

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670778

研究課題名(和文) Gemininタンパクの分解制御の破綻がもたらす癌化機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism of tumorigenesis by disruption of the regulation of geminin proteolysis

研究代表者

工藤 保誠 (KUDO, Yasusei)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：50314753

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、Gemininタンパクのコピキチン分解制御異常による過剰発現と癌化との関与を検討した。Thr25のリン酸化によって安定化したGemininは、Cdt1のクロマチンへのローディングを阻害することにより、G1期における複製前複合体形成を阻害した。癌細胞株において、Gemininのリン酸化異常による過剰発現は認められなかったが、いくつかの癌細胞株が恒常的にリン酸化を示すことが明らかになった。以上のように、GemininのThr25のリン酸化によるコピキチン分解阻害が及ぼすGemininタンパクの過剰発現が、DNA複製異常を介して、どのように癌化に寄与するかを検討した。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the relationship between overexpression of Geminin protein due to abnormal regulation of ubiquitin-mediated proteolysis and tumorigenesis. Stabilized Geminin by phosphorylation on Thr25 inhibited pre-replication complex formation via inhibition of Cdt1 loading to chromosome at G1 phase. Overexpression of Gemini protein by abnormal regulation of Thr25 phosphorylation was not observed in cancer cells, but constitutive phosphorylation on Thr25 was observed in some cancer cells. Thus, we investigated how overexpression of geminin protein via prevention from ubiquitin-mediated proteolysis caused by constitutive Thr25 phosphorylation contribute to tumorigenesis.

研究分野：口腔病理学

キーワード：geminin コピキチン分解 癌化

1. 研究開始当初の背景

我々は、細胞周期調節因子のユビキチン分解に関わるユビキチンリガーゼ複合体である SCF や APC/C に着目し、基質タンパクの探索とそのユビキチン分解機構の解明、さらにその異常による癌化への影響について検討してきた (Cancer 83: 2447-66, 1998; Clin Cancer Res 6: 916-23, 2000; Cancer Res 61: 7044-77, 2001; Oncology 63: 398-404, 2002; Dev Cell 4: 799-812, 2003; Mol Cell Biol 24: 8184-94, 2004; Am J Pathol 165: 2147-55, 2004; Mol Cancer Ther 4: 471-6, 2005; PLoS ONE 2:e944, 2007; J Cell Sci 124: 2816-25, 2011; Cell 149: 1023-1034, 2012)。最近、我々は、M 期特異的に Aurora-A が Geminin の Thr25 をリン酸化し、そのリン酸化が APC/C ユビキチンリガーゼ複合体によるユビキチン分解を抑制することを明らかにした (図参照)。さらに、M 期特異的に Geminin を knockdown した解析から、M 期にリン酸化され安定化した Geminin が DNA 複製の準備に必要な複製前複合体 (pre-RC) の形成に重要であることを明らかにした (本研究中に Tsunematsu et al., Nat. Commun. 4, 1885, 2013 として掲載された)。我々は、Geminin の分解異常が DNA 複製異常を介して癌化に関与すると考えているが (図参照)、Geminin の pre-RC 形成への関与の詳細やその破綻による癌化への影響に関しては明らかにされておらず、本研究でその詳細なメカニズムについて検討する。

2. 研究の目的

ヒト細胞では、DNA を正確に複製するために、極めて種々の精巧なメカニズムを持っており、その破綻が発がんの原因となる。Geminin は、S~G₂ 期において Cdt1 に直接結合し、そのゲノムへの結合を阻害することで DNA 複製を一度に規定する分子で、G₁ 期にユビキチン分解される。S~G₂ 期における Geminin の機能はよく知られているものの、M 期での機能は未だ明らかにされていない。我々は、最近、Geminin が細胞分裂期において Aurora-A により Thr25 がリン酸化され、ユビキチン分解から免れ、複製前複合体の形成に関与することを見いだした。そこで、本研究では、Geminin タンパクのユビキチン分解制御の異常による過剰発現と癌化との関与を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

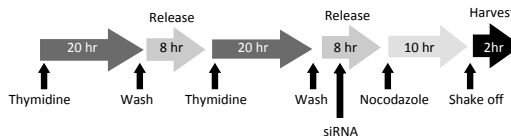
本研究では、1) リン酸化によって安定化した Geminin がどのようにして pre-RC の形成に必須であるか、2) Geminin の過剰発現による癌化への関与を明らかにするために、下記のような研究計画を遂行した。

