

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16367

研究課題名(和文) ストレスメディエーターClaspinによるストレス反応の統合的な制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the integrated control mechanism of stress response by stress mediator Claspin

研究代表者

楊 其駿 (YANG, Chi-Chun)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・研究員

研究者番号：80792647

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Claspinが血清飢餓、酸化、浸透圧、低酸素、温度変化、細菌感染、核小体ストレス、小胞体ストレスなどの生体ストレスに対する細胞応答における役割を解明し、これらのストレス応答と複製ストレス応答経路の相互作用を明らかにする。Claspinが、種々の生体ストレスによるChk1の活性化に重要な役割を果たすことを見出した。特に高温に対する反応では、ISR特にGCN2キナーゼがClaspin-Chk1の活性化制御に重要な働きを示す。また、血清飢餓からの成長再開時のPI3K-PDK1-mTORの活性化におけるClaspinの新しい役割を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この発見は新規性が高く、今後独創的な研究が期待される。Claspinを介したストレス応答機構の詳細な解析により、種々のストレスに対して細胞が異なる細胞応答反応を連動させ、細胞の増殖・生存を統合的・協調的に制御するメカニズムが解明され、ストレス応答分子機構の中枢を担う新規原理の発見につながることを期待される。本研究の成果は、細胞のストレス応答反応に新しい概念をもたらすであろう。

研究成果の概要(英文)：In this study, we elucidates the role of Claspin in the cellular response to biological stresses such as serum starvation, oxidation, osmotic pressure, hypoxia, temperature changes, bacterial infections, nucleous stress, and ER stress. And clarify the interaction between these stress responses and replication stress response pathways. We found that Claspin plays an important role in the activation of Chk1 by various biological stresses. Especially in the reaction to high temperature, ISR, especially GCN2 kinase, shows an important role in controlling the activation of Claspin-Chk1. We also identified a new role for Claspin in the activation of PI3K-PDK1-mTOR during growth resumption from serum starvation.

研究分野：分子生物学

キーワード：Claspin serum stimulation PI3 kinase PDK1 mTOR ISR

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本研究のグループは、ClaspinはCdc7キナーゼと相互作用すること、さらにCdc7によりリン酸化されることを見出した(Kim et al 2008)。その後、ClaspinはCdc7に特異的に結合する酸性アミノ酸ドメイン(AP: acidic patch)を有し、これを介してCdc7を呼び込み、基質であるMcmのリン酸化を促進することを見出した(Yang et al 2016)。さらに、Claspin上のChk1キナーゼ結合部位(CKBD)はCdc7によりリン酸化され、このリン酸化に依存してChk1が結合することを見出した(Yang et al 2019)。このようにClaspinはCdc7キナーゼと密接に機能的にリンクして複製の開始進行を制御し、複製ストレスに対する応答をセンサーとエフェクターの間で仲介する。しかし、複製ストレス以外のストレスに対してClaspinが何らかの機能を果たすかどうかは明らかでなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、Claspinが血清飢餓、酸化、浸透圧、低酸素、温度変化、細菌感染、核小体ストレス、小胞体ストレスなどの生体ストレスに対する細胞応答における役割を解明し、これらのストレス応答と複製ストレス応答経路の相互作用を明らかにする。

### 3. 研究の方法

- (1) 樹立したClaspinノックアウト誘導可能なマウス胎児線維芽(Claspin KO MEF)細胞を使用して、Claspin欠損時の種々の生体ストレスに対する表現型を詳細に解析する。
- (2) 種々の生体ストレスが複製ストレス経路に及ぼす影響を解析する。
- (3) Claspinの種々の欠失・点変異体を用い、それぞれの生体ストレス経路の制御因子とClaspinの相互作用を解析する。
- (4) 種々の生体ストレス応答におけるClaspinの上流・下流因子を同定し、それらとClaspinの相互作用、機能を明らかにする。

