

令和 3 年 5 月 14 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06927

研究課題名(和文) Chk1を介した細胞生存シグナルの解明

研究課題名(英文) Chk1 function in normal cell cycle and cell viability

研究代表者

後藤 英仁 (GOTO, Hidemasa)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20393126

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)：チェックポイントキナーゼ1(Chk1)は、DNA損傷応答(DDR)時にATRの下流で活性化するトランスデューサー分子である。他方、Chk1は、(外的DNA損傷刺激のない)正常な細胞周期進行にも深く関わっているが、その詳細な分子機構は不明であった。本研究では、内在性Chk1を特異的かつ即効性に分解できる実験系を新たに確立した。この実験系を用いて、Chk1の特異的かつ急速な分解後に引き起こされる反応の解析を行なったところ、基本的には、DNA障害チェックポイントの際と同様な下流シグナル経路を介して、通常の細胞周期進行(細胞の生存)の際にもChk1が機能していることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Chk1抑制による殺細胞効果は、正常細胞よりがん細胞において顕著であるため、多くの薬剤会社がChk1阻害剤を抗がん治療の分子標的薬として開発を続けている。そのため、Chk1を介した細胞生存シグナルの解明は、なぜ、Chk1阻害剤ががん細胞により効果的なのかを明らかにするうえでも重要であるが、その詳細はほとんど解明されていなかった。当研究により、DNA損傷を受けた細胞と受けていない細胞でChk1の下流のシグナル伝達経路が大きく変化しないことが明らかになった。このことは、Chk1阻害剤を臨床現場で応用していく際に正常細胞への損傷も常に考慮すべきであることを強く示唆しているものといえる。

研究成果の概要(英文)：Chk1 is an evolutionally conserved protein kinase that transduces checkpoint signals from ATR to Cdc25A during DNA damage response (DDR). In mammals, Chk1 also controls cellular proliferation even in the absence of exogenous DNA damage. Here, we have established near-diploid HCT116 cell lines containing endogenous Chk1 protein tagged with a minimum auxin-inducible degron (mAID) using a CRISPR/Cas9-based gene editing. Establishment of these cells enabled us to induce specific and rapid depletion of the endogenous Chk1 protein, which resulted in aberrant accumulation of DNA damage factors that induced cell-cycle arrest at S or G2 phase. Cdc25A stabilized upon Chk1 depletion before the accumulation of DNA damage factors. Simultaneous depletion of Chk1 and Cdc25A partially suppressed the defects caused by Chk1 single depletion. These results indicate that, similar to its function in DDR, Chk1 controls normal cell-cycle progression mainly by inducing Cdc25A degradation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：チェックポイントキナーゼ1(Chk1) 細胞生存 細胞周期 チェックポイント

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Chk1 は、DNA 損傷・複製チェックポイントの仲介キナーゼとして、長く位置づけられてきた。Chk1 は、DNA 損傷や複製障害にตอบสนองして活性化した ATR によって、その Ser317 および Ser345 がリン酸化され、活性化する。活性化した Chk1 は、Cdc25 ファミリーのプロテインホスファターゼ(ヒトでは、A、B、C の 3 タイプ)をリン酸化することでその機能を抑制する。これらの中で、Cdc25A が一番重要な基質と考えられている。Cdc25A は、Chk1 によるリン酸化修飾が引き金となって、プロテアソーム依存的に分解される。Cdc25 はサイクリン依存性キナーゼ (CDK) の活性化に必須のため、Chk1 は CDK の活性化を間接的に抑制することで、次の細胞周期への進行を阻止している。

Chk1 は、1) *CHEK1* ノックアウトマウスは胎生早期に致死であること、2) RNA 干渉法や阻害剤などで Chk1 の機能を抑制すると細胞死 (アポトーシス) に至ることなどから、細胞の生存そのものに不可欠であると考えられている。このような Chk1 抑制による殺細胞効果は、正常細胞よりがん細胞において顕著であるため、多くの薬剤会社が Chk1 阻害剤を抗がん治療の分子標的薬として開発を続けている。そのため、Chk1 を介した細胞生存シグナルの解明は、なぜ、Chk1 阻害剤ががん細胞により効果的なのかを明らかにするうえでも重要であるが、DNA 損傷・複製チェックポイントのものに比べて、解析が遅れているのが現状であった。