平成 25 年度

(1) リン酸化によって安定化した Geminin の pre-RC 形成や DNA 複製に及ぼす影響

① 分裂期特異的 Geminin knockdown による pre-RC 形成への影響

Thymidine を用いて、下図のように細胞周期を G₁/S 期に同調し、その過程で、control あるいは Geminin siRNA を導入後、nocodazole を用いて、細胞分裂期に同調させることにより、細胞分裂特異的に knockdown させた。次に、細胞分裂期からリリースさせた細胞を経時的に S 期まで回収し、クロマチン分画とそれ以外の分画のライセートを抽出し、Cdt1 や



Cdc6 を含めた pre-RC に関わる因子の発現動態とクロマチンへのローディングを調べることにより、pre-RC の準備から形成過程の詳細を経時的に検討した。

② Geminin の分裂期特異的リン酸化の pre-RC 形成への影響

上記のように分裂期特異的に Geminin を knockdown した細胞に、分裂期特異的なリン酸化部位である Thr25 のリン酸化欠失変異体 (Thr25 を Ala に変えた変異体) あるいはリン酸化模倣型変異体 (Thr25 を Asp に変えた変異体) を導入し、細胞を分裂期から経時的に回収し、クロマチン分画とそれ以外の分画のライセートを抽出し、Cdt1 や Cdc6 を含めた pre-RC に関わる因子の発現動態とクロマチンへのローディングを調べることにより、pre-RC の準備から形成過程の詳細を調べた。また、次の S 期での BrdU の取り込みを調べることにより、Geminin のリン酸化による安定性が及ぼす DNA 複製への影響を検討した。

③ Geminin の分裂期特異的リン酸化制御とユビキチン分解との関連

G₁ 期初期に Geminin が APC/C^{Cdh1} によりユビキチン分解されることが知られていることから、Thr25 の脱リン酸化と分解開始のタイミングを詳細に検討した。また、G₁ 期に活性化する脱リン酸化酵素の阻害剤を用いて、網羅的に Geminin の Thr25 を脱リン酸化するフォスファターゼを調べることにより、Geminin Thr25 の脱リン酸化酵素を同定することを試みた。

平成 26 年度

(2) Geminin 過剰発現細胞の癌化への影

響

① Geminin 過剰発現モデルの作製

Geminin を siRNA を用いて knockdown させると、DNA 複製を終えることができず、染色体数が増加し、核の腫大と S/G2 期での細胞増殖停止がおこることが知られていることから、Geminin の遺伝子導入後に、内在性の Geminin の発現をなくすために、コンディショナルノックアウトマウスから採取された胎児線維芽細胞を用いる。まず、Geminin の非分解型（分解ドメインである D-box の変異体）あるいはリン酸化模倣型変異体（Thr25 を Asp に変えた変異体）を Geminin のコンディショナルノックアウトマウスから採取された胎児線維芽細胞に導入し、安定性に発現する細胞を作製した。その後、レトロウイルスを用いて Cre リコンビナーゼを発現させることで、内在性の Geminin を欠損させる。この細胞を用いて、細胞分裂動態異常をタイムラプス蛍光顕微鏡を用いて経時的に観察した。また、細胞周期調節への影響をフローサイトメトリーや細胞周期マーカーの発現を調べることにより詳細に検討した。また、これら細胞のコロニー形成能を検討し、癌化への影響を検討した。

② 癌組織における Geminin のリン酸化と過剰発現との関連

Geminin の過剰発現とリン酸化異常による過剰発現との関連を明らかにするため、種々の癌から採取された組織から、タンパクを抽出し、Geminin の発現と Thr25 のリン酸化動態を Western blot 法により検討した。また、癌組織アレイを用いて、免疫組織化学的染色法により Geminin および Thr25 リン酸化 Geminin の発現を検討した。Thr25 リン酸化 Geminin 抗体が免疫組織化学的染色に用いることができるかどうかは十分に検討した。さらに、Geminin の発現と Thr25 のリン酸化が、癌組織の臨床病理学的データと関連するかどうかを検討し、Geminin の癌化や癌の進展への関与を明らかにした。

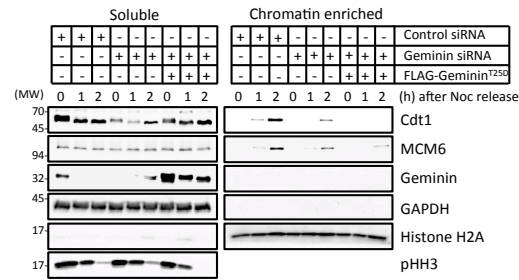
4. 研究成果

我々は、Geminin が細胞分裂期において Aurora-A により Thr25 がリン酸化され、ユビキチン分解から免れ、複製前複合体の形成に関与することを見だし、報告した。本研究では、Geminin タンパクのユビキチン分解制御の異常による過剰発現と癌化との関与を明らかにすることを目的とする。