### 4. 研究成果

Claspinは、複製ストレスに対する細胞応答のシグナル仲介因子、複製フォークの進行を促進する複製フォーク因子、およびCdc7キナーゼを動員することによって複製開始を促進する因子として、DNA複製制御において複数の重要な役割を果たす。本研究では、複製ストレス以外の種々の生体ストレス応答におけるClaspinの役割、PI3キナーゼ(PI3K)-PDK1-Akt-mTOR経路の活性化を必要とする血清飢餓からの成長回復におけるClaspinの新しい役割を発見した。

種々のストレス(酸化、浸透圧、温度、細菌感染、低酸素、高グルコースなど)に暴露された細胞における複製ストレス経路を調べた。高温処理はClaspinに依存するChk1活性化とClaspinの活性化(高リン酸化)を誘導した。更に、PERK、GCN2、PKR、HRIの4つのeIF2キナーゼのノックアウトマウス胎児線維芽(4KO MEF)細胞では、高温処理によるChk1の持続的な活性化が低下した。GCN2の発現により、Chk1の活性化が回復した。eIF2キナーゼとClaspinは協同して、高温ストレスへの細胞応答に関与する可能性を示唆している。

一方、血清飢餓からの回復時にClaspin欠損細胞ではS期に進行できず、最終的にROSおよびp53に依存して死滅する。ClaspinはPI3KおよびmTORと直接相互作用し、PI3K-PDK1-mTORの活性化およびmTOR下流因子p70S6Kおよび4E-BP1の活性化に必要なが、p38MAPKカスケードには必要ない。PDK1は、Claspinのリン酸化に依存して、Claspin、特にCKBDと物理的に相互作用

し、mTOR と Claspin の相互作用に必要である。したがって、Claspin は、mTOR 経路を活性化することにより、栄養誘発性の増殖/生存シグナル伝達の重要な調節因子として新しい役割を果たす。この結果は、Claspin がさまざまな PI3K 関連キナーゼから信号を受信し、それらを特定の下流のキナーゼに送信する共通のメディエーターとして機能する可能性も示唆している。

**(1) Claspin は、eIF2 キナーゼは高温ストレスをにตอบสนองする。**

高温で 24 時間培養したがん細胞とマウス胎児線維芽細胞は、Claspin 依存的な Chk1 活性化と Claspin の活性化 (高リン酸化) が観察された。更に、高温処理された PERK、GCN2、PKR、HRI の 4 つの eIF2 キナーゼのノックアウトマウス胎児線維芽(4KO MEF)細胞では、Chk1 の活性化は低下した。GCN2 発現により、Chk1 の活性化が戻る (図 1)。これは ISR(統合的ストレス応答)が高温による Chk1 の活性化に必要である可能性、あるいは GCN2 はストレスから適応の過程を抑制する、という 2 つの可能性を示唆する。

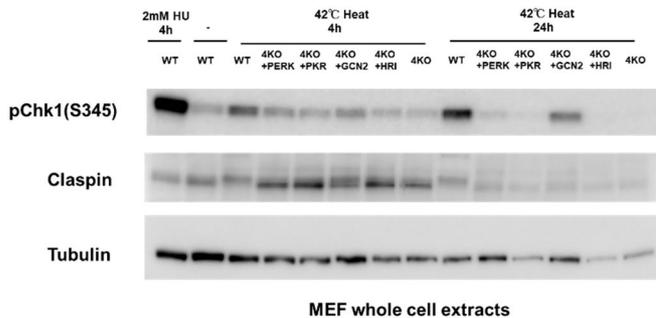


図 1 高温ストレスに反応する Claspin と eIF2 キナーゼの役割。

eIF2 キナーゼをノックアウトした高温で 24 時間培養した MEF 細胞で、Chk1 と Claspin のリン酸化が減少した。Gcn2 発現により、Chk1 のリン酸化は回復した。

