

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 1 日現在

機関番号：15101
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2011～2014
 課題番号：23570005
 研究課題名(和文)紡錘体チェックポイント終了に働くSIRT2分子がオートファジーを抑制する意義

 研究課題名(英文)Relationship between autophagy regulation by SIRT2 and its spindle assembly checkpoint function

 研究代表者
 井上 敏昭(Inoue, Toshiaki)

 鳥取大学・医学部・准教授

 研究者番号：80305573

 交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：紡錘体チェックポイント(以下SAC)は、染色体が微小管と正しく結合するまで分配されないよう分裂期に停止させる監視機構であり、その破綻は発がんに直結する。SAC-Onの機序の理解が進み、最終的にCyclin B/Cdk1活性を維持し分裂期停止に導くことが分かっている。一方、SAC-On細胞をSAC-Offに移行させ細胞周期を再開させる機構は不明であった。この機構として、SIRT2によるオートファジー制御が重要であること、その仲介経路としては当初予想していた中心体ではなく、オートファジー配下のある経路の活性が変化していることを突き止めた。今後この経路をSAC-Offの制御候補経路とし解析を進める。

研究成果の概要(英文)：We previously identified SIRT2, a member of the sirtuin protein family, as a regulator of turning of SAC activation. We investigated whether SIRT2 regulates basal autophagy and whether it is mediated by centrosome function since SIRT2 knockdown cells exhibited the centrosome fragmentation during SAC cause by the exposure to microtubule inhibitors. We show, by combined knockdown of autophagy genes and SIRT2, that SIRT2 serves this function at least partially by suppressing basal autophagy levels. However, the centrosome function is not involved in this function. Alternatively, we identified a possible pathway that mediates SAC-Off and the subsequent cell death among autophagy-regulated pathways and independently a cell cycle regulator. To delineate the relationship among autophagy and the regulatory pathway will lead to precise understanding of mechanism of SAC-Off and the subsequent cell death, which will increase the efficacy of microtubule inhibitors on tumor therapy.

研究分野：染色体医工学

キーワード：オートファジー SIRT2 紡錘体チェックポイント 微小管阻害剤 分裂死 四倍体

1. 研究開始当初の背景

紡錘体チェックポイント (Spindle Assembly Checkpoint: 以下 SAC) は、全ての染色体が微小管と正しく結合するまで分配されないよう M 期中期に停止させる監視機構である。正常細胞が通常条件下で分裂しているときでも、紡錘体-染色体の結合ミスは一定頻度で起こっており、この監視機構の破綻は異数体化を經由し発がんに直結する。この結合ミスは試験管内細胞培養系においては微小管阻害剤処理により誘発され、容易に SAC 活性化 (SAC-On) を再現できる。SAC-On の機序については理解が進み、SAC タンパクである BubR1 等が関与して最終的には Cyclin B/Cdk1 活性を維持し分裂期停止に導くことが分かってきた。一方、SAC-On 細胞を SAC-Off に移行させ細胞周期を再開させる機構は不明であった。

2. 研究の目的

我々は倍数体化抑制に働く新規 SAC タンパクとして脱アセチル化酵素 SIRT2 を同定していたが、新たに SIRT2 が SAC-On から Off への移行を担うことを見出した。さらに SAC-On の間、SIRT2 は中心体構造の維持に関与する (SIRT2 がないと中心体崩壊がおこる) ことを報告した。

この経路解明のため、SIRT2 結合タンパク群を探索したところ、HDAC6、Hsp70.1、Hsp70.2 などを同定できた。ここに示したものの、とくに HDAC6 は蛋白やオルガネラの品質管理のためのバルク分解機構であるオートファジーに必要な分子である。上記の結果に加え、SIRT2 が間期の恒常的オートファジーに対して阻害的に働くことが報告されたことから、SIRT2 による SAC-Off にはオートファジー抑制が関与するのではないかと考え検討する。さらに本研究では SIRT2、HDAC6、Hsp70s によるオートファジー制御に着目し SAC-Off の機序解明をめざす。そしてその意義を正確な染色体分配を司る中心体機能の確保に求め検証する。

3. 研究の方法

(1) SIRT2 による SAC-Off にオートファジー抑制が必要であることを生化学的に検証し確固たるものにする。

(2) このオートファジー抑制に SIRT2 結合タンパクとして同定した HDAC6、Hsp70s が関与することを示す。

(3) SIRT2 と HDAC6・Hsp70s はオートファジーの制御および SAC-Off 制御において分子レベルでどのような関わりを持つのか (脱アセチル化の基質なのか、単なる結合タンパクなのか、相互作用によりもたらされる分子機能の変化、上流・下流の関係) を知る。

