

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670159

研究課題名(和文) Discovery of Aurora-A Regulated Signal Networks Critical for Glucose Metabolism and EMT

研究課題名(英文) Discovery of Aurora-A Regulated Signal Networks Critical for Glucose Metabolism and EMT

研究代表者

片山 博志 (Katayama, Hiroshi)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：90713975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、細胞のがん発症過程で引き起こされる上皮間葉転換と解糖能の変化におけるがん遺伝子オーロラAキナーゼの関与について検討した。その結果、オーロラAキナーゼの高発現により、EMTの誘導、細胞極性の異常、細胞分裂期における解糖能の上昇が誘導されていることがわかった。オーロラAキナーゼによりリン酸化されたp53においても解糖能の上昇が認められた。リン酸化p53に特異的に結合するタンパク質中に解糖経路に関わるタンパク質が含まれていることから、オーロラAキナーゼの高発現による解糖能上昇にp53が部分的に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we examined whether Aurora-A oncoprotein involves in EMT and glycolysis which are crucial process for transformation of cells. We revealed that Aurora-A overexpression results in induction of EMT and loss of cell polarity in 3D culture, and enhanced glycolysis during mitosis. Aurora-A phosphorylation of p53 but not p73 also showed similar increase glycolysis. Analysis of proteins specifically interacting to phosphory-mimetic mutant of p53 by Mass-spectrometry revealed the existence of proteins known to involve in the process of glycolysis. Our study suggests that Aurora-A plays an essential role in the tumorigene through deregulation of EMT and glycolysis which are partly mediated through p53 phosphorylation.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：オーロラキナーゼ p53 EMT glycolysis

1. 研究開始当初の背景

オーロラ A キナーゼは細胞分裂期において、中心体、紡錘系、動原体近傍に局在し、中心体分離や両極性紡錘系形成の制御を通して、娘細胞への染色体の均等分配の保証機構に参与している (Sasai et al., *Oncogene* 2008; Katayama et al., *Cell Cycle* 2008)。また、オーロラ A キナーゼが、多くのがん腫において高発現していることが報告されており、培養細胞と乳腺上皮細胞特異的遺伝子改変マウスを用いた過剰発現実験から、中心体増幅による染色体数異数化を伴った細胞形質転換と腫瘍形成を誘導することが証明され、オーロラ A キナーゼががん遺伝子であることが明らかにされている。(Zhou et al., *Nat. Genetics* 1998; Wang et al., *Oncogene* 2006; Treekitkarnmongkol, Katayama et al., *Carcinogenesis*, under revision)。オーロラ A キナーゼのがん進行における役割に関する研究から、N-myc などのがん蛋白質の安定化や機能の亢進、我々が同定したオーロラ A キナーゼによるがん抑制蛋白質 p53 および p73 のリン酸化が、DNA 損傷チェックポイントとスピンドルチェックポイントの不活性化を引き起こすことなどが明らかになっている (Otto et al., *Cancer Cell* 2009; Katayama H, *Cancer Cell* 2012)。しかし、これまでに多くのがん関連遺伝子産物との直接的・間接的な相互作用が明らかにされているが、オーロラ A キナーゼの機能異常が、がん発症につながるような本質的な情報伝達経路は、未だに明らかにされていない。

腫瘍におけるエネルギー代謝の特徴の一つに、ミトコンドリア呼吸系によるエネルギー生産を低下させ、解糖系からエネルギーを優先的に得て、増殖に必要な生合成と ROS などの細胞毒性分子の消去を行っていることが挙げられる。このため、腫瘍細胞では、グルコース代謝に関わる調節が広範囲にリプログラミングされていることが示唆されている (Cairns et al., *Nat. Rev. Cancer* 2011)。また、グルコース代謝制御による細胞内 ROS 濃度の低レベル化が、細胞の EMT 表現型の獲得と乳がん幹細胞の生存に密接に関わっていることが報告された (Dong et al., *Cancer Cell* 2013)。ここ数年間に、p53 ファミリー蛋白質によるグルコース代謝とミトコンドリア呼吸系経路の調節が、細胞がん化と密接にリンクしていることを示す多くの報告が発表された。p53 は、ミトコンドリア呼吸に必須のシトクローム c オキシダーゼ複合体形成に参与する SCO2 や、フルクトース 2,6-二リン酸濃度を下げ、解糖系を抑制し、グルコースを酸化的ペントースリン酸経路に流す働きのある TIGAR などの遺伝子群の転写調節を行っている (Matoba et al., *Science* 2006; Bebsaad et al., *Cell* 2006)。また、転写活性非依存的な機能として、p53 はグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ (G6PD) と結合することで、ペントースリン酸

