

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 5 月 7 日現在

機関番号：83901

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）Checkpoint analyses using anti-phosphoepitope-specific antibody

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

研究成果の概要（和文）：Chk1 は、DNA 保全チェックポイントの中核をなすタンパク質リン酸化酵素（キナーゼ）である。Chk1 は、その調節領域のリン酸化修飾によって、その機能が制御されていることが知られているが、ATR からのリン酸化修飾による機能変化以外はあまり解析されてこなかった。本研究にて、我々は、Chk1 の新規リン酸化修飾の生理機能を解明するとともに、細胞が増殖休止状態（G0 期）から増殖周期（G1 期）に移行する際の Chk1 の細胞機能の一端を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Chk1 is a protein kinase implicated in DNA maintenance checkpoint. Chk1 function is regulated through the phosphorylation of its regulatory domain. However, only ATR was long believed to functionally regulate Chk1. In this study, we have demonstrated that a variety of protein kinases phosphorylate and thereby regulate Chk1. In addition, we have also shown novel Chk1 function at the G0/G1 transition.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	28,500,000	0	28,500,000
2008 年度	28,500,000	0	28,500,000
2009 年度	37,500,000	0	37,500,000
2010 年度	36,500,000	0	36,500,000
2011 年度	32,500,000	0	32,500,000
総計	163,500,000	0	163,500,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：Chk1、チェックポイント、リン酸化修飾、中心体、G0/G1 移行、トリコプレイン

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は、紫外線や電離放射線等により DNA に障害が生じたり、S 期（DNA 合成期）に DNA の複製が障害されたりすると、そのチェックポイント機構を活性化させる。この機構によって、細胞は DNA の障害を修復するとともに、その障害が除去されるまで次の細胞周期に進行しないようにしている。このようなチェックポイント機構に障害が生じると、細胞に

染色体（または、ゲノム）の不安定性が引き起こされ、がん化すると考えられている。これらチェックポイント機構の中心には、ATR から Chk1 に連なるシグナル伝達経路が存在する。Chk1 は、紫外線による DNA 障害や DNA の複製障害の際に、ATR によって、そのセリン 317 およびセリン 345 がリン酸化され、活性化する。しかし、Chk1 は ATR 以外のキナーゼによってリン酸化されることが報告され

始めてきていたが、その生理的意義は不明な点が多かった。

また、Chk1は、細胞周期制御を行う際、核で主に機能するのか、それとも、中心体でも何らかの役割をもっているのかについて、激しい論争があった。

さらに、Chk1は、主にS期からG2/M移行期に働くチェックポイント分子と位置づけられていたが、細胞が増殖休止状態(G0期と呼ぶ研究者もいる)から増殖周期(G1期)に移行する際の挙動などについては多くは判明していなかった。

Chk1に限らず、細胞が増殖休止状態(G0期)から増殖周期(G1期)に移行するがどのような分子メカニズムで引き起こされるのかについては、多くがわかっていないのが現状であった。

## 2. 研究の目的

本研究は、未だ、解明されていない(ATR以外のキナーゼによる)Chk1のリン酸化修飾の生理的意義を解明することを第一の目的とする。また、Chk1が、どの細胞内小器官(核、中心体など)で機能しているか、細胞が増殖休止状態(G0期)から増殖周期(G1期)に移行する際にどのような挙動を取るのかについても解析する。

さらに、これまであまり解明されてこなかった細胞が増殖休止状態(G0期)から増殖周期(G1期)に移行する際の分子機構に焦点をあてて、新規の分子機構を明らかにすることを第二の目的とする。

## 3. 研究の方法

以下に、主な解析方法を簡略に述べる。

### (1) Chk1の新規リン酸化部位に対する抗リン酸化抗体を用いたリン酸化修飾の時空間的解析

リン酸化ペプチドを用いて、部位およびリン酸化状態を特異的に認識する抗リン酸化抗体を作製した(文献18を参照)。その抗リン酸化抗体を用いて、目的部位のリン酸化反応を時空間的に解析した。

### (2) リン酸化部位に変異を加えたChk1をドキシサイクリン依存性に発現する細胞株(Tet-On細胞株)の樹立

Chk1の野生型(コントロール)およびChk1のリン酸化部位を(リン酸化修飾を受けない)アラニンや(リン酸化修飾を模倣する)アスパラギン酸/グルタミン酸に置換した変異体を発現するTet-On細胞株を作製した。また、必要に応じて、核内移行シグナルや中心体局在化シグナルを付加した変異体発現細胞株も作製した。樹立細胞株は、ドキシサイクリン誘導性に目的タンパク質が発現される。