(4) 中心体崩壊はオートファジー異常亢進に由来するのかがどうか明らかにする。もしそうである場合には、中心体構造が確保されない場合には SAC-Off が不可能なのかどうかを知り、中心体構造保持と SAC-Off 能との相互関係を知る。

(5) 中心体が関与しない場合には、SIRT2 の脱アセチル化分子の標的を新たに探索する、あるいはオートファジー配下の他の経路に着目するなど、柔軟に対応する。

4. 研究成果

(1) 中心体の関与について

SIRT2 ノックダウン細胞で SAC-On 時に見られた中心体崩壊は、オートファジーレベルをもとに戻しても回復は見られなかった。一方、SAC-Off のタイミングやその後の細胞死が正常に回復したことから、オートファジーは SAC-Off のタイミングを制御するが、それは中心体保全や崩壊が仲介しているわけではないことが考えられた。SIRT2 ノックダウン細胞で HDAC6 を共ノックダウンすることでオートファジーレベルとともに SAC-Off やその後の細胞死が回復したことから同経路上で働いていると考えられる (発表論文・雑誌論文)。共に脱アセチル化酵素である HDAC6 と SIRT2 とはお互いをタンパクレベルでどのように制御するのかを解析を進めていくことで SIRT2 がオートファジーを制御する機序の詳細を今後解明していく予定である。

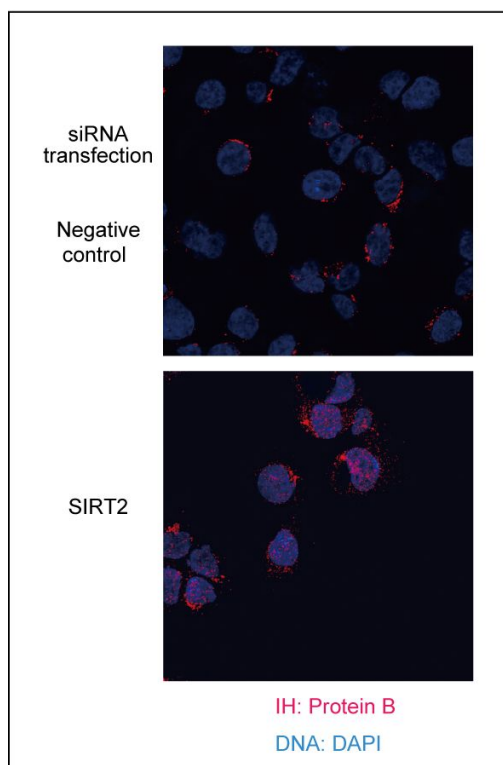
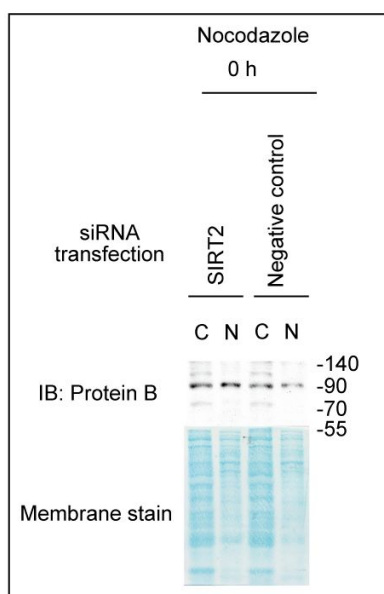
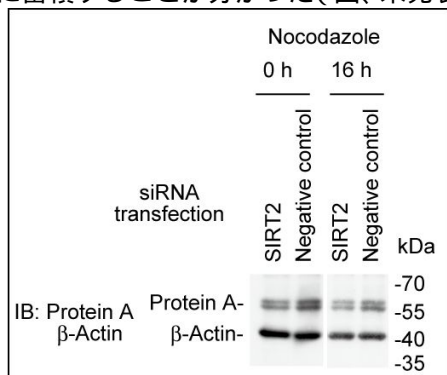
(2) SIRT2 の脱アセチル化の新規標的分子としての SAC タンパク BubR1 の同定

