

平成21年 4月17日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390083
 研究課題名（和文） 細胞周期におけるセンサー型転写因子の制御機構
 研究課題名（英文） The regulatory mechanism of sensor-type transcription factor during mitosis
 研究代表者
 浦野 健（URANO TAKESHI）
 島根大学・医学部・教授
 研究者番号：70293701

研究成果の概要：細胞分裂期の染色体分配など複雑な物理的ストレスをがん細胞が回避する機構を解明する端緒として、様々なストレスに反応する転写因子である **p53** およびその下流の実働分子である **p21/WAF1** が細胞分裂期に **Aurora** によりリン酸化され、それらの機能が細胞分裂期特異的に不活性化されていることを見出した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,500,000	0	6,500,000
2007年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	13,400,000	2,070,000	15,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：分裂期キナーゼ、Aurora、p53、リン酸化モノクローナル抗体

1. 研究開始当初の背景

細胞周期には多くのチェックポイント機構があります。この詳細な分子基盤も明らかとなりつつあります。しかしこれらの機構は異常が発生した時に遺伝情報が間違っって伝わらないようにするために作動するものであり、ここで問題としている正常細胞でもおこる物理的ストレスの感知とは異なるものです。染色体数に異常のあることが多いがん細胞では正常細胞とは比較にならないほど物理的ストレスがかかっているはずですが、この疑問に対する答えはまだ得られていませんでした。

2. 研究の目的

本研究では、転写が行われる細胞の染色体上を”場”，リン酸化および脱リン酸化を”制御情報”として、**p53** による誘導タンパク質、細胞周期停止またはがん細胞の細胞死を”アウトプット”と考え、がん細胞における染色体動態に伴う物理的ストレス回避の分子機構の本態の解明により、がんの新たな理解を目指し、さらにその分子構造を破壊することでがん細胞特異的な標的治療への応用を追求することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) **p53** と **Aurora** ファミリー (-A, -B およ

び-C) との結合について：

- ・ p53 を有しない H1299 細胞株を用いた強発現系において両者の結合を確認した。

(2) Aurora による p53 および p21/WAF1 のリン酸化：

- ・ バキュロウイルス/昆虫細胞発現系を用いてヒト全長 p53 および p21/WAF1 を精製した。

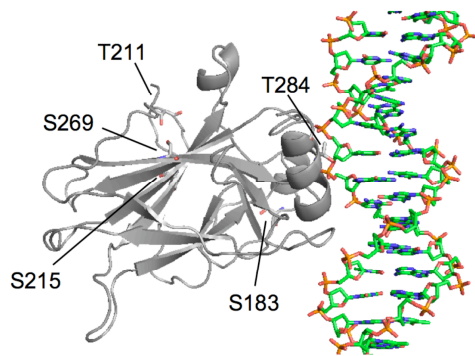
- ・ p53 および p21/WAF1 が Aurora の非常に良い基質になることを *in vitro* キナーゼアッセイにより確認した。

- ・ ヒト p53 における Aurora のリン酸化コンセンサス配列 (R-X-S/T) を検索したところ 5 つ存在し、すべて p53 の DNA 結合領域に集中していた (下図参照)。

▼Ser215 - 種を超えて保存されている。

▼Thr284 - ニワトリの p53 には保存されていない。

しかし構造解析の結果この部位は DNA と直接接しており、リン酸化により解離することが示唆された。



上図説明：

p53DNA 結合領域(左)と DNA(右)との複合体構造

解析を行い、Aurora による p53 のリン酸化予想部位を示した。

- ・ S215A あるいは T284E の変異を導入した全長 p53 をバキュロウイルス/昆虫細胞発現系を用いて精製した。この変異型 p53 を基質とした *in vitro* キナーゼアッセイにより Ser215 および Thr284 が実際リン酸化されることを確認した。

(3) Aurora によるリン酸化予想部位に変異を導入した p53 の転写活性能の検討：

myc タグを付加した全長 p53cDNA を用いて、p53 を有しない H1299 細胞に強制発現させ、p21/WAF1 の発現をイムノブロットにより観察した。リン酸化を模倣した Asp または Glu 変異を導入した p53 では p21/WAF1 の発現誘導を認めなかった。

4. 研究成果

がんの新たな理解を目指した本研究により、がん細胞における染色体動態に伴う物理的ストレス回避の分子機構が明らかとなり、さらにその分子構造を破壊することでがん細胞特異的な標的治療への応用が可能になることが明確になった。

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 17 件)

- ① Shimada A, Dohke K, Sadaie M, Shimmyozu K, Nakayama J, Urano T and Murakami Y.: Phosphorylation of Swi6/HP1 regulates transcriptional gene silencing at heterochromatin. **Genes Dev.** 23: 18-23, 2009、査読有
- ② Terashima M, Takahashi M, Shimoyama M, Tanigawa Y, Urano T and Tsuchiya M.: Glycosylphosphatidylinositol-anchored arginine-specific ADP-ribosyltransferase7.1 (Art7.1) on chicken B cells: the possible role of Art7 in B cell receptor signalling and proliferation. **Mol Cell Biochem.** 320: 470-478, 2009、査読有
- ③ Kondo Y, Shen L, Cheng AS, Ahmed S, Boumber Y, Charo C, Yamochi T, Urano T, Furukawa K, Kwabi-Addo B, Gold DL, Sekido Y, Huang TH and Issa JP.: Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. **Nature Genet.** 40: 741-750, 2008、査読有
- ④ Folco HD, Pidoux AL, Urano T, and Allshire RC.: Heterochromatin and RNAi Are Required to Establish CENP-A Chromatin at Centromeres. **Science** 319, 94-97, 2008、査読有
- ⑤ Shimada M, Yamada-Namikawa C, Murakami-Tonami Y, Yoshida T, Nakanishi M, Urano T, and Murakami H.: Cdc2p controls the forkhead transcription factor Fkh2p by phosphorylation during sexual differentiation in fission yeast. **EMBO J.** 27: 132-142, 2008、査読有
- ⑥ Dohke K, Miyazaki S, Tanaka K, Urano T, Grewal SI and Murakami Y.: Fission yeast chromatin assembly factor 1 assists in the replication-coupled maintenance of heterochromatin. **Genes Cells.** 13:1027-1043, 2008、査読有
- ⑦ Trewick SC, Minc E, Antonelli R, Urano T, and Allshire RC.: The JmjC domain protein Epe1 prevents unregulated assembly and disassembly of heterochromatin. **EMBO J.**

