

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2011

課題番号：19057010

研究課題名（和文） チェックポイントとリン酸化抗体

研究課題名（英文） Check points and site- and phosphorylation state-specific antibodies

研究代表者

稲垣 昌樹 (INAGAKI MASAKI)

愛知県がんセンター（研究所）・発がん制御研究部・部長

研究者番号：30183007

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・細胞生物学

キーワード：細胞周期、細胞分裂、チェックポイント、細胞構築

1. 研究計画の概要

(1) 紫外線による DNA 障害および DNA 複製障害回復期及び細胞周期の G2 期から分裂前期において生じる Chk1 のセリン 286・301 のリン酸化反応を遂行するプロテインキナーゼの同定：DNA-PK, JNK, Cdk2, Cdk1 などの候補となるキナーゼが同部位を *in vitro* でリン酸化しうるかについて検討を行う。次に、それぞれに特異的な阻害剤や siRNA を用いて標的キナーゼの活性を抑制した際に、セリン 286・301 のリン酸化反応が減弱するかについて検討を加える。

(2) Chk1 のセリン 286・301 や他の新規同定リン酸化部位のリン酸化反応の生理的意義の解明：次に、Chk1 のセリン 286・301 や新規同定リン酸化部位のリン酸化反応がどのような Chk1 の機能変化を引き起こしているかについて検討を加える。

(3) 新規細胞周期チェックポイント機構の普遍性の証明とその分子基盤の解明：分裂酵母を用いて明らかにしてきた mRNA 品質チェックポイントが哺乳動物細胞においても存在することを確認し、この機構に関与する因子について遺伝学的手法を用いて網羅的に同定する。また、哺乳動物細胞において、Chk1 欠失により誘導されたヒストン代謝異常が細胞周期 S 期停止を引き起こすことが明らかとなったので、この分子基盤を明らかにし、ヒストン代謝と染色体安定化維持との生理学的関連を解明する。

2. 研究の進捗状況

(1) Cdk1 が Chk1 のセリン 286 およびセリン 301 をリン酸化することで Chk1 を核から細胞

質に移行させ、この Chk1 の核外排出により、細胞がより円滑に分裂期へ進行しやすくなっていることを見出した。これは、Cdk1 の活性化の際に、Chk1 との間にポジティブフィードバック機構が存在することを示唆している。これらの結果は、細胞周期進行のエンジンである Cdk1 とブレーキとなる Chk1 が緊密且つ相互的に制御されていることを示した初めての知見であり、細胞周期研究に大きな進展をもたらすことが期待される。

(2) Chk1 が DNA ダメージチェックポイントを誘導させるには、上流キナーゼである ATR によって Chk1 がセリン 317 とセリン 345 をリン酸化されて活性化するだけでなく、活性化された Chk1 がセリン 296 を自己リン酸化することが重要であることを発見した。Chk1 はセリン 296 リン酸化依存的に多機能性蛋白質 14-3-3 γ と結合し、さらに 14-3-3 γ が Chk1 の重要な基質である Cdc25A と結合することで、Cdc25A のリン酸化と蛋白質分解を引き起こし、DNA ダメージチェックポイントを誘導することを見出した。

(3) 細胞周期依存的な DNA 損傷修復機構とその制御機構を理解する目的で、DNA 損傷部位への dNTPs 供給機構を解析した。その結果、dNTPs 合成の律速酵素であるリボヌクレオチド還元酵素が Tip60 ヒストンアセチル化酵素と複合体を形成して DNA 損傷部位に集積し、G1 期に働く修復酵素群に適切な濃度の dNTPs を供給していることが明らかとなった。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している

(理由) 第 1 の目的であった Chk1 のセリン

286 およびセリン 301 のリン酸化の意義を明らかにすることができた。さらに、Chk1 のセリン 296 のリン酸化の解析も進めることができており、計画は順調に進行していると考えられる。

4. 今後の研究の推進方策

今後の研究については、当初の研究計画を予定通り行うとともに、さらなる発展を目指して、下記の点についても推進する。

(1) Chk1 の新規リン酸化部位を認識する抗リン酸化（ペプチド）抗体群の作製を精力的に推進し、それら新規のリン酸化反応の生理的意義を解明するのに役立てるとともに、その後の癌細胞におけるチェックポイント機構の異常の解析に利用する。

(2) 稲垣らは、中間径フィラメントの一種のケラチンフィラメントに結合する蛋白質のアルマトロス、トリコプレインが上皮組織の細胞間接着装置に局在し、上皮の極性形成等に重要な役割を担っていることを明らかにしている。興味深いことに、これらの分子は細胞増殖時には、中心体に局在し細胞増殖に関連する重要な機能を遂行する可能性を見出した。そこで、これらの分子が中心体において細胞周期関連分子と相互作用する可能性を中心に検討する。

5. 代表的な研究成果

（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 13 件）

- ① Kasahara, K., Goto, H., Enomoto, M., Tomono, Y., Kiyono, T. and Inagaki, M. 14-3-3 γ mediates Cdc25A proteolysis to induce S and G2 arrest after DNA damage. EMBO J. in press. (査読有り)
- ② Enomoto, M., Goto, H., Tomono, Y., Kasahara, K., Tsujimura, K., Kiyono, T. and Inagaki, M. Novel positive feedback loop between Cdk1 and Chk1 in the nucleus during the G2/M transition. J. Biol. Chem. 284: 34223-34230, 2009. (査読有り)
- ③ Sugimoto, M., Inoko, A., Shiromizu, T., Nakayama, M., Zou, P., Yonemura, S., Hayashi, Y., Izawa, I., Sasoh, M., Uji, Y., Kaibuchi, K., Kiyono, T. and Inagaki, M. The keratin-binding protein Albatross regulates polarization of epithelial cells. J. Cell Biol. 183: 19-28, 2008. (査読有り)
- ④ Goto, H. and Inagaki, M. Production of a site- and phosphorylation state-specific antibody. Nat. Protoc. 2: 2574-2581, 2007. (査読有り)

〔学会発表〕（計 50 件）

- ① Inagaki, M.: Anti-phospho peptide antibodies - a tool to address the regulatory function of intermediate filaments and cell cycle progression in astrocytes. the 6th European Conference on Intermediate Filaments (Nanofilaments) in Health and Disease, 2009, (Sweden)

〔図書〕（計 3 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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