

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870501

研究課題名(和文) 新たに発見した微小管結合性抗癌剤に対する細胞応答の分子機構解明と創薬標的の探索

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of a novel response to microtubule-targeting agents and evaluation of their molecular as a potential therapeutic target.

研究代表者

飯森 真人 (Imori, Makoto)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20546460

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：微小管ダイナミクスが正しく制御されることは、有糸分裂期の正常な染色体分配に必須である。

申請者は微小管結合タンパク質のEB2が有糸分裂期では微小管上の局在性を失い、また微小管結合性抗癌剤により有糸分裂期停止を誘導することでリン酸化修飾されることを見出した。さらにCDK1およびAurora BによってEB2のN末端側領域とセリン・スレオニンに富んだ中央領域がリン酸化され、微小管との結合親和性が負に制御されていた。非リン酸化型EB2は染色体整列の遅延および染色体異数性を誘導することより、Aurora B/CDK1による有糸分裂期でのEB2のリン酸化制御がゲノム安定性の維持に必要なことが示された。

研究成果の概要(英文)：Temporal regulation of microtubule dynamics is essential for proper progression of mitosis, and control of microtubule plus-end tracking proteins by phosphorylation is an essential component of this regulation. Here we show that Aurora B and CDK1 phosphorylate microtubule end-binding protein 2 (EB2) at multiple sites within the N-terminus and a cluster of serine/threonine residues in the linker connecting the calponin homology and end-binding homology domains. EB2 phosphorylation, which is strictly associated with mitotic entry and progression, reduces the binding affinity of EB2 for microtubules. Expression of non-phosphorylatable EB2 delayed formation of bipolar metaphase plates in a microtubule binding-dependent manner, and led to aneuploidy even in unperturbed mitosis. We propose that Aurora B and CDK1 temporally regulate EB2, as a downstream target of the spindle assembly checkpoint, thereby ensuring proper mitotic progression and genome stability.

研究分野：細胞生物学

キーワード：微小管結合性抗癌剤 有糸分裂 微小管

## 1. 研究開始当初の背景

微小管結合性の抗癌剤は臨床上最も重要な抗癌剤のひとつである。これまで微小管結合性の抗癌剤に対する細胞応答は、有糸分裂期において染色体上の動原体と微小管の正確な結合を監視する動原体上のチェックポイント因子に関する研究が先行してきた。申請者は微小管結合因子であるEB2が微小管結合性抗癌剤存在下において有糸分裂期で重要な役割を持つAurora Bキナーゼにより高度にリン酸化される新規細胞応答を発見し、非リン酸化EB2を発現させた細胞は、染色体整列に異常を示すことを確認した。

## 2. 研究の目的

活性化された Aurora B キナーゼが EB2 をリン酸化する生物学的意義の解明、微小管結合性抗癌剤の効果予測因子としての Aurora B キナーゼ/EB2 経路の評価などの基礎研究を行い、微小管結合性抗癌剤と相乗的效果をしめす創薬標的を同定し創薬標的の候補につなげるための学術的基盤を確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) EB2 のリン酸化に関するリン酸化時期、責任キナーゼおよびリン酸化部位の同定

細胞周期同調細胞を用いて様々な細胞周期時期の細胞抽出液を調製し、ウェスタンブロットにてEB2のリン酸化を観察することでリン酸化される時期を特定した。また微小管結合性抗癌剤によってリン酸化される時期に、様々なリン酸化酵素阻害剤を併用することで、リン酸化修飾を阻害できるものを探索した。また、そこで見出されたリン酸化酵素のリン酸化コンセンサス配列の情報より、リン酸化部位を推定し、そのアミノ酸アラニン置換変異体(非リン酸化変異体)のリン酸化状況を検証することでリン酸化部位の同定を試みた。

### (2) EB2 のリン酸化がおよぼす生物学的意義に関する解析

上記目的のために非リン酸化EB2変異タンパク質発現細胞を樹立する。EB2は微小管結合タンパク質であるため、リン酸化修飾が微小管との結合親和性に及ぼす影響を微小管共沈実験により検証する。また、実際の細胞内でのEB2の局在が細胞周期あるいはEB2のリン酸化状態で変化するのかを検証するために免疫染色を行った。そして、EB2のリン酸化修飾の生物学的意義として細胞周期の進行とりわけ有糸分裂期の進行の詳細観察を行うため、生細胞を用いてライブイメージングを行った。さらに、染色体安定性に対するEB2のリン酸化の必要性を検証するために、

非リン酸化EB2変異タンパク質を安定発現する正常細胞株を樹立し、細胞周期の進行回数とともに染色体数の変化を観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 細胞周期におけるEB2の局在性およびリン酸化

免疫染色により細胞周期の各フェーズにおけるEB2の局在性を観察したところ、間期には微小管の先端領域のやや後方の局在しており、有糸分裂期に入ると微小管上の局在性を失うことが観察された。有糸分裂期の局在性の消失と相関するように、EB2の複数部位がリン酸化されていることが観察された。また微小管結合性抗癌剤や有糸分裂期進行阻害剤などによるスピンドルチェックポイント依存的な有糸分裂期停止を誘導したところ、やはりEB2のリン酸化が認められた。このリン酸化修飾は微小管結合性抗癌剤存在下でも有糸分裂期ではない細胞では観察されず、また有糸分裂期からの脱出と共に消失することより、有糸分裂期に特異的なイベントとして厳密に制御されていることが示された。申請者は過去の研究(Limori *et al.*, *Exp Cell Res.*, 2012)において、EB1ファミリータンパク質のMal3がリン酸化により微小管との親和性が負に制御されることを報告した。そこで微小管共沈実験により、EB2と微小管の結合親和性に対するリン酸化修飾の影響を評価した。その結果、有糸分裂期同調細胞由来のリン酸化型EB2は間期由来の非リン酸化型EB2に対して微小管への結合親和性が大幅に減少していた。以上より、EB2は有糸分裂期にはその微小管上の局在を失い、またリン酸化修飾をおけることを見出した。

### (2) EB2リン酸化の責任キナーゼの同定

EB2のリン酸化が有糸分裂期に厳密に起こることを見出したことより、有糸分裂期キナーゼの阻害剤あるいはsiRNAによる発現抑制によりEB2のリン酸化に関する責任キナーゼの同定を試みた。その結果、サイクリン依存的キナーゼ1(CDK1)およびAurora Bキナーゼが候補として同定された。試験管内キナーゼ反応試験によって、これら2つのキナーゼとリコンビナントEB2とのリン酸化を行ったところ、リコンビナントEB2のリン酸化修飾が確認された。さらにCDK1に関しては、恒常活性型の変異CDK1の発現によりEB2のリン酸化を誘導し、Aurora Bに関しては、その活性に必須であることが知られているCPC(Chromosome Passenger Complex)複合体の構成因子であるSurvivinあるいはBorealinの発現抑制によりEB2のリン酸化状態が抑制された。前述のように、EB2のリン酸化は微小管との結合親和性を制御してい

るため、CDK1 および Aurora B の特異的阻害剤存在下で有糸分裂期の EB2 と微小管との結合親和性を観察したところ、有意な低下が認められた。以上より、EB2 リン酸化の責任キナーゼとして CDK1 と Aurora B を同定した。

### (3) EB2 リン酸化部位の同定とリン酸化修飾をされる細胞内空間

上記の研究結果より、EB2 の責任キナーゼが CDK1 と Aurora B であることを見出したことより、それらによる EB2 のリン酸化部位の同定を行った。EB2 のアミノ酸配列上における既知の CDK1 および Aurora B のリン酸化コンセンサス配列に存在するセリン・スレオニンに非リン酸化アミノ酸であるアラニンに置換して EB2 のリン酸化状態を観察した。その結果、N 末端側領域に 1 ヶ所、微小管結合ドメインである CH ドメインと C 末端側 EB1 ホモロジドメインのセリン・スレオニンに富んだ結合中央領域領域に 3 ヶ所のリン酸化部位を同定した (図 1)。

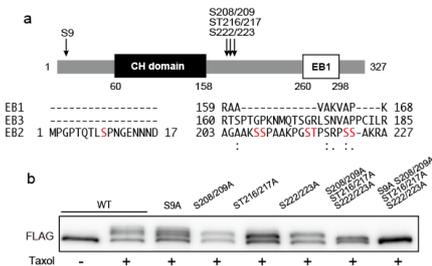


図 1. EB2 リン酸化部位の同定  
(a) EB2 のリン酸化部位の模式図および EB ファミリータンパク質のアライメントと EB2 のリン酸化部位  
(b) リン酸化部位のセリン・スレオニンのアラニン置換による EB2 リン酸化の消失