経路を阻害している (Jiang et al., *Nat. Cell Biol.* 2011)。一方、p73 は G6PD の転写を正に調節し、ペントースリン酸経路を活性化し、ROS の産生の低下に寄与している (Du et al., *Nat. Cell Biol.* 2013)。

我々が発見したオーロラ A キナーゼによる p53 ファミリー蛋白質の機能抑制的リン酸化は、標的遺伝子プロモーターへの結合の阻害と、グルコース代謝に関わる Mortalin との結合を促し、核から細胞質への移行を引き起こす (Katayama and Sen, *Horm Cancer* 2011; Katayama et al., *Cancer Cell* 2012)。また、近年、オーロラ A キナーゼが、RALA (Ras-like GTPase) のリン酸化を介して、細胞分裂期におけるミトコンドリアの分裂を調節していることが明らかにされている。(Kashatus et al., *Nat. Cell Biol.* 2011)。グルコース代謝が細胞質中で起きていることから、リン酸化 p53 が G6PD に結合し、その活性を変化させる可能性が考えられる一方、リン酸化 p53 と p73 は、それぞれ SCO2 と G6PD 遺伝子の転写抑制を引き起こすとも考えられ、複雑な調節がなされていると予測される。また、オーロラ A キナーゼによる p53 リン酸化が、胚幹細胞の分化を抑制することや体細胞の iPS 細胞へのリプログラミングに重要であることが報告されている (Lee et al., *Cell Stem Cell* 2012)。

2. 研究の目的

本研究では、オーロラ A キナーゼの発現を誘導できるヒト正常乳腺上皮細胞 (MCF-10A) 安定株、p53 null の H1299 肺がん細胞、RPE1 ヒト網膜色素上皮細胞を用いて、オーロラ A キナーゼとリン酸化 p53 のグルコース代謝依存性、ミトコンドリア機能変化、上皮間葉転換 (EMT) の誘導、細胞極性への関与について検討を行った。

3. 研究の方法

オーロラ A キナーゼの発現をテトラサイクリン存在下で誘導できる MCF-10A 細胞を、抗生物質 G418 のセレクションによって確立した。EMT 誘導の有無は、vimentin と E-cadherin のウエスタンブロットと免疫染色により評価した。細胞極性の変化については、細胞の三次元培養と極性タンパク質 Numb の免疫染色によって評価した。

オーロラ A キナーゼのミトコンドリア分裂制御と解糖系代謝との関係を明らかにするため、monastrol 処理によって分裂期に同調した PRE1 細胞を用いた。分裂期進行を進めるため、同調した細胞は、Monastrol を含まない培養液中に播種した。この時、オーロラ A キナーゼ特異的阻害剤 MLN8237 を加え、解糖系代謝速度を Seahorse XFe 96 Extracellular Flux Analyzer にて継時的に測定した。オーロラ A キナーゼの高発現の影響を調べるために、オーロラ A キナーゼを発現するプラスミドをトランスフェクション

したRPE1細胞を同様にMonastrolで同調した。リン酸化p53とp73の解糖系代謝への影響については、野生型あるいはリン酸化変異体を発現するプラスミドをH1299細胞にトランスフェクションし、RPE1細胞同様にSeahorse XFe 96 Extracellular Flux Analyzerにて継続的に解糖系代謝を測定した。

解糖系代謝に関わるタンパク質がリン酸化p53特異的に結合しているか否かを調べるために、野生型あるいはリン酸化変異体を発現させたH1299細胞の抽出液を用いて免疫沈降を行った。免疫沈降産物の電気泳動から特異的に結合が見られるタンパク質を質量分析器にて解析を行った。同定されたタンパク質とp53あるいはp73との結合を免疫沈降により確認を行った。

4. 研究成果

MCF-10A細胞におけるオーロラAキナーゼの過剰発現から、EMTマーカーであるE-cadherinの発現量低下とvimentinの発現量増加を認めた。これは、細胞がEMTを起こしていることを示している。3次元培養とNumbの免疫染色の結果からは、細胞の極性が失われていること示唆する結果を得た。(図1)