Chk1 の機能解析は、これまで、主に、遺伝子ノックアウト法や RNA 干渉法などが用いられてきた。しかし、Chk1 の機能を抑制すると、比較的短時間で DNA 損傷が引き起こされてしまうことが報告されていた。そのため、Chk1 機能を抑制してから解析までに比較的時間を要する遺伝子ノックアウト法や RNA 干渉法では、Chk1 の機能阻害による直接的な変化を観察しているか、それとも、誘導された DNA 損傷などに反応した二次的な応答を捉えているのかを判別するのは基本的に困難であった。また、Chk1 阻害剤を用いた解析では、その阻害剤の特異性に問題がある場合が多かった。つまり、Chk1 の細胞生存における役割を解析するためには、Chk1 を特異的かつ短時間で抑制できる実験系が必要とされていた。

2. 研究の目的

本研究では、外的 DNA 損傷刺激のない (通常の) 細胞周期進行における Chk1 基質を同定し解析することで、Chk1 の細胞生存における役割を明らかにすることをその研究目的とする。

3. 研究の方法

(1) Chk1 を誘導性にかつ迅速 / 特異的に分解できる細胞株の確立

上記の背景に述べた技術的困難点を克服するため、(植物ホルモンの一種である) auxin 誘導性に内在性の Chk1 を特異的かつ迅速に分解できる細胞株を樹立し、解析を行う。具体的には、CRISPR/Cas9 によるジーンターゲット法を用いて、(父方および母方の)

両方の *CHEK1* 遺伝子座の (最終エクソンの) 終始コドンの直前に minimum auxin-inducible degreen (mAID) および標識タグ (5Myc または mClover) を付加した *CHEK1-mAID-5Myc* (*CHEK1-mAM*) または *CHEK1-mAID-mClover* (*CHEK1-mACI*) 細胞株をそれぞれ確立する (図 1)。

(2) 外的 DNA 損傷刺激のない (通常の) 細胞周期進行における Chk1 基質の探索

上記の確立した細胞株を用いて、Chk1 機能を迅速に抑制した際の変化を観察する。まず、これまで DNA 損傷チェックポイントで同定されている基質や細胞周期マーカーなどがどのような時間的経過で変化するかを観察し、細胞周期進行において重要な Chk1 基質がこれら既存のマーカーや基質のなかに存在するかについて解析する。これらの解析で外的 DNA 損傷刺激のない (通常の) 細胞周期進行において (DNA 損傷チェックポイントにはない) 特異的な基質が存在する可能性が想定できる場合は Tandem Mass Tag (TMT) 法を用いて、auxin 添加後の各タンパク質のリン酸化量の変化を網羅的に解析し、候補となる基質を同定する。

(3) 外的 DNA 損傷刺激のない (通常の) 細胞周期進行におけるシグナル伝達経路の解明

Chk1 のリン酸化修飾によって機能低下が考えられる基質については、内在性の Chk1 と目的基質が auxin 依存性にかつ同時に分解誘導できる細胞株を新たに樹立し、目的基質の同時分解誘導によって、Chk1 分解の表現型が緩和されるかを観察する。また、Chk1 のリン酸化修飾によって機能亢進が考えられる基質については、同定基質の過剰発現によって、Chk1 の分解による表現型が緩和されるかについて検討する。この場合、Tet-On 細胞を作製し、検討する予定である。

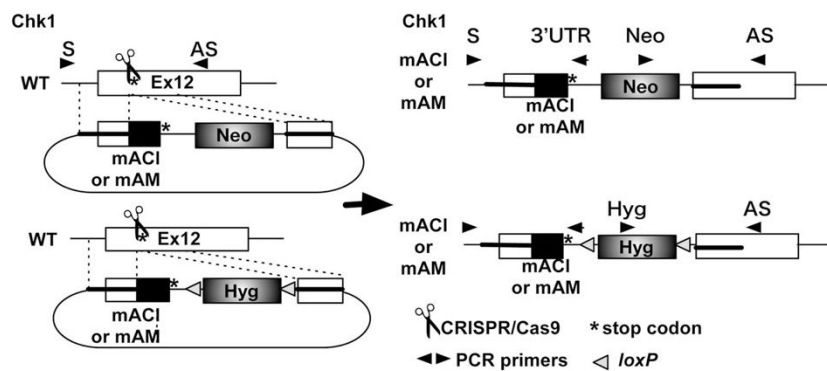


図 1 Chk1-mAID細胞株樹立の模式図

必要であれば、(リン酸化反応を模倣すると考えられる) アスパラギン酸・グルタミン酸に置換した変異体を導入する予定である。

これらの解析を通じて、外的 DNA 損傷刺激がない状態で Chk1 がどのような基質をリン酸化することで細胞の生存に結びついているのかを明らかにする。また、同定シグナル伝達経路が、正常細胞とがん細胞の間でどのように異なるかを明らかにすることで、Chk1 阻害剤のがんにおける殺細胞効果の分子基盤を解明していく。