**(2) 血清飢餓からの増殖再開における Claspin の役割。**

**Claspin は、血清飢餓からの成長回復に必要である。**

樹立した Claspin ノックアウト誘導可能なマウス胎児線維芽(Claspin KO MEF)細胞を使用して、血清飢餓ストレスに対して表現型を詳細に解析した。Claspin 欠損細胞では、血清飢餓からの増殖再開が障害を受ける。更に、Claspin 分子上の Acidic Patch は、血清飢餓によって誘発された G0 状態から増殖再開し S 期に入るのに必要である (図 2)。

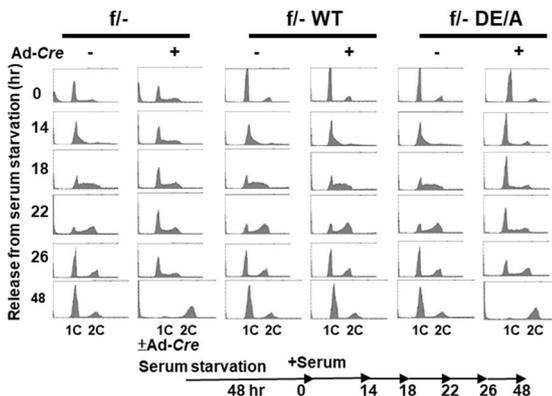


図 2 血清飢餓からの増殖再開における Claspin の役割。

Claspin をノックアウトした MEF 細胞では増殖開始できず最終的に死滅する(左)。全長 Claspin を発現すると増殖が開始、次の細胞周期への進行する(中央)。Acidic Patch の変異体 DE/A(すべての酸性アミノ酸がアラニンに置換されている)は増殖再開できない。

**血清飢餓からの生長回復で Claspin は、PI3K / PDK1/mTOR 経路の活性化に必要である。**

Claspin 欠損細胞では血清飢餓からの増殖再開が PI3K/PDK1/mTOR 経路の PI3K、PDK1、mTOR および mTOR 下流の S6K と 4EBP1 はリン酸化(活性化)は弱化した(図 3)。したがって、Claspin は、PI3K / PDK1/mTOR 経路の持続的な活性化に必要である。

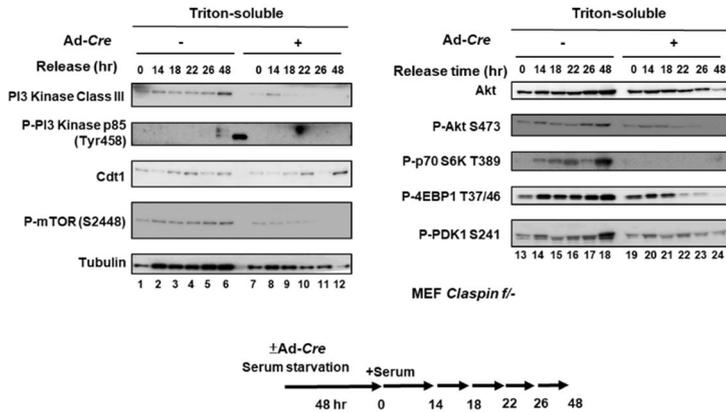


図3 血清飢餓からの成長回復中のPI3K-Akt-mTOR経路に関する因子に対するClaspinノックアウトの影響。

血清飢餓からの成長回復中の細胞死およびDNA合成におけるp53およびROS(活性酸素)の役割。

Claspin欠損細胞では血清飢餓からの増殖再開で、p53が活性化してROSが発生する。さらに、p53活性化阻害剤とROS阻害剤処理したClaspin欠損細胞の生存率は回復した(図4)。