まず、リン酸化によって安定化した Geminin の pre-RC 形成や DNA 複製に及ぼす影響を検討した。まず、分裂期特異的に Geminin を siRNA を用いてノックダウンし、pre-RC 形成への影響を検討したところ、G1 期でクロマチン分画にみられる Cdt1 タンパクの蓄積や MCM タンパクの蓄積もみられず、pre-RC 形成が阻害されていた。分裂期特異的に Geminin を siRNA を用いてノックダウンした細胞では、

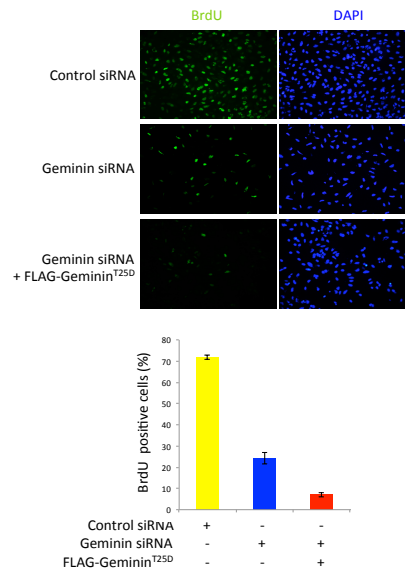
細胞分裂期でのクロマチン分画以外の分画における Cdt1 の発現が低下していた（図 1

図1. Gemininの分裂期特異的knockdown



参照)。また、Geminin の分裂期特異的リン酸化である Thr25 のリン酸化模倣型変異体である T25D を U2OS 細胞に導入し、内在性の Geminin をノックダウンさせ、pre-RC 形成への影響を検討したところ、細胞分裂期でのクロマチン分画以外の分画における Cdt1 の発現が低下はみられなかったが、G1 期で Geminin が分解されないことによる Cdt1 のクロマチンへのローディングが阻害されていた（図 2 参照）。いずれも次の S 期での BrdU の取り込みが阻害されていた（図 2 参照）。

図2. Gemininの分裂期特異的knockdownと非分解型変異体導入によるS期でのDNA複製阻害



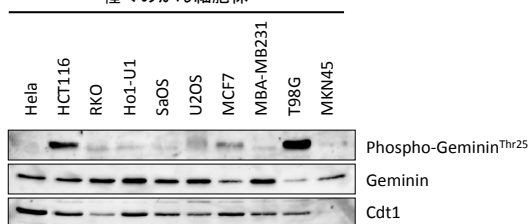
次に、G₁ 期に活性化する脱リン酸化酵素の阻害剤を用いて、網羅的に Geminin の Thr25 を脱リン酸化するフォスファターゼを調べるために、種々の脱リン酸化酵素の阻害剤を処理し、G₁ 期における Geminin の発現誘導を指標にスクリーニングした。しかしながら、Geminin の Thr25 を脱リン酸化するフォスファターゼを同定するに至らなかった。将来的に、siRNA ライブラリーやもっと多量の阻害剤を用いた解析を行うべきであると考えられた。

さらに、Geminin T25D (Thr25 を Asp に変えたリン酸化模倣型変異体) を安定性に発現する癌細胞株を作成した。Geminin を siRNA を用いて knockdown させると、DNA 複製を終えることができず、染色体数が増加し、核の

腫大と S/G2 期での細胞増殖停止がおこるため、内在性の Geminin の発現をなくすために、コンディショナルノックアウト (CKO) マウスから採取された胎児線維芽細胞を用い、Cre リコンビナーゼを発現させることで、内在性の Geminin を欠損させることを試みた。Geminin CKO マウスから採取した胎児線維芽細胞に Geminin T25D を安定性に発現させ、Cre リコンビナーゼを発現させることにより、内在性の Geminin を欠損させた Geminin 過剰発現モデルを作成した。しかしながら、時間的な制約で、その後の解析には至らなかった。今後、その細胞を用いて、細胞分裂動態異常をタイムラプス蛍光顕微鏡を用いて経時的に観察するとともに、細胞周期調節への影響をフローサイトメトリーや細胞周期マーカーの発現を調べることにより詳細に検討する予定である。さらに、これら細胞のコロニー形成能を検討し、癌化への影響を検討する予定である。

また、Geminin の過剰発現とリン酸化異常による過剰発現との関連を明らかにするため、種々のがん細胞株および採取されたがん組織から、タンパクを抽出し、Geminin の発現と Thr25 のリン酸化動態を Western blot 法により検討した。いくつかのがん細胞で高い Geminin Thr25 のリン酸化を示していたが、Geminin の発現量との相関はみられなかった (図 3 参照)。今後は、がん細胞における Thr25 のリン酸化の意義の詳細を検討したい。