また、EB2 が細胞内のどの領域でリン酸化されるのかを検証した。申請者は過去の研究 (Imori *et al.*, *Exp Cell Res.*, 2012) において、EB1 ファミリータンパク質の Mal3 を微小管上に強制局在させ得る CH ドメイン上のアミノ酸変異を報告しているが、同様の変異を EB2 に導入して、EB2 の有糸分裂期微小管上でのリン酸化状態を観察した。一方で、Hayashi ら (Hayashi *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2003) によって報告された微小管結合阻害を引き起こす CH ドメイン上のアミノ酸変異を EB2 に導入して、微小管上に結合できない変異 EB2 の有糸分裂期のリン酸化状態を観察した。その結果、微小管上への強制的な局在、あるいは微小管上に局在できない (細胞質局在) 変異 EB2 のどちらも、野生型 EB2 と同様のリン酸化レベルで修飾されることが示された。このことは、EB2 が微小管上のみならず、細胞内の広い範囲でリン酸化修飾されることを強く示唆するものである。以上より、EB2 のリン酸化部位は N 末端側と中央領域に合計 4 ヶ所存在しており、それらのリン酸化

は有糸分裂期においてスピンドル微小管上および細胞質の広い空間的範囲においてリン酸化されることが示された。

### (4) 有糸分裂期の進行における EB2 リン酸化修飾の生物学的意義

上記研究結果より、4 ヶ所のリン酸化部位を同定した。これらのリン酸化部位に含まれるセリン・スレオニン 7 残基を全てアラニン置換した非リン酸化型 EB2 (EB2-7A) 変異タンパク質を発現する安定発現株を樹立して有糸分裂期の進行を観察した。野生型 EB2 を発現させた細胞にくらべて、EB2-7A 細胞では有糸分裂期前期から前中期までに有意な進行遅延が認められた (図 2)。

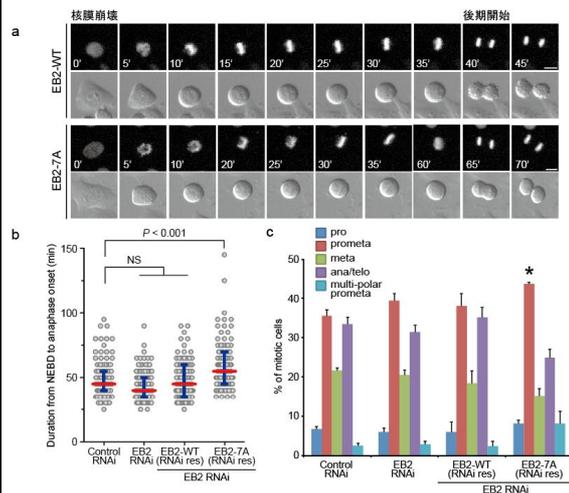


図 2. 非リン酸化型 EB2 発現細胞の有糸分裂期進行遅延  
(a, b) ライブイメージングによる有糸分裂期の進行の観察。ヒストン H2B-GFP 発現により染色体を可視化した細胞で、核膜崩壊から後期開始までの時間を測定した。  
(b) 固定細胞の免疫染色による有糸分裂期の各ステップの細胞の割合。

また、動原体とスピンドル微小管の結合ミスを手動的に誘導してリリースさせたところ、動原体とスピンドル微小管の結合ミスの修正機構には異常は認められないにもかかわらず、その後の染色体分配に必要な中期スピンドル形成に遅延が認められた。このことは、有糸分裂期において EB2 がリン酸化されることは、EB2 をスピンドル微小管から排除して有糸分裂期の正常な進行に必要な微小管ダイナミクスを保證することを示唆する結果であった。さらに、このような微小管ダイナミクスの長期的な非効率化の誘導が染色体安定性にもたらす影響を評価するために、正常細胞株に EB2-7A を発現させて 30 世代培養を続けた後、染色体の数を計測して染色体異数性の有無を観察した。その結果、EB2-7A 発現細胞のみが染色体異数性の出現頻度を亢進させた (図 3)。以上の結果より、有糸分裂期において EB2 が CDK1 および Aurora B キナーゼによってリン酸化修飾されることは、微小管への結合を負に制御しており、有糸分裂期の染色体整列の効率的な完了に必要とされた。また、EB2 の恒常的なリン

