

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461880

研究課題名(和文)複合体ダイナミクスと機能プロテオミクスの融合による放射線感受性制御機構の解明

研究課題名(英文)A functional proteomics approach to mechanism of radiation sensitivity.

研究代表者

榎本 敦 (Enomoto, Atsushi)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・講師

研究者番号：20323602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者の複合体形成と機能プロテオーム情報を基盤とした放射線感受性制御のメカニズムの研究においては、放射線によって活性化するタンパク質リン酸化酵素STK38がCDC25Aの76番目のセリン残基をリン酸化すること、STK38 shRNA発現ベクターを導入して、STK38を発現抑制させたノックダウン細胞ではX線照射後のCDC25Aのリン酸化やG2/M期の細胞の割合が減少していることが明らかとなった。さらにSTK38ノックダウン細胞ではX線感受性が亢進していた。これらのことからSTK38はCDC25Aのリン酸化を介したG2チェックポイントや放射線感受性の制御に関わっていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：STK38 (serine/threonine kinase 38), also known as NDR1 (nuclear Dbf2-related 1, is a serine/threonine protein kinase belonging to a subclass of the protein kinase A (PKA) /PKG/PKC-like (AGC) family, which includes cAMP-dependent kinase, protein kinase B, and protein kinase C. Knockdown of STK38 enhances cellular radio-sensitivity. However, its substrates and downstream signaling pathways remain to be determined. The functional proteomics approach revealed that STK38 endogenously interact with CDC25A and that STK38 directly regulates CDC25A's stability by phosphorylating Ser-76. Moreover, the STK38/CDC25A signaling module is demonstrated to be required to regulate the DNA-damage-induced G2/M checkpoint. Together, the results suggest that the STK38 knockdown-mediated radiosensitization may be due, at least in part, to impaired DNA damage-induced G2 arrest resulting from defective CDC25A degradation.

研究分野：放射線生物学

キーワード：Proteomics STK38 Radiation sensitivity DNA damage responses

1. 研究開始当初の背景

Serine-Threonine Kinase 38 (STK38) は、Protein kinase A/C/G ファミリーに属するセリン・スレオニンキナーゼである。酵母ホモログ Dbf-2 は、分裂制御因子として機能していることが知られている。一方、研究代表者は、哺乳類細胞において STK38 がアポトーシス誘導に重要な役割を果たすストレス応答 JNK シグナルの活性化を抑制することを明らかにした (Enomoto et al., *Oncogene*, 2008)。

STK38 は、X 線や H₂O₂ などの酸化ストレスによって顕著に活性化され、その活性化は、PI-3K 阻害剤 Wortmannin によって抑制されることを見出した (榎本ら, 放射線生物研究, 2008)。また PI-3K 経路に着目した生化学的な解析から、AKT の基質である GSK-3 が、STK38 の Serine 6 (S6), Threonine 7 (T7) をリン酸化し、それらのリン酸化によって STK38 活性が抑制されていることを明らかにした (Enomoto et al., *Free Radic. Biol. Med.* 2012)。また多くのヒト癌細胞株では正常細胞より高い STK38 活性を有していることが判明した。このことから、STK38 を標的とすることにより、増感が可能となるのではないかと考え、siRNA 導入により放射線増感を検証した。その結果、STK38 を標的とすることにより、ヒト子宮頸癌由来 HeLa, ヒト乳癌由来 T47D, ヒト胎児腎由来 HEK293T 細胞などにおいて、JNK シグナルの亢進と細胞死の増強が顕著に見られ、増感効果が認められた (Enomoto et al., *Eur. J. Cancer*. 2013)。これらの結果から、酸化ストレス誘発活性化の意義は、過度のストレスシグナルを抑制し、細胞を防御することにあると推測した。しかしながら、STK38 の細胞内基質・相互作用因子や増感に至るプロセスの詳細な分子メカニズムについては、未解明である。