### (3) 上記細胞を用いた機能解析

上記細胞株を用いて、以下の解析を行った。必要に応じて、外来性のChk1を誘導発現したのちに、内在性のChk1をノックダウンし、外来性Chk1への入れ替えを行った。

### a) Chk1のキナーゼ活性の変化

このリン酸化修飾がChk1のキナーゼ活性を亢進、または、抑制している可能性について探求した。具体的には、上記細胞株を用い、各変異体を免疫沈降し、Chk1のキナーゼ活性を野生型のものと比較検討した。

### b) Chk1の細胞内局在の変化

上記細胞株を用い、各変異体の細胞内局在を比較検討した。必要に応じて、紫外線照射や(DNA複製阻害剤やDNA損傷性薬剤などの)薬剤処理を行ってから、解析した。

### c) チェックポイント応答における重要性の解析

上記細胞株を用い、紫外線照射や(DNA複製阻害剤やDNA損傷性薬剤などの)薬剤処理に対するチェックポイント応答を主に細胞周期の停止の有無にて評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 分裂期におけるChk1のSer286・301のリン酸化修飾の生理的意義

我々は、以前、Cdk1が分裂期においてChk1のSer286・301をリン酸化していることを報告していたが、その生理的意義は不明であった。本研究にて、Chk1が分裂前期(prophase)において核内から細胞質に放出されること、この核外移行がCrm-1依存性に引き起こされることを見出した。この核外移行がCdk1によるChk1-Ser286・301のリン酸化反応依存性であり、この核外排出過程が障害されると、分裂期への移行が遅延することが判明した。これらの結果は、Cdk1とChk1の間にはポジティブフィードバック機構が存在し、この機構の活性化が分裂期への円滑な移行に重要な役割を担っていることを示唆するものといえる(文献11)。

### (2) Chk1の細胞内局在の重要性

Chk1は、核で機能する分子と考えられ、チェックポイント応答時には核内に強く集積することが知られている。しかし、他の研究グループより、Chk1は中心体にも局在し、細胞周期進行を負に制御しているという報告がなされていた。この報告の根拠となった観察は、最も汎用されている抗Chk1抗体(クローン名DCS310)を用いて細胞染色すると、中心体に反応性が認められることであった。そこで、我々は、この中心体シグナルがChk1を本当に反映しているかを検討した。その結果、DCS310の中心体染色は、Chk1ではなく、CCDC1151という機能未同定の中心体蛋白質を反映していることが判明した。さらに、Chk1に核移行シ

グナルを付加して強制的に核に集積させると、細胞周期進行が負に抑制させるにも関わらず、Chk1に中心体局在シグナルを付加しても細胞周期の進行に大きな影響をもたらさないことが判明した。以上の結果は、Chk1は核内で細胞周期進行を負に制御しており、その抑制シグナルはChk1以外の分子を介在して中心体に伝播されることが判明した（文献6）。

### (3) Chk1のSer296の自己リン酸化反応のチェックポイント応答における重要性

我々は、DNA 障害チェックポイントの際に引き起こされる Chk1 の Ser296 のリン酸化反応について検討を加えた。阻害剤等を用いた解析から、この Ser296 のリン酸化反応は、ATR による Chk1 の Ser317/345 のリン酸化反応依存性に引き起こされるものの、ATR ではなく Chk1 そのものがそのリン酸化反応を遂行していることが明らかになった。また、14-3-3 $\gamma$  がこの Ser296 の自己リン酸化反応依存性に結合することが明らかになった。Ser296 をアラニンに変換した Chk1 変異体を内在性の Chk1 と置換したり、14-3-3 $\gamma$  をノックダウンしたりした細胞では、紫外線照射後においても、Cdc25A のユビキチン化および分解が抑制され、かつ、細胞周期の停止機構に障害が認められた。さらに、(Cdc25A と 14-3-3 の結合に必要な) Cdc25A の Thr507 は Chk1 のリン酸化 Ser296 および 14-3-3 $\gamma$  非依存性にリン酸化されるのに対して、(Cdc25A のユビキチン化反応を制御している) Cdc25A-Ser76 のリン酸化反応はこれら 2 つの因子に依存性に引き起こされることが判明した。以上の結果から、Chk1 の自己リン酸化反応は、Chk1/14-3-3 $\gamma$ /Cdc25A との 3 者複合体の形成を通じて、Chk1 による Cdc25A の Ser76 のリン酸化反応を制御し、Cdc25A のユビキチン化および分解反応を調節していることが明らかになった（文献10）。

### (4) 増殖因子刺激の際に引き起こされる Chk1 の Ser280 のリン酸化修飾の生理的意義

我々は、血清（増殖因子）刺激によって、Chk1 の Ser280 が特異的にリン酸化されることを見出した。このリン酸化量の増加は、MAP キナーゼカスケード（Ras - Raf - MEK - ERK - p90RSK）の活性化に伴って引き起こされ、U0126（MEK 阻害剤）または BI-D1870（p90RSK 阻害剤）処理や RSK1/2 に特異的な siRNA 処理にて減弱することが明らかとなった。In vitro における解析で、p90RSK は Chk1 を効率よくリン酸化すること、および、Chk1-Ser280 は p90RSK のほぼ唯一のリン酸化部位であることが判明した。また、Chk1 は、この Ser280 のリン酸化修飾に伴い、細胞質から核に移行することが明らかになった。さらに、この Chk1 の核内集積により、細胞周期（特に、G1 期）進行の際のチェックポイン

ト応答を円滑していることが判明した。以上の結果は、増殖刺激応答に呼応して Chk1 が核内集積することで、その後の細胞周期進行に伴い、発生しうる DNA 障害に対応していることを示唆している（文献2）。

### (5) ケラチン結合蛋白質トリコプレインの一次絨毛の抑制を介した細胞周期（G1 期）進行の制御

我々は、新たに、ケラチン結合蛋白質トリコプレインが、ninein、Odf2 との結合によって、微小管の母中心小体の appendages へのアンカリングに関与していることを見出した（文献4）。また、トリコプレインが分裂期キナーゼの一つである Aurora-A と結合し、Aurora-A を分裂期（M 期）ではなく G1 期特異的に活性化していることを解明した。トリコプレインが G1 期特異的に Aurora-A を中心小体（基底小体）で活性化することによって、一次絨毛の形成を抑制していることが判明した。このトリコプレインおよび Aurora-A 依存的な一次絨毛の抑制が G1 期の進行に不可欠な役割を果たしていることを明らかにした（文献1）。

計画当初は、Chk1 が機能している G2/M 期チェックポイントや S 期チェックポイントを想定し、研究を進め、(1) - (3) の研究成果を挙げる事ができた。これら計画当初予定していた研究を遂行する中で、計画当初に予定していなかった G1 期進行における新規制御機構を明らかにするという ((4) および (5) の) 研究成果を得ることができた。

細胞周期研究における大きな残された問題として、中心体と核のサイクルの一致がどのようになされているかが残されている。その点で、核内で発せられた Chk1 によるチェックポイントシグナルが何を介して中心体に伝播されるのかというのは大きな問題として残されている。また、(高等生物にしか存在しない) 一次絨毛と細胞周期の関係については、まだ、よくわかっていないことが多く、今後の検討課題といえる。我々が見出した G1 期進行に絡む分子群の結合蛋白質などを探ることで、上記の問題を今後少しでも解決していきたいと考えている。

## 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は下線)

[雑誌論文] (計 20 件)

1. Inoko, A., Matsuyama, M., Goto, H., Ohmuro-Matsuyama, Y., Hayashi, Y., Enomoto, M., Ibi, M., Urano, T., Yonemura, S., Kiyono, T., Izawa, I. and Inagaki, M. Trichoplein and

- Aurora A block aberrant primary cilia assembly in proliferating cells. *J. Cell Biol.* 197: 391-405, 2012. (査読有) (doi:10.1083/jcb.201106101)
2. Li, P., Goto, H., Kasahara, K., Matsuyama, M., Wang, Z., Yatabe, Y., Kiyono, T. and Inagaki, M. P90 RSK arranges Chk1 in the nucleus for monitoring of genomic integrity during cell proliferation. *Mol. Biol. Cell* 23: 1582-1592, 2012. (査読有) (doi:10.1091/mbc.E11-10-0883)
  3. Goto, H., Izawa, I., Li, P. and Inagaki, M. Novel regulation of checkpoint kinase 1: Is checkpoint kinase 1 a good candidate for anti-cancer therapy? *Cancer Sci.* in press. (査読有) (doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02280.x.)
  4. Ibi, M., Zou, P., Inoko, A., Shiromizu, T., Matsuyama, M., Hayashi, Y., Enomoto, M., Mori, D., Hirotsune, S., Kiyono, T., Tsukita, S., Goto, H. and Inagaki, M. Trichoplein controls microtubule anchoring at the centrosome by binding to Odf2 and ninein. *J. Cell Sci.* 124: 857-864, 2011. (査読有) (doi:10.1242/jcs.075705)
  5. Helfand, B.T., Mendez, M.G., Murthy, S.N., Shumaker, D.K., Grin, B., Mahammad, S., Aebi, U., Wedig, T., Wu, Y.I., Hahn, K.M., Inagaki, M., Herrmann, H. and Goldman, R.D. Vimentin organization modulates the formation of lamellipodia. *Mol. Biol. Cell* 22: 1274-1289, 2011. (査読有) (doi:10.1091/mbc.E10-08-0699)
  6. Matsuyama, M., Goto, H., Kasahara, K., Kawakami, Y., Nakanishi, M., Kiyono, T., Goshima, N. and Inagaki, M. Nuclear Chk1 prevents premature mitotic entry. *J. Cell Sci.* 124: 2113-2119, 2011. (査読有) (doi:10.1242/jcs.086488)
  7. Ichijima, Y., Yoshioka, K., Yoshioka, Y., Shinohe, K., Fujimori, H., Unno, J., Takagi, M., Goto, H., Inagaki, M., Mizutani, S. and Teraoka, H. DNA lesions induced by replication stress trigger mitotic aberration and tetraploidy development. *PLoS ONE* 5: e8821, 2010. (査読有) (doi:10.1371/journal.pone.0008821)
  8. Bargagna-Mohan, P., Paranthan, R.R., Hamza, A., Dimova, N., Trucchi, B., Srinivasan, C., Elliott, G.I., Zhan, C.G., Lau, D.L., Zhu, H., Kasahara, K., Inagaki, M., Cambi, F. and Mohan, R. Withaferin A targets intermediate filaments glial fibrillary acidic protein and vimentin in a model of retinal gliosis. *J. Biol. Chem.* 285:7657-7669, 2010. (査読有) (doi:10.1074/jbc.M109.093765)
  9. Kawase, T., Matsuo, K., Suzuki, T., Hirose, K., Hosono, S., Watanabe, M., Inagaki, M., Iwata, H., Tanaka, H. and Tajima, K. Association between vitamin D and calcium intake and breast cancer risk according to menopausal status and receptor status in Japan. *Cancer Sci.* 101: 1234-1240, 2010. (査読有) (doi:10.1111/j.1349-7006.2010.01496.x)
  10. Kasahara, K., Goto, H., Enomoto, M., Tomono, Y., Kiyono, T. and Inagaki, M. 14-3-3 $\gamma$  mediates Cdc25A proteolysis to block premature mitotic entry after DNA damage. *EMBO J.* 29: 2802-2812, 2010. (査読有) (doi:10.1038/emboj.2010.157)
  11. 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) (doi:10.1074/jbc.C109.051540)
  12. Li, Z.F., Wu, X., Jiang, Y., Liu, J., Wu, C., Inagaki, M., Izawa, I., Mizisin, A.P., Engvall, E. and Shelton, G.D. Non-pathogenic protein aggregates in skeletal muscle in MLF1 transgenic mice. *J. Neurol. Sci.* 264: 77-86, 2008. (査読有) (doi.org/10.1016/j.jns.2007.07.027)
  13. Toyooka, K., Mori, D., Yano, Y., Shiota, M., Iwao, H., Goto, H., Inagaki, M., Hiraiwa, N., Muramatsu, M., Wynshaw-Boris, A., Yoshiki, A. and Hirotsune, S. Protein phosphatase 4 catalytic subunit regulates Cdk1 activity and microtubule organization via NDEL1 dephosphorylation. *J. Cell Biol.* 180: 1133-1147, 2008. (査読有) (doi:10.1083/jcb.200705148)
  14. Izawa, I., Nishizawa, M., Hayashi, Y. and Inagaki, M. Palmitoylation of ERBIN is required for its plasma membrane localization. *Genes Cells* 13: 691-701, 2008. (査読有) (doi:10.1111/j.1365-2443.2008.01198.x)
  15. Lin, Y.M., Chen, Y.R., Lin, J.R., Wang, W.J., Inoko, A., Inagaki, M., Wu, Y.C. and Chen, R.H. eIF3k regulates apoptosis in epithelial cells by releasing caspase 3 from keratin-containing inclusions. *J. Cell Sci.* 121: 2382-2393, 2008. (査読有) (doi:10.1242/jcs.021394)
  16. 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) (doi:10.1083/jcb.200803133)
  17. Ikegami, Y., Goto, H., Kiyono, T., Enomoto, M., Kasahara, K., Tomono, Y., Tozawa, K., Morita, A., Kohri, K. and Inagaki, M. Chk1 phosphorylation at Ser286 and Ser301 occurs with both