4. 研究成果

(1) Chk1 を誘導性にかつ迅速に分解できる細胞株の確立

図 2 に示すように、auxin 誘導性に内在性の Chk1 を特異的かつ迅速に分解できる細胞株の樹立に成功した。これらの細胞株では、auxin 依存性に Chk1 タンパク質が比較的短時間 (1 時間以内) で分解できることが判明した。

(2) 外的 DNA 損傷刺激のない (通常の) 細胞周期進行における Chk1 分解後のマーカーの変化

Chk1 の誘導分解後の各種細胞周期マーカーの時間的変化を観察したところ、Chk1 の分解誘導 2-4 時間後ぐらいから、Cdc25A の分解が抑制され、そのタンパク質レベルが上昇してくること、12 時間後ぐらいから、 γ H2AX や Chk2 のリン酸化 Thr68 などの DNA 損傷マーカーや DNA 損傷チェックポイント関連タンパク質 p53 が上昇してくることが判明した (図 2 および図 3)。これらの結果は、通常の細胞周期の進行においても、Chk1 が Cdc25A をリン酸化し、分解していること、Cdc25A の安定化後に DNA 損傷が引き起こされていることを示している。

(3) 外的 DNA 損傷刺激のない (通常の) 細胞周期進行における Chk1-Cdc25A 経路の重要性

上記細胞株を用いて解析したところ、Chk1 の分解誘導後 2 日目ぐらいから細胞増殖能が低下してくることが判明した。これらはこれまでの報告を追試する結果ともいえる。細胞の生存には、Chk1 による Cdc25A のリン酸化修飾による分解誘導が必要である (つまり、CDK の異常活性化が細胞死を誘導している) 可能性を考え、内在性の Chk1 と Cdc25A が auxin 依存性にかつ同時に分解誘導できる細胞株を新たに樹立した。その結果、Chk1 分解誘導による増殖抑制の表現型は、Cdc25A の同時分解誘導によって部分的に緩和された。また、Chk1 分解誘導による DNA 損傷マーカーの上昇も Cdc25A の同時分解誘導によって部分的に緩和された。

考察

上記の結果から、通常の細胞周期進行においても、DNA 損傷チェックポイントの際と同様に、Chk1 は Cdc25A を分解することで細胞周期の進行や細胞の生存に重要な役割を果たしていることが判明した。Chk1 分解誘導による表現型が Cdc25A の同時分解誘導によって部分的にしか緩和