- 26, 4670-4682, 2007、査読有
- ⑧ Nishikawa N, Toyota M, Suzuki H, Honma T, Fujikane T, Ohmura T, Nishidate T, Ohe-Toyota M, Maruyama R, Sonoda T, Sasaki Y, **Urano T**, Imai K, Hirata K, and Tokino T.: Gene amplification and overexpression of PRDM14 in breast cancers. **Cancer Res.** 67:9649-9657, 2007、査読有
- ⑨ Takemoto A, Murayama A, Katano M, **Urano T**, Furukawa K, Yokoyama S, Yanagisawa J, Hanaoka F and Kimura K.: Analysis of the role of Aurora B on the chromosomal targeting of condensin I. **Nucleic Acids Res.** 35:2403-2412, 2007、査読有
- ⑩ Yamasaki-Ishizaki Y, Kayashima T, Mapendano CK, Soejima H, Ohta T, Masuzaki H, Kinoshita A, **Urano T**, Yoshiura KI, Matsumoto N, Ishimaru T, Mukai T, Niikawa N and Kishino T.: Role of DNA methylation and histone H3 Lysine 27 methylation in tissue-specific imprinting of mouse Grb10. **Mol. Cell. Biol.** 27:732-742, 2007、査読有
- ⑪ Nakashima H, Hamamura K, Houjou T, Taguchi R, Yamamoto N, Mitsudo K, Tohnai I, Ueda M, **Urano T**, Furukawa K, Furukawa K.: Overexpression of caveolin-1 in a human melanoma cell line results in dispersion of ganglioside GD3 from lipid rafts and alteration of leading edges, leading to attenuation of malignant properties. **Cancer Sci.** 98:512-520, 2007、査読有
- ⑫ Ohashi S, Sakashita G, Ban R, Nagasawa M, Matsuzaki H, Murata Y, Taniguchi H, Shima H, Furukawa K and **Urano T**.: Phospho-regulation of human Protein Kinase Aurora-A: Analysis using anti-phospho-Thr288 monoclonal antibodies. **Oncogene** 25:7691-7702, 2006、査読有
- ⑬ Goto H, Kiyono T, Tomono Y, Kawajiri A, **Urano T**, Furukawa K, Nigg EA and Inagaki M.: Complex formation of Plk1 and INCENP required for metaphase-anaphase transition. **Nature Cell Biol.** 8:180-187, 2006、査読有
- ⑭ Naoe T, Suzuki T, Kiyoi H and **Urano T**.: Nucleophosmin (NPM): A versatile molecule associated with hematological malignancies. **Cancer Sci.** 97: 963-969, 2006 (Review) 、査読無
- ⑮ Nakano S, Murakami K, Meguro M, Soejima H, Higashimoto K, **Urano T**, Kugoh H, Mukai T, Ikeguchi M and

Oshimura M.: Expression profile of LIT1/KCNQ1OT1 and epigenetic status at the KvDMR1 in colorectal cancers. **Cancer Sci.** 97:1147-1154, 2006、査読有

- ⑯ Okuda T, Tokuda N, Numata S, Ito M, Ohta M, Kawamura K, Wiels J, **Urano T**, Tajima O, Furukawa K and Furukawa K.: Targeted disruption of Gb3/CD77 synthase gene resulted in the complete deletion of globo-series glycosphingolipids and loss of sensitivity to verotoxins. **J. Biol. Chem.**, 281:10230-10235, 2006、査読有
- ⑰ Zhang Q, Furukawa K, Chen HH, Sakakibara T, **Urano T** and Furukawa K.: Metastatic potential of mouse Lewis lung cancer cells is regulated via ganglioside GM1 by modulating the matrix metalloprotease-9 localization in lipid rafts. **J. Biol. Chem.**, 281:18145-18155, 2006、査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① Reiko Ban and **Takeshi Urano** Calcium/Calmodulin Binds to and Inhibits Aurora-A Kinase Activity at Anaphase. 48th ASCB 12/14, 2008 San Francisco (USA)
- ② 浦野 健、細胞周期を制御する分裂期キナーゼ Aurora、第 16 回日本アポトーシス研究会、2007 年 8 月 4 日、千葉 (招待講演)

[図書] (計 1 件)

- ① 浦野 健、細胞周期集中マスター 北川雅敏編、-レビュー編第 1 章細胞周期を制御するリン酸化酵素-、pp48-62、株式会社羊土社、東京、2006 年 6 月

[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]
ホームページ等
<http://www.med.shimane-u.ac.jp/biochem2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浦野 健 (URANO TAKESHI)
島根大学・医学部・教授
研究者番号：70293701

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：