SIRT2 が SAC-Off を行う機序として新たにアセチル化によりその安定性が上昇することが報告された SAC タンパク BubR1 に着目して、SIRT2 の標的となる可能性を検討した。その結果、BubR1 の 250 番目のリジン残基を標的として脱アセチル化を行うことも見つけた。しかし、SIRT2 による脱アセチル化によるアセチル化レベルの変化では BubR1 の安定性および SAC の活性に対する変化は認められなかった (発表論文・雑誌論文にて報告)。このことは SIRT2 の SAC-Off の際の標的は BubR1 でも、前述の中心体でもなく、別の経路であると考えられる。

(3) オートファジーによる SAC-Off 制御の候補経路 (その 1)

これらの結果を受け、次に SIRT2 およびオートファジーが SAC-Off 制御をする機構として、オートファジー制御下のシグナル経路に着目することとした。その一つ、Protein A (ユビキチンリガーゼ) Protein B (その分解標的分子) 経路については、SIRT2 ノックダウン細胞で、Protein A が減少することがわかり、これはオートファジーが亢進していることと合う。Protein A の減少に伴いそ

の分解標的である Protein B のタンパク量や活性が上昇することがよく知られている。SIRT2 ノックダウン細胞では量的変化は認められないものの、Protein B が細胞質から核内に蓄積することが分かった(図、未発表)。



この経路は実際に活性化しているのかどうか、もしそうならこの経路が SAC-Off やその後の細胞死誘導にどのように関与しているのかを次期研究テーマ課題として解析を進めていくこととした。

(4)オートファジーによる SAC-Off 制御の候補経路(その2)

微小核は、DNA 損傷を受けた染色体から形成され、通常核から独立に存在する核である。本研究の過程で SAC-Off 後の四倍体細胞の多くにこの微小核が形成されていることがわかった。この現象は過去の報告(発表論文-雑誌論文、)からは SAC-Off の結果と予想され、微小核形成が SAC-Off を直接もたらす可能性は考えにくい、その後微小核を有する細胞が死滅または増殖停止に至ることを考慮するとその引き金となる可能性が期待される。オートファジー制御、微小核形成、四倍体での細胞死の三者の関係について今後解析を進めることで、未知の部分が多い SAC-Off で四倍体化した細胞での細胞死の機序の解明に寄与できる(発表論文-雑誌論文にて報告)。微小核はその存在が古くから知られているもののその形成機序や意義は不明の点が多い。本研究の今後の推進は、この解明にもつながる。

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 10 件)

Oshimura M, Uno N, Kazuki Y, Katoh M, Inoue T. A pathway from chromosome transfer to engineering resulting in human and mouse artificial chromosomes for a variety of applications to bio-medical challenges. *Chromosome Res.* 2015, 23:111-33.

査読有

doi: 10.1007/s10577-014-9459-z

Nakayama Y, Uno N, Uno K, Mizoguchi Y, Komoto S, Kazuki Y, Nanba E, Inoue T, Oshimura M. Recurrent micronucleation through cell cycle progression in the presence of microtubule inhibitors. *Cell Struct. Funct.* 2015, 40:51-9. 査読有

doi: 10.1247/csf.14005.

Narai T, Katoh M, Inoue T, Taniguchi M, Kazuki K, Kazuki Y, Sato K, Kodani I, Ryoike K, Oshimura M. Construction of a luciferase reporter system to monitor osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by using a mammalian artificial chromosome

vector. *Yonago Acta Med.* 2015, 58:23-29. 査読有
doi 無

Suematsu T, Li Y, Kojima H, Nakajima K, Oshimura M, Inoue T. Deacetylation of the mitotic checkpoint protein BubR1 at lysine 250 by SIRT2 and subsequent effects on BubR1 degradation during the prometaphase/anaphase transition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014, 453:588-594. 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2014.09.128.

Inoue T, Nakayama Y, Li Y, Matsumori H, Takahashi H, Kojima H, Wanibuchi H, Katoh M, Oshimura M. SIRT2 knockdown increases basal autophagy and prevents post-slippage death by abnormally prolonging the mitotic arrest that is induced by microtubule inhibitors. *FEBS J.* 2014, 281:2623-2637. 査読有
doi: 10.1111/febs.12810.

Tsusaka T, Guo T, Yagura T, Inoue T, Yokode M, Inagaki N, Kondoh H. Deacetylation of phosphoglycerate mutase in its distinct central region by SIRT2 down-regulates its enzymatic activity. *Genes Cells* 2014, 19:766-777. 査読有
doi: 10.1111/gtc.12176.

Kojima H, Inoue T, Kunimoto H, Nakajima K. IL-6-STAT3 signaling and premature senescence. *JAK-STAT* 2013, 2:4, e25763. 査読有
doi: 10.4161/jkst.25763.