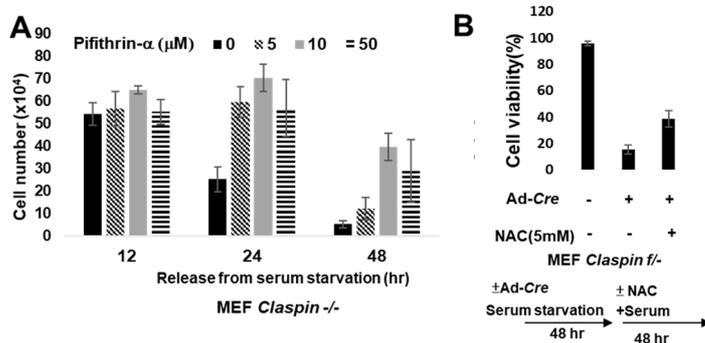


図4 p53またはROSの阻害による細胞死の回避。p53活性化阻害剤:Pifithrin- (A)及び(B) ROS阻害剤による細胞死の回避。Pifithrin- あるいはNAC処理されたClaspinノックアウトMEF細胞は、血清飢餓からの増殖再開での生存率が部分的に回復する。

### ClaspinはPI3K/PDK1/mTOR経路のメンバーと相互作用する。

細胞内に発現したClaspin-FLAGタグ融合タンパク質は(図5A)、Claspin(図5B)、PI3K/PDK1/mTORと結合することが分かった。精製タンパク質のClaspinとPDK1も細胞外での結合を証明された。

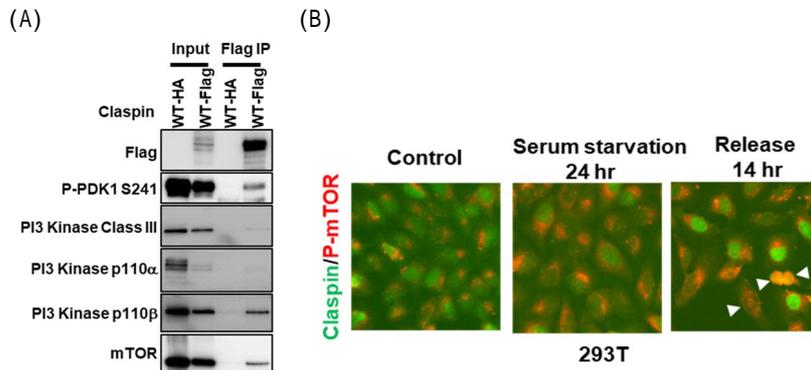


図5 Claspinとの結合実験。(A)ClaspinはPI3キナーゼ, mTORと結合する(Flag IPのレーン)。WT-HAはnegative control。(B) Claspin(緑)とmTOR(赤)は血清飢餓からの成長回復中核内で共局在する。

### Claspin、PDK1、PI3K、およびmTOR間の物理的および機能的な相互作用。

ClaspinのCKBDペプチドはリン酸化依存的にPDK1と結合する。これはPDK1のClaspinへの呼び込みにおけるCKBDリン酸化の重要性を示す。更に、キナーゼアッセイとプルダウンアッセイ

で、PIK3C3はClaspinをリン酸化して、ClaspinへのPDK1との結合を促進することを証明した(図6)。また、ClaspinとmTORの結合はPDK1阻害剤によって阻害され、Claspin上へのmTORの呼び込みにおけるPDK1の役割が示された。

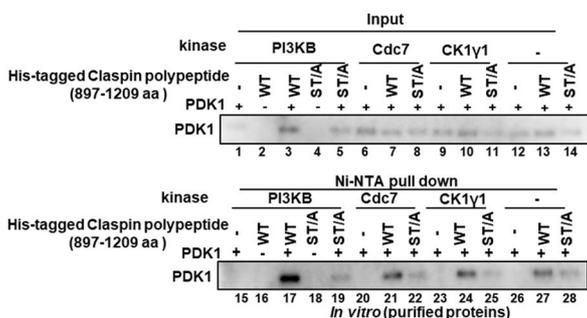


図6 PI3KはClaspinのCKBDをリン酸化し、PDK1のClaspinへの結合を促進する。His-タグClaspinはPI3キナーゼ、mTORと結合する(Flag IPのレーン)。WT-HAはnegative control。(B) Claspin(緑)とmTOR(赤)は血清飢餓からの成長回復中核内に結合する。