- stalled DNA replication and damage checkpoint stimulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 1227-1231, 2008. (査読有) (doi:org/10.1016/j.bbrc.2008.10.119)
18. Goto, H. and Inagaki, M. Production of a site- and phosphorylation state-specific antibody. *Nat. Protoc.* 2: 2574-2581, 2007. (査読有) (doi:10.1038/nprot.2007.374)
  19. Sihag, R. K., Inagaki, M., Yamaguchi, T., Shea, T. B. and Pant, H. C. Role of phosphorylation on the structural dynamics and function of types III and IV intermediate filaments. *Exp. Cell Res.* 313: 2098-2109, 2007. (査読有) (doi:org/10.1016/j.yexcr.2007.04.010)
  20. Tsuno, T., Natsume, A., Katsumata, S., Mizuno, M., Fujita, M., Osawa, H., Nakahara, N., Wakabayashi, T., Satoh, Y., Inagaki, M. and Yoshida, J. Inhibition of Aurora-B function increases formation of multinucleated cells in p53 gene deficient cells and enhances anti-tumor effect of temozolomide in human glioma cells. *J. Neurooncol.* 83: 249-258, 2007. (査読有) (doi:10.1007/s11060-007-9335-1)

[学会発表] (計5件)

1. Inagaki, M.: Novel regulatory mechanism of Plk1 at mitosis. MEXT Priority Research Project International Symposium "Cell Division", Hakone, 2011.6.29.
2. 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, Sweden. 2009.6.20.
3. Inagaki, M.: Signaling and cell architecture. Receptor Program Ad Hoc Seminar, Turku, 2009.6.15.
4. Inagaki, M.: Cell cycle and architecture. Regulation and Manipulation of Information Flow within Dynamic Protein and Lipid Environments (SFB 645 Workshop Cell Architecture and Cell Signalling), Bonn, 2009.6.12.
5. Inagaki, M.: Trichoplein regulates microtubule anchoring and suppresses a cilia assembly program at the mother centriole. Global Center of Excellence (COE) Program 1st International Symposium "Signaling of Cancer Cells", Nagoya, 2009.1.23.

[図書] (計10件)

1. Ohmuro-Matsuyama, Y., Inagaki M. and Ueda, H. Detection of Protein Phosphorylation by Open-Sandwich Immunoassay. *Integrative Proteomics.*

- ed. Leung, H.-C.E. 197-214, (2012) InTech (ISBN 978-953-51-0070-6)
2. 衣斐美歩, 稲垣昌樹: 「中間径フィラメント」生化学事典 朝倉書店 in press
3. 後藤英仁, 稲垣昌樹: 「チェックポイントキナーゼ1 (Chk1) の新規制御機構とがん」シグナル伝達研究最前線 2012 実験医学増刊 Vol.30-NO.5 106-110 (2012) 井上純一郎, 武川睦寛, 徳川文稔, 今井浩三 (編集) 羊土社
4. 佐方功幸, 稲垣昌樹, 岸本健雄 (編) 細胞周期フロンティア 総 268 ページ, (2010) 共立出版
5. 後藤英仁, 稲垣昌樹: 「G2/M 移行期における CDK1 の活性化およびチェックポイント解除機構」細胞周期フロンティア 52-57 (2010) 共立出版
6. 笠原広介, 稲垣昌樹: 「抗リン酸化ペプチド抗体と細胞周期研究」細胞周期フロンティア 5-10 (2010) 共立出版
7. 稲垣昌樹, 佐方功幸: 「細胞周期研究の現状と展望」細胞周期フロンティア 248-250 (2010) 共立出版
8. 大室 (松山) 有紀, 稲垣昌樹: リン酸化抗体と細胞周期 細胞工学 Vol.28 No.1 50-51 (2009) 秀潤社
9. 後藤英仁, 稲垣昌樹: Close UP 実験法 特定部位の翻訳後修飾を特異的に認識する. 抗体作製法-抗リン酸化 (ペプチド) 抗体作製法, 実験医学, 26 巻, 18 号, 2965-2972, (2008) 羊土社
10. 後藤英仁, 稲垣昌樹: リン酸化-特異蛋白質修飾- 分子細胞治療, 6 巻, 1 号, 4-9 (2007) 先端医学社

[その他]

ホームページ等

[http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/08hatsugan\\_seigyoy/index.html](http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/08hatsugan_seigyoy/index.html)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

中西 真 (NAKANISHI MAKOTO)

名古屋市立大学・医学 (系) 研究科 (研究院)・教授

研究者番号: 40217774

(H19年~H22年)