2. 研究の目的

これまで研究代表者は、1) 多くのヒト癌細胞株において Serine-Threonine Kinase 38 (STK38) 活性の亢進が認められること、2) STK38 標的とした siRNA による発現抑制は、放射線増感を誘導することなどを見出してきた。そこで本研究では、STK38 を bait として、in vivo における生理的活性化複合体のプロテオーム解析を行い、DNA 損傷シグナル伝達制御における新たな分子基盤の構築と STK38 を標的とした増感メカニズムの解明を目指す。また独自の抗活性型 STK38 抗体および STK38 の基質リン酸化を指標とした感受性予測法を確立する。STK38 を起点としたシグナル伝達機構の解明は、発癌や放射線感受性メカニズムだけではなく分子標的薬の開発に有益な情報をもたらすことが大いに期待される。

3. 研究の方法

1) 機能的複合体のプロテオーム解析

これまでに申請者は、多くのヒト癌細胞株で STK38 活性が亢進していることおよび複数の癌細胞株で STK38 を標的とした放射線増感

が起こることを見出している。そこで STK38 活性化の意義を明らかにするため、生理的条件下で活性型 STK38 と複合体形成する因子の網羅的解析を行う。まず GFP タグを付加した野生型・不活性型 STK38 発現プラスミドを培養細胞に導入し、X 線照射を行う。そしてタグ抗体を用い、線量・経時変化ごとに STK38 複合体を解離させないような弱性非イオン性界面活性剤を含む生理的・非変性条件下で精製する。なお、X 線照射は、研究代表者が所属する研究室に設置されている X 線照射装置 (Pantak HF-350、島津製作所) を用いて行う。次に複合体形成を阻害せず非特異的にタンパク質に結合する泳動色素 Coomassie G-250 を用いて、非変性・中性条件下で複合体を維持させたまま電気泳動を行う。Coomassie G-250 は、中性付近で最もタンパク質結合能が高く、かつタンパク質を変性させることなく負の電荷を与えることを特徴としており、その色からこの色素を用いた電気泳動法を Blue-Native PAGE と呼んでいる (Wittig and Schagger, *Proteomics*, 2008, 8:3974-3990)。次に分子量に応じて展開した種々の GFP-STK38 複合体を含む Blue-Native PAGE gel を UV トランスイルミネーター (ATTO) 上で観察し、GFP 発光する複合体バンドのパターンを各条件 (未照射、照射、線量・経時変化、STK38 活性の有無) において比較解析する。そして野生型 STK38 を導入した細胞に X 線照射した時にのみ、結合・解離し、複合体バンドパターンが変化するスポットを選別する。これにより、非特異的なタンパク質や STK38 活性とは関連のない因子との結合によるノイズを削減できる。GFP 蛍光を指標にして、X 線照射によって活性化した STK38 複合体のバンドのみを切り出し、SDS-PAGE による二次元展開を行い、分子量毎に個々の構成因子の篩い分けを行う。このように一次元目で Blue Native-PAGE による STK38 複合体を分子量に従って分離し、GFP 蛍光を指標にした選別を行う。さらに SDS-PAGE で二次元展開することにより複合体形成因子の個別化を図り、効率的なスクリーニングを可能にする。そして各タンパク質のスポットをゲルスロットカッター (BioRad) により切り出し、トリプシン消化後、質量分析法 (島津製作所、AXIMA-CFR MALDI-TOF/MS) による解析を行い、目的タンパク質の分子情報を得る。トリプシン消化物の分子量データベースをもとにした質量分析用検索エンジン (MASCOT Research) を用いて、同一の消化パターンを持つタンパク質を探索する。

2) 放射線感受性制御因子の同定とその機能解析

質量分析法により同定した STK38 複合体構成因子の候補について、そのタンパク質をコードする遺伝子の過剰発現もしくは siRNA 発現ベクターを構築する。ヒト癌細胞株を用いて、その候補因子の遺伝子操作 (過剰発現/