### (3)まとめ

Claspinが種々の生体ストレスによるChk1の活性化に重要な役割を果たすことを見出した。特に高温に対する反応では、ISR特にGCN2キナーゼがClaspin-Chk1の活性化制御に重要な働きを示す。

また、血清飢餓からの成長再開時のPI3K-PDK1-mTORの活性化におけるClaspinの新しい役割を特定した。血清により誘発されるシグナル伝達におけるPI3K-Claspin-PDKは、複製ストレスチェックポイントにおけるATR-Claspin-Chk1と並行している可能性がある。PDK1はChk1のようにClaspinのリン酸化CKBDに結合し、Claspinをリン酸化する。これによりmTORの呼び込みが促進される。Claspinは、PI3K-Claspin-PDK1の活性化のためのメディエーターとして機能する可能性がある(図7)。

種々の細胞/生体ストレスはClaspinを介してChk1を活性化する。この際、直接複製阻害を誘導し複製チェックポイントを活性化する場合と、間接的にChk1を活性化する場合がある。また、Claspinの上流にはPIKKが存在するが、ATRやPI3K以外のキナーゼが関与する可能性がある。また、ISRに關与するeIF2キナーゼなど、他のキナーゼがClaspin-Chk1の活性化に關与する可能性もある(図8)。本研究は、Claspinがさまざまな環境設定で上流のPIKKを下流のエフェクターにリンクする一般的なメディエーターとして機能するという興味深い可能性を示す。

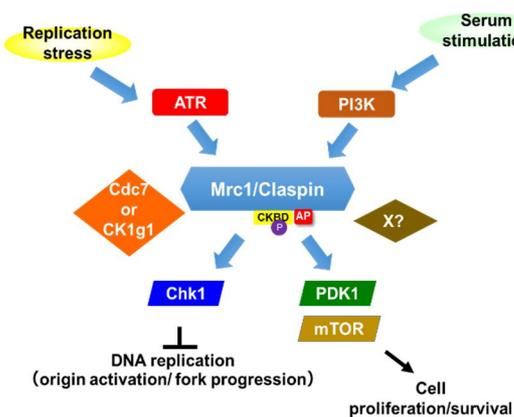


図7 モデル：血清刺激による誘導されるmTOR系活性化と複製ストレスによるChk1活性化の比較。

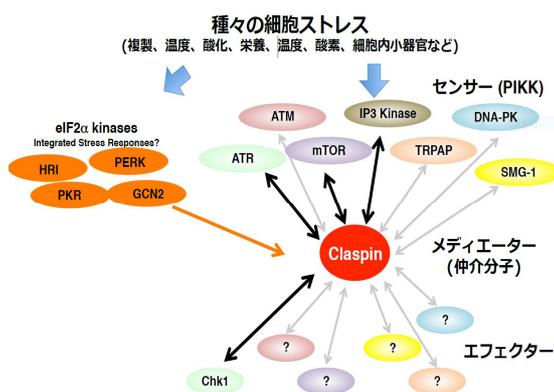


図8 種々の細胞・生体ストレスによるClaspinを介した細胞応答の機構。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chi-Chun Yang, Hisao Masai	4. 巻 なし
2. 論文標題 Claspin is required for growth recovery from serum starvation through regulating the PI3K-PDK1-mTOR pathway	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 biorxiv	6. 最初と最後の頁 なし
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.01.21.475743	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 楊其駿
2. 発表標題 ClaspinはPI3K-Akt-mTOR経路を制御することで血清飢餓からの成長回復に必要なである
3. 学会等名 第44回分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 楊其駿
2. 発表標題 Claspinは血清飢餓からの成長回復における細胞死を抑制する
3. 学会等名 第43回分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 楊其駿
2. 発表標題 Claspin as a general mediator molecule that responds to various cellular stress
3. 学会等名 第42回分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------