Kojima H, Kunimoto H, Inoue T, Nakajima K. The STAT3-IGFBP5 axis is critical for IL-6/gp130-induced premature senescence in human fibroblasts. *Cell Cycle* 2012, 11:730-739. 査読有
doi: 10.4161/cc.11.4.19172.

Qi DL, Ohhira T, Fujisaki C, Inoue T, Ohta T, Osaki M, Ohshiro E, Seko T, Aoki S, Oshimura M, Kugoh H. Identification of PITX1 as a TERT suppressor gene located on human chromosome 5. *Mol. Cell. Biol.* 2011, 31:1624-1636. 査読有
doi: 10.1128/MCB.00470-10.

Osaki M, Takeshita F, Sugimoto Y, Kosaka N, Yamamoto Y, Yoshioka Y, Kobayashi E, Yamada T, Kawai A, Inoue

T, Ito H, Oshimura M, Ochiya T. MicroRNA-143 Regulates Human Osteosarcoma Metastasis by Regulating Matrix Metalloprotease-13 Expression. *Mol. Ther.* 2011, 19:1123-1130. 査読有
doi: 10.1038/mt.2011.53.

〔学会発表〕(計 8 件)

足立 美保子、末松 知久、押村 光雄、井上 敏昭、オートファジー制御による四倍体からの細胞死誘導経路、第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25-27 日、パシフィコ横浜

末松 知久、李 艶澤、中山 祐二、押村 光雄、井上 敏昭、紡錘体チェックポイント終了における脱アセチル化酵素 SIRT2 の作用機序、第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3-6 日(金) 神戸ポートアイランド

吉川 なつこ、末松 知久、大平 崇人、押村 光雄、久郷 裕之、井上 敏昭、hTERT 発現を抑制する PitX1 から解き明かす hTERT 発現制御ネットワーク、第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 11-14 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

荻野 由加利、中山 祐二、松森 はるか、田中 伸幸、押村 光雄、難波 栄二、井上 敏昭、複数の遺伝子搭載が可能な人工染色体ベクターの構築、第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 11-14 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

末松 知久、李 艶澤、中山 祐二、押村 光雄、井上 敏昭、分裂期での SIRT2 脱アセチル化標的タンパクの探索、第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 11-14 日、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

李 艶沢、末松 知久、中山 祐二、押村 光雄、井上 敏昭、がん治療の新たな標的分子としての SIRT2、第 34 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜、2011 年 12 月 13-16 日

荻野 由加利、松森 はるか、押村 光雄、中山 祐二、井上 敏昭、複数の遺伝子搭載が可能な人工染色体ベクターの構築、第 34 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜、2011 年 12 月 13-16 日

高橋 悠、加藤 基伸、尾崎 充彦、中山 祐二、中村 貴史、井上 敏昭、押村 光雄、麻疹ウイルスエンベロープタンパク質を利用したヒト人工染色体ベクターの in vivo 導入に向けた試み、第 34 回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜、2011 年

12月13-16日

〔図書〕(計2件)

Kojima H, Kunimoto H, Inoue T, Nakajima K. Interleukin-6 Induces Premature Senescence Involving the STAT3 and Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 5. Aging, Cancer, and Noncancer Pathologies, TUMOR DORMANCY AND CELLULAR QUIESCENCE AND SENESCENCE. (A. Hayat Ed.). Springer, pp 53-60. (2014)

松田 賢一、井上 敏昭、森 浩子、河田 光博、エピジェネティクス解析の基礎と組織細胞化学への応用、組織細胞化学 2013, 日本組織細胞化学会編, pp. 125-136 (2013)

〔その他〕

ホームページ等

自研究室のホームページを 2013 年に開設し、これまでの研究成果や日々の研究生活を研究者だけではなく、地域や社会、科学を志す若い世代に発信している。URL: <https://www.facebook.com/genoiko>

学科のホームページ管理も担当し、自研究室これらの情報を含む学科全体での研究の進展や学科でのイベントを学科ホームページにも掲載し、若い世代に情報発信した。URL: <http://www.med.tottori-u.ac.jp/introduction/faculty/life-science.html>

兼担する鳥取大学染色体工学研究センターのホームページにおいて、鳥取大学発の新しいテクノロジーである染色体工学に関する研究の成果を発信している。これにより染色体工学を利用した産官学連携事業の推進を図っている。URL: <http://www.med.tottori-u.ac.jp/chromosome/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 敏昭 (INOUE, Toshiaki)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：80305573