図3. 種々のがん細胞株におけるGeminin Thr25のリン酸化
種々のがん細胞株



本研究では、Geminin タンパクのユビキチン分解制御異常による過剰発現と癌化との関与を検討した。Thr25 のリン酸化によって安定化した Geminin は、Cdt1 のクロマチンへのローディングを阻害することにより、G1 期における複製前複合体形成を阻害した。さらに、次の S 期における DNA 複製も阻害した。実際に、癌細胞株において、Geminin のリン酸化異常による過剰発現は認められなかったが、いくつかの癌細胞株が恒常的にリン酸化を示すことが明らかになった。Geminin の Thr25 による過剰発現がもたらす癌化機序の詳細は、本研究で作成した内在性の Geminin を欠損させた Geminin 過剰発現モデルを用いて、今後、検討したいと考えている。

以上のように、Geminin の Thr25 のリン酸化によるユビキチン分解阻害が及ぼす Geminin タンパクの過剰発現が、DNA 複製異常を介して、どのように癌化に寄与するかを検討した。

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 2 件)

1. Shimizu, N., Nakajima, N. I., Tsunematsu, T., Ogawa, I., Kawai, H., Hirayama, R., Fujimori, A., Okayasu, R., Ishimaru, N., Takata, T., Kudo, Y. (2013) Selective enhancing effect of Early mitotic inhibitor 1 depletion on the sensitivity of doxorubicin or X-ray treatment in human cancer cells. *J. Biol. Chem.* 288, 17238-17252. doi: 10.1074/jbc.M112.446351. 査読あり
2. Tsunematsu, T., Takihara, Y., Ishimaru, N., Pagano, M., Takata, T., Kudo, Y. (2013) Aurora-A controls pre-replicative complex formation and DNA replication by promoting the stabilization of geminin and Cdt1 in mitosis. *Nat. Commun.* 4, 1885. doi: 10.1038/ncomms2859. 査読あり

[学会発表] (計 7 件)

1. Chromosome passenger complex protein, Borealin is regulated by APC/C^{Cdh1} ubiquitin ligase complex, Takaaki Tsunematsu, Yasusei Kudo, Akiko Yamada, Rieko Arakaki, Naozumi Ishimaru: 第 37 回日本分子生物学会年会, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市), 2014 年 11 月 25-27 日.
2. Aurora-A controls pre-replicative complex formation and DNA replication by promoting the stabilization of geminin and CDT1 in mitosis. Yasusei Kudo, Takaaki Tsunematsu, Naozumi Ishimaru. 7th International Conference SUMO, Ubiquitin, UBL Proteins: Implications for Human Diseases, Shanghai (China), May 10-13 2014.
3. ユビキチン分解による複製前複合体形成因子 CDT1 の発現制御機構の解析. 常松貴明, 工藤保誠, 近藤智之, 黒澤実愛, 山田安希子, 新垣理恵子, 石丸直澄. 第 103 回日本病理学会総会, 広島国際会議場 (広島県・広島市), 2014 年 4 月 24-26 日.
4. Geminin regulates pre-replicative complex formation through the stabilization of CDT1 in mitosis. Yasusei Kudo, Takaaki Tsunematsu and Naozumi Ishimaru. The AACR Annual Meeting 2014, San Diego (USA), April 5-9, 2014.
5. Aurora-A controls pre-replicative complex formation and DNA replication by promoting the stabilization of geminin and CDT1 in mitosis. Yasusei Kudo, Takaaki Tsunematsu, Naozumi

Ishimaru. 第36回日本分子生物学会年会, 神戸国際会議場(兵庫県・神戸市), 2013年12月3-6日.

6. Chromosome passenger complex protein, Borealin is regulated by APC/CCdh1 ubiquitin ligase complex, Takaaki Tsunematsu, Yasusei Kudo. 第35回Naito Conference, ホテルシャトレーゼガトーキングダム札幌(北海道・札幌市), July 9-12, 2013.
7. Aurora-A controls pre-replicative complex formation and DNA replication by promoting the stabilization of geminin and Cdt1 in mitosis, Yasusei Kudo, Takaaki Tsunematsu, Naozumi Ishimaru. 第35回Naito Conference ホテルシャトレーゼガトーキングダム札幌(北海道・札幌市), July 9-12, 2013.

[図書] (計 0 件)

[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:
出願年月日:
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

工藤 保誠 (KUDO, Yasusei)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号: 50314753

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: