., Li, P., Yatabe, Y., Kasahara, K., Matsuyama, M., Kiyono, T. and Inagaki, M.: Chk1 phosphorylation at Ser280 by p90 ribosomal kinase (p90 RSK). The 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, (Nagoya Congress Center, Nagoya) **Workshop**, Oct. 3, 2011
12. Goto, H., Li, P., Kiyono, T., Matsuyama, M., Kasahara, K., Murakami, Y., Yatabe, Y. and Inagaki, M.: Chk1 phosphorylation by p90 Ribosomal S6 kinase (p90 RSK). The 51th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology (Colorado Convention Center, Denver) **Poster**, Dec. 4, 2011
13. 笠原広介、後藤英仁、井澤一郎、渡邊信元、清野透、稲垣昌樹：新規リン酸化反応による分裂キナーゼPlk1の活性制御メカニズム. 2011年12月15日 第34回日本分子生物学会年会・ワークショップ（パシフィコ横浜・横浜）
14. 笠原広介、後藤英仁、井澤一郎、渡邊信元、清野透、稲垣昌樹：新規リン酸化反応による分裂キナーゼPlk1の活性制御メカニズム. 2011年12月16日 第34回日本分子生物学会年会・ワークショップ（パシフィコ横浜・横浜）
15. 李萍、後藤英仁、松山真、笠原広介、村上善子、谷田部恭、清野透、稲垣昌樹：p90 RSK (Ribosomal S6 Kinase) による Chk1-Ser280のリン酸化修飾. 2011年12月16日 第34回日本分子生物学会年会（パシフィコ横浜・横浜）
16. 笠原広介、後藤英仁、清野透、稲垣昌樹：PP2A antagonizes Chk1 phosphorylation by ATR through 14-3-3 proteins in DNA damage checkpoint. 第69回日本癌学会学術総会（大阪国際会議場・大阪）2010年9月22日
17. 李萍、後藤英仁、笠原広介、清野透、稲垣昌樹：増殖刺激応答における Chk1-Ser280のリン酸化反応. 第69回日

本癌学会学術総会（大阪国際会議場・大阪）2010年9月22日

18. 李萍、後藤英仁、笠原広介、松山誠、清野透、稲垣昌樹：増殖刺激応答におけるChk1-Ser280のリン酸化反応。第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会（国際会議場・神戸）2010年12月8日

19. 松山誠、後藤英仁、笠原広介、川上和孝、井澤一郎、榎本将人、小堀恭子、中西真、清野透、五島直樹、稲垣昌樹：中心体ではなく核に局在するChk1が細胞周期において重要な役割を果たす。第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会（国際会議場・神戸）2010年12月8日

〔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

笠原 広介 (KASAHARA KOUSUKE)

愛知県がんセンター（研究所）・発がん制

御研究部・研究員

研究者番号：90455535

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：