発現抑制)を行い、放射線に対する感受性をコロニー形成法により解析する。そして候補因子の STK38 基質としての可能性を *in vitro* kinase assay により検討し、リン酸化される場合は、その部位を同定してアラニン置換による放射線感受性への影響を解析する。これらの結果を踏まえて、STK38 シグナルにおける放射線感受性制御因子を決定する。次に STK38 ノックダウンおよび同定した感受性制御因子の遺伝子操作による放射線応答への影響について解析する。具体的には、DNA 二重鎖切断のマーカーである γ -H2AX を指標とした DNA 修復能、フローサイトメーターを用いた細胞周期分布や細胞死の解析を通じて、STK38 ノックダウンによる放射線増感のトリガーがどの応答プロセスの破綻によるものかを明らかにする。

さらに放射線照射による活性化 STK38 複合体のダイナミクスと線量、時間軸や応答誘導との時空間的な相関を解析し、STK38 による DNA 損傷応答の制御機構を明らかにする。さらに、バイオインフォマティクスを駆使した既知 DNA 損傷シグナルネットワークにおける STK38 シグナルの位置づけおよび相互作用などについてシミュレーションを行い、細胞の持つ損傷応答における選択性・優先順位についてのモデルを探索する。

3) 応答特異的抗体を用いた感受性予測

所属研究室には、ヒト正常・癌由来培養細胞株、様々な放射線高感受性株 (Ataxia Telangiectasia 患者由来細胞、DNA-PK 欠損 Scid 細胞、DNA-Ligase IV 欠損株など) などが多数保存されており、それらの多くについて X 線に対する生存曲線のデータが蓄積されている。そこで、各細胞において、同定した感受性制御因子の発現レベルやリン酸化・活性化レベルを免疫染色や WB により解析し、既存の X 線感受性試験の結果との相関について評価を行う。それらの中から、タンパク質の量的・質的变化と感受性に相関が認められた因子を見出し、感受性指標の 1 候補とする。

研究代表者は、STK38 の活性制御ドメインであるリン酸化される部位 (serine 6/threonine 7 (S6/T7)) を同定し (Enomoto et al, *Free Radic. Mol. Med.*, 2012)、そのリン酸化部位特異的な抗リン酸化 STK38 抗体を作製した (p-S6/T7 STK38 antibody)。この独自に開発した抗リン酸化 STK38 抗体は、キナーゼ活性を測定することなく、放射線による STK38 活性の変化 (応答性) を簡便にモニターできる利点を有している。

3) 1) および 2) で作製・使用した STK38 複合体構成因子に対する抗体と抗活性型 STK38 抗体と組み合わせた二重免疫染色法に

より、DNA 損傷応答特異的な複合体形成のダイナミクスと感受性予測を同時に評価し、予測法の信頼度を高める。これらが感受性指標として有用である判断した場合には、多検体スクリーニングを可能にする ELISA キットを作製して、実用化に向けた準備を開始したい。一方で、同定した因子に対する特異的抗体あるいは修飾抗体が市販されていない場合には、抗体作製を行う。

4. 研究成果

研究代表者の複合体形成と機能プロテオーム情報を基盤とした放射線感受性制御のメカニズムについて研究においては、放射線によって活性化するタンパク質リン酸化酵素 STK 38 が CDC25A の 76 番目のセリン残基をリン酸化すること、STK38 をノックダウンした細胞においては、エックス線照射後の CDC25A のリン酸化が抑制されることや G2/M 期の細胞の割合が減少していることなどが判明した。これらのことから STK38 は CDC25A のリン酸化を介した G2 チェックポイント制御に関わっていると考えられた (Fukawasa et al, *Cell Signal*, 2015)。さらに DNA 損傷応答の転写因子として知られる p53 などに結合し、それをリン酸化することも見出した。しかしながら STK38 をノックダウンした細胞ではエックス線照射後の p53 のリン酸化については親株とのリン酸化パターンの比較において有意な差は認められなかった。また STK38 が DNA 二重鎖切断修復に関わる因子と内在的に結合し、そのタンパク質をリン酸化することも見出した。現在、これらのリン酸化部位を同定し、リン酸化部位変異体の放射線感受性および損傷応答反応について解析を進めている。