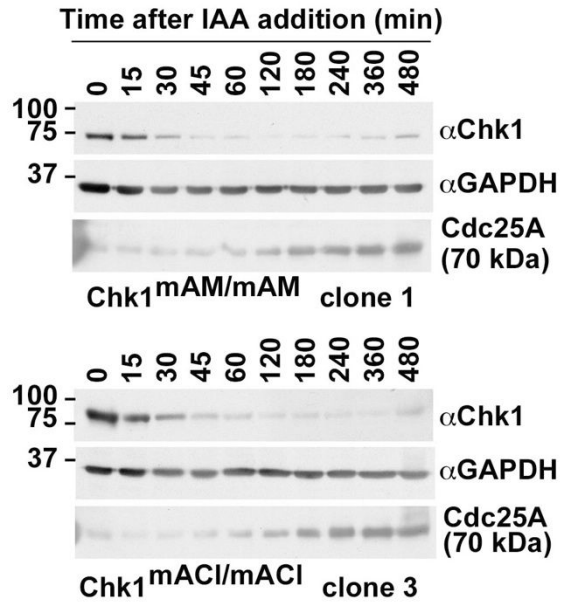


図 2 auxin誘導性Chk1分解細胞株の確立

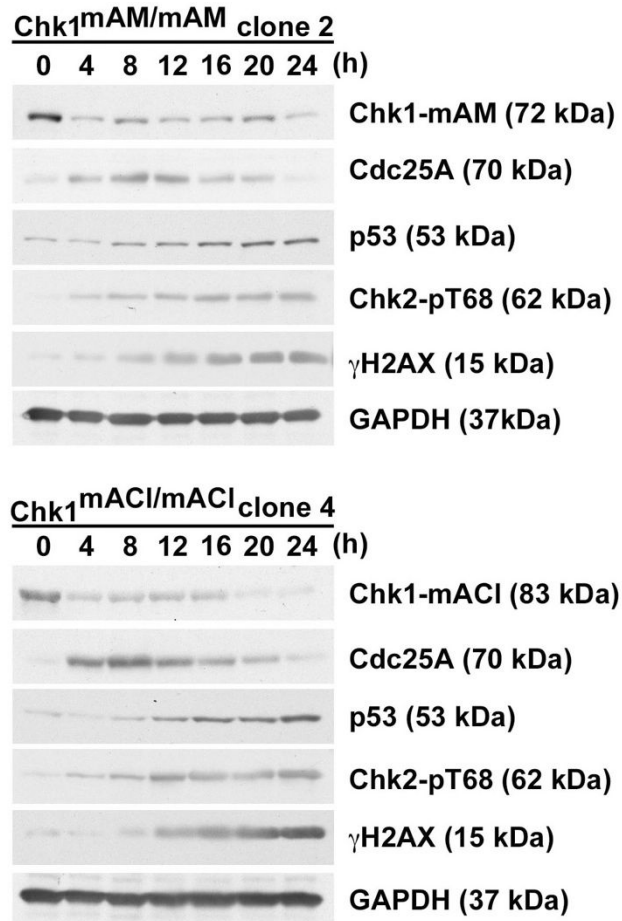


図 3 Chk1分解誘導後の各種マーカーの変化

されなかったのは、Chk1 が他の基質を介しても細胞周期進行を制御している可能性や Chk1 活性が DNA 複製の際などの際に時空間的に巧妙に制御している可能性が想定される。これらの可能性は今後の検討課題といえる。

DNA 損傷を受けた細胞と受けていない細胞で Chk1 の下流のシグナル伝達経路が大きく変化しないことは、Chk1 阻害剤を臨床現場で応用していく際に正常細胞への損傷も常に考慮すべきであることを強く示唆しているものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ito Sayuri, Goto Hidemasa, Kuniyasu Kinue, Shindo Mayumi, Yamada Masayuki, Tanaka Kozo, Toh Gaik-Theng, Sawa Masaaki, Inagaki Masaki, Bartek Jiri, Masai Hisao	4. 巻 9
2. 論文標題 Cdc7 kinase stimulates Aurora B kinase in M-phase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18622
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-54738-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Goto H., Natsume T., Kanemaki M.T., Kaito A., Wang S., Gabazza E.C., Inagaki M., Mizoguchi A.	4. 巻 132
2. 論文標題 Chk1-mediated Cdc25A degradation as a critical mechanism for normal cell cycle progression.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Cell Sci.	6. 最初と最後の頁 (pii) jcs223123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.223123	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Inaba H., Yamakawa D., Tomono Y., Enomoto A., Mii S., Kasahara K., Goto H., Inagaki M.	4. 巻 498
2. 論文標題 Regulation of keratin 5/14 intermediate filaments by CDK1, Aurora-B, and Rho-kinase.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 544-550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.03.016	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka K., Goto H., Nishimura Y., Kasahara K., Mizoguchi A., Inagaki M	4. 巻 109
2. 論文標題 Tetraploidy in cancer and its possible link to aging.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 2632-2640
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas13717	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 後藤英仁、王淑杰、垣内愛加、稲垣昌樹、溝口明
2. 発表標題 組織特異的四倍体化マウスの解剖学的解析－細胞の多核化と個体老化の連関－
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hidemasa Goto, Akira Mizoguchi, Masaki Inagaki
2. 発表標題 Tetraploidy in cancer and aging
3. 学会等名 第77回日本癌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Goto H., Inaba H., Inagaki M.	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer New York	5. 総ページ数 7
3. 書名 Encyclopedia of Signaling Molecules, 2nd edition, ed. Choi S	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------