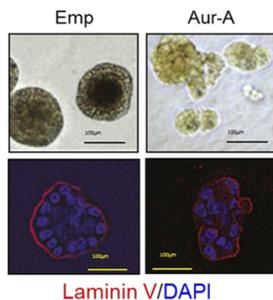


図1. オーロラAキナーゼを高発現したMCF-10A細胞の形態異常

オーロラAキナーゼの解糖系代謝への影響については、分裂期において糖代謝の上昇を認めた。間期の細胞では、影響が認められなかったことから、ミトコンドリア分裂との関係が考えられるが、今回の研究からは明らかに出来なかった。

オーロラAキナーゼによるリン酸化p53あるいはp73の解糖系代謝への影響を調べた結果、リン酸化p53を発現する細胞において有意に解糖能が上昇していた(図2)。リン酸化p73では、そのような変化は認められなかった。リン酸化p53特異的に結合するタンパク質中に解糖系に関わるタンパク質が含まれているか、免疫沈降産物の質量分析器解析を行った結果、複数のタンパク質が存在した。そのうち、いくつかのタンパク質が真にリン酸化p53と結合することを確認出来た(図3)。

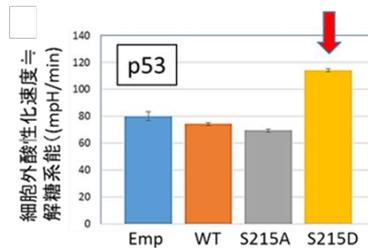


図2. オーロラAキナーゼによるリン酸化を疑似しているp53 S215D変異は高い解糖能を示す

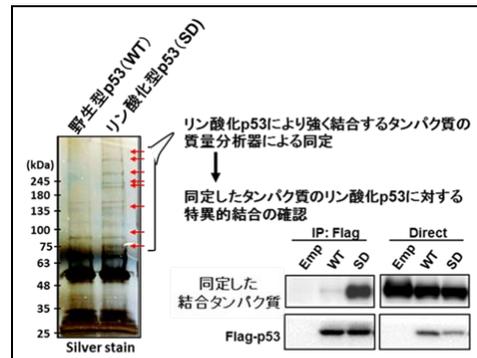


図3. 生理的条件下においてリン酸化p53に特異的に結合するタンパク質を複数個同定した

以上の結果から、オーロラAキナーゼ過剰発現によって観察される解糖系代謝の活性化と、それに密接な関係にあるEMTの誘導は、部分的にp53ファミリーの機能不全を介して生じていると示唆された。

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 3件)

1. Fujii S, Srivastava V, Hegde A, Kondo Y, Shen L, Hoshino K, Gonzalez Y, Wang J, Sasai K, Ma X, Katayama H, Estecio MR, Hamilton SR, Wistuba I, Issa JJ, Sen S. Regulation of AURKC expression by CpG island methylation in human cancer cells. *Tumor Biology*, 査読有, 36(10), 2015, 8147-8158.
2. Yasuda Y, Sakai A, Ito S, Mita Y, Sonoyama T, Tanabe S, Shirakawa Y, Naomoto Y, Katayama H, Shimizu K. Genetic polymorphism at codon 546 of the human RAD17 contributes to the risk for esophageal squamous cell carcinoma. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*, 査読有, 7(1), 2016, 58-66.
3. 片山博志 がん遺伝子産物オーロラAキナーゼによる細胞周期チェックポイント機構破綻のメカニズムの解明. 山陽

放送学術文化財団レポート 59, 2015,
26-29.

〔学会発表〕(計 3件)

1. Katayama H, Sasai K, Sen S. Role of Aurora Kinase-A in Transcriptional Programming of Mitotic Genes. 5th Meeting of the Asia Forum of Chromosome and Chromatin Biology. Jawaharlal Nehru Centre for Advanced Scientific Research, Bangalore, India Jan 18th, 2015.
2. Katayama H, Sasai K, Sen S. Functional interaction between Aurora-A kinase and Mps1 kinase in the regulation of cell cycle progression and genomic instability. The Fourth China・Bangchui Island Cancer Symposia. Academic Report Hall of Dalian Medical University Library. July 5th, 2015
3. 片山博志 第37回両備てい園記念財団奨励賞記念講演：染色体不安定性と発がんにおけるオーロラキナーゼの役割-新規阻害剤の開発を目指して。平成27年10月2日 両備ホールディングス本社ビル(岡山市)

〔図書〕(計 1件)

1. Sen S, Katayama H. Aurora kinases Targeted Therapy of Acute Myeloid Leukemia. Springer New York. 査読有 2015, 371-389

6. 研究組織

(1)研究代表者

片山 博志 (Hiroshi Katayama)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90713975

(2)研究分担者

笹井 香織 (Kaori Sasai)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：50722162

(3)連携研究者

()

研究者番号：