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下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1) A. Enomoto, J. Yamada, A. Morita, and K. Miyagawa. Bisdemethoxycurcumin enhances X-ray-induced apoptosis possibly through p53/Bcl-2 pathway. *Mutat. Res.* 815 (2017) 1-5. doi: 10.1016/j.mrgentox.2016.12.005. 査読有

2) T. Hashimoto, D. Horikawa, Y. Saito, H. Kuwahara, H. Kozuka-Hata, T. Shin-I, Y. Minakuchi, K. Ohishi, A. Motoyama T. Aizu, A. Enomoto, K. Kondo, S. Tanaka, Y. Hara, S. Koshikawa, H. Sagara, T. Miura, S. Yokobori, K. Miyagawa, Y. Suzuki, T. Kubo, M. Oyama, Y. Kohara, A. Fujiyama, K. Arakawa, T. Katayama, A. Toyoda, and T. Kunieda. Extremotolerant tardigrade genome and improved radiotolerance of

human cultured cells by tardigrade-unique protein. Nature Commun. 7 (2016) 12808. doi:10.1038/ncomms12808. 査読有

3) T. Fukasawa, A. Enomoto, K. Miyagawa. Serine-Threonine Kinase 38 regulates CDC25A stability and the DNA damage-induced G2/M checkpoint. Cell. Signal. 27 (2015) 1569-1575. doi: 10.1016/j.cellsig.2015.04.013. 査読有

4) A. Miyasaka, K. Oda, Y. Ikeda, O. Wada-Hiraike, T. Kashiyama, A. Enomoto, N. Hosoya, T. Koso, T. Fukuda, K. Inaba, K. Sone, Y. Uehara, R. Kurikawa, K. Nagasaka, Y. Matsumoto, T. Arimoto, S. Nakagawa, H. Kuramoto, K. Miyagawa, T. Yano, K. Kawana, Y. Osuga, T. Fujii. PI-3K/mTOR pathway inhibition overcomes radioresistance via suppression of the HIF1-alpha/VEGF pathway in endometrial cancer. Gyn Oncol. 138 (2015) 174-180. doi: 10.1016/j.ygyno.2015.04.015. 査読有

〔学会発表〕(計 4 件)

1) 榎本 敦、深澤 毅倫、宮川 清 「SUMO化による STK38 の活性制御と放射線感受性への寄与」日本放射線影響学会第 59 回大会、2016 年 10 月 27 日、広島県広島市 JMS アステールプラザ

2) 榎本 敦、深澤 毅倫、宮川 清 「DNA 損傷誘発細胞周期制御における STK38 の役割と増感への応用」第 18 回癌治療増感シンポジウム、2015 年 2 月 6 日 奈良県奈良市奈良県文化会館

3) Atsushi Enomoto, Takemichi Fukasawa, and Kiyoshi Miyagawa. 「Multiple roles of STK38 in DNA damage responses」15th International Congress of Radiation Research. Kyoto. Kyoto International Conference Center. 2015 .May 26.

4) 榎本 敦、深澤 毅倫、宮川 清 「SUMO化による STK38 の活性制御と放射線感受性への寄与」第 38 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 3 日、神戸・神戸国際会議場

〔図書〕(計 1 件)

「Effects of Radiation on Human Body」Japan Radioisotope Association (2015) DVD

M. Izumi, A. Enomoto, N. Sugiura, H. Tauchi,

Y. Matsumoto, B. Y. Hales, K. Shiotsuki, T. Shibata.

〔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

榎本 敦 (Enomoto, Atsushi)
東京大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：20323602

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()