酸化異常は染色体異数性を誘導することより、EB2 の有糸分裂期におけるリン酸化修飾は染色体の安定性を保証するものであると考えられた。

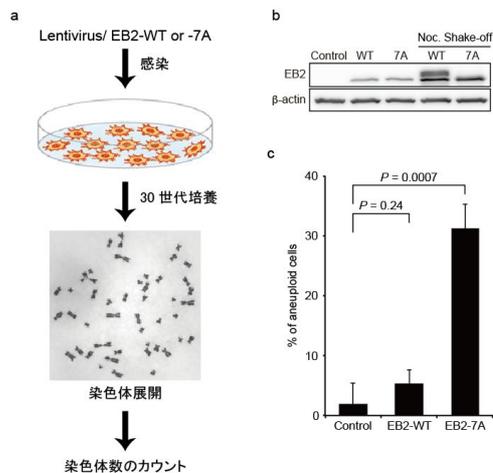


図3. 正常細胞株における非リン酸化型 EB2 発現と染色体不安定性  
(a) 実験の概要図。  
(b) レンチウイルス感染による EB2 の恒常的発現の確認。  
(c) 30 世代培養後に染色体数が異数化した細胞の割合。

#### <引用文献>

1: *Imori et al.*, *Exp Cell Res.* 2012; 318:262-75.

2: *Hayashi et al.*, *Biol Chem.* 2003; 278:36430-4.

#### 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)

##### 平成 25 年度

Tuul M, Kitao H, Imori M, Matsuoka K, Kiyonari S, Saeki H, Oki E, Morita M, Maehara Y.

Rad9, Rad17, TopBP1 and claspin play essential roles in heat-induced activation of ATR kinase and heat tolerance. *PLoS One.* 2013;8(2):e55361.

##### 平成 26 年度

Honma K, Nakanishi R, Nakanoko T, Ando K, Saeki H, Oki E, Imori M, Kitao H, Kakeji Y, Maehara Y.

Contribution of Aurora-A and -B expression to DNA aneuploidy in gastric cancers. *Surg Today.* 2014 Mar;44(3):454-61.

Matsuoka K, Imori M, Niimi S, Tsukihara H, Watanabe S, Kiyonari S, Kaniwa M, Ando K, Tokunaga E, Saeki H, Oki E, Maehara Y, Kitao H. Trifluridine Induces p53-Dependent Sustained G2 Phase Arrest with Its Massive Misincorporation into DNA

and Few DNA Strand Breaks. *Mol Cancer Ther.* 2015 Apr;14(4):1004-13.

Imori M, Kitao H, Maehara Y. Mad2 and BubR1: chemotherapeutic coordinators in gastric cancer. *Cell Cycle.* 2015;14(7):946.

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 4 件)

Aurora B および CDK1 による微小管結合因子 EB2 の制御機構

飯森真人、北尾洋之、前原喜彦

第 25 回 高遠シンポジウム、平成 25 年 08 月 29 日-30 日、大津市(口頭・ポスター)

Aurora B および CDK1 による微小管結合因子 EB2 の制御機構

飯森真人、北尾洋之、渡邊すぎ子、前原喜彦

第 36 回 日本分子生物学会年会、平成 25 年 12 月 11 日-14 日、神戸市(ポスター)

Physiological role of Aurora B and CDK1 in regulating microtubule-associated protein EB2

M. Imori, H. Kitao, S. Watanabe, Y. Maehara

The 2013 ASCB Annual Meeting、平成 25 年 12 月 14 日-18 日、ニューオリンズ(ポスター)

Aurora B and CDK1 cooperate to phosphorylate EB2 to ensure the mitotic progression and genomic stability M. Imori, S. Watanabe, H. Saeki, E. Oki, E. Tokunaga, Y. Tou, H. Kitao, Y. Maehara  
第 73 回 日本癌学会学術総会、平成 26 年 9 月 25 日-27 日、横浜市(口頭)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.kyudai2geka.com>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

飯森 真人(イイモリ マコト)

研究者番号: 20546460