

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20790096

研究課題名（和文） がん治療薬の標的分子 Chk1 の新規・既知リン酸化反応の解析

研究課題名（英文） Roles of Chk1 phosphorylation in DNA damage checkpoint

研究代表者

笠原広介（KOUSUKE KASAHARA）

愛知県がんセンター（研究所）・発がん制御研究部・研究員

研究者番号：90455535

研究成果の概要（和文）：Chk1 は、DNA 障害チェックポイントの際に ATR キナーゼによってセリン 317 及びセリン 345 がリン酸化される。このリン酸化によって、Chk1 は立体構造が変化し、Chk1 のキナーゼドメインと基質間の相互作用が亢進すると考えられているが、Chk1 の詳細な活性制御メカニズムは未だ不明な点が多い。今回、我々は機能未知である Chk1 のリン酸化反応から Chk1 の機能制御にアプローチし、以下のことを明らかにした。

1. DNA 障害チェックポイントにおいて、ATR によってリン酸化された Chk1 は活性化し、その後、自身のセリン 296 をリン酸化（自己リン酸化）することを明らかにした。また、セリン 296 がリン酸化された Chk1 がドッキング蛋白質 14-3-3 の サブタイプと直接結合すること、そして 2 量体形成した 14-3-3 がさらに Cdc25A と結合することで、Chk1 / 14-3-3 / Cdc25A の 3 者複合体が形成されることを見出した。この複合体形成により、Chk1 は Cdc25A のセリン 76 をリン酸化し、Cdc25A の蛋白質分解を誘導することが判明した。
2. 分裂期において Chk1 はセリン 286 及びセリン 301 をサイクリン依存性キナーゼ 1 (CDK1) にリン酸化されることを同定した。さらに、このリン酸化は、分裂前期（prophase）において Chk1 を核から細胞質へ排出を促すことを明らかにした。この機構により、細胞の分裂期進行が促進される。また、Chk1 のセリン 286 及びセリン 301 は DNA 障害チェックポイントにおいては、CDK2 によってリン酸化されることも見出した。

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生物系薬学・分子生物学

キーワード：チェックポイント、DNA 損傷、リン酸化シグナル伝達、細胞周期、分指標の治療薬、Chk1

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は、染色体（ゲノム）の複製・分配を巧妙に制御しながら増殖・分裂している。この細胞周期の制御機構に異常は、発がん過程やがんの染色体不安定性の進展に重要な役割を担っていると考えられている。

近年の研究成果の蓄積により、細胞周期の進行には、サイクリンとそれに依存する蛋白質リン酸化酵素（キナーゼ）群が中核的な役割を果たしていることが分かっている。例えば、G2 期から M 期（分裂期）への進行にはサイクリン B とサイクリン依存性キナーゼ 1（CDK1）の複合体の活性化が必須である。サイクリン B / CDK1 複合体の活性化因子として Cdc25A ホスファターゼが知られる。

増殖する細胞の DNA に損傷や複製障害が生じると、Cdc25A-CDK 経路は不活性化し、細胞周期が停止する。このような機構は、DNA 障害チェックポイントと呼ばれ、その中心的な役割を担うキナーゼとして Chk1 が機能している。Chk1 は、上流キナーゼである ATR によってセリン 317 及びセリン 345 がリン酸化されることで立体構造が変化し活性化する。活性化した Chk1 は Cdc25A の複数のセリン / トレオニン をリン酸化することで、Cdc25A のユビキチン・プロテアソーム依存的なリン酸化を引き起こすことで、細胞周期の停止を誘導する。しかしながら、Chk1 の詳細な活性制御メカニズムについては不明な点が多いのが現状である。

## 2. 研究の目的

機能未知である Chk1 のリン酸化部位（セリン 286、セリン 296、セリン 301）の制御メカニズムと DNA 障害チェックポイントに

おける生理的意義を明らかにする。この研究を通して、DNA 障害チェックポイントを標的としたがんの分子標的治療薬開発の基盤となる知見を得ることを目指す。

## 3. 研究の方法

- (1) 各 Chk1 リン酸化反応を特異的に認識する抗体の作製：目的とするリン酸化セリン及びその前後 5 残基のアミノ酸配列を含むリン酸化ペプチドを用いて、ラットモノクローナル抗体を作製した。
- (2) Myc-Chk1 変異体誘導発現細胞株の樹立：Myc-Chk1 野生型及び各リン酸化部位のアラニン置換変異体を抗生物質テトラサイクリン依存的に誘導発現する HeLa 細胞株を樹立した。Chk1 の 3' UTR 配列に対する RNA 干渉法（siRNA）を用いることで、内在性 Chk1 を Myc-Chk1 変異体と置き換えて、その効果を解析した。
- (3) In vitro（試験管内）実験系による Chk1 リン酸化アッセイ：Chk1 及び Chk1 の基質・上流キナーゼの精製蛋白質を昆虫細胞（バキュロウィルス系）と大腸菌で精製し、In vitro でリン酸化反応を行い、Chk1 をリン酸化するキナーゼの同定や Chk1 のキナーゼ活性の解析を行った。

## 4. 研究成果

我々は今回、Chk1 の機能未知であるリン酸化部位について研究を進め、以下のリン酸化の機能及び生理的意義を明らかにした。

- (1) Chk1 のセリン 296 自己リン酸化反応  
DNA 障害チェックポイントの際に、ATR によってセリン 317 及びセリン 345 をリン酸化され活性化した Chk1 は自身のセリン 296 をリ

ン酸化(自己リン酸化)することを見出した。セリン 296 リン酸化の機能について解析を進めたところ、14-3-3 の サブタイプとの結合を引き起こすリン酸化反応であることが分かった。さらに、14-3-3 との結合は、Chk1 の酵素活性や細胞内局在に影響を与えるのではなく、14-3-3 がさらに Chk1 の基質である Cdc25A と結合することで、Chk1 / 14-3-3 / Cdc25A の 3 者複合体形成を促進することを明らかにした。さらに、セリン 296 をアラニン置換した Chk1 変異体 (S296A) を内在性 Chk1 と置き換えた細胞や、14-3-3 を RNA 干渉法によりロックダウンした細胞では、紫外線照射後の Cdc25A 蛋白質分解や細胞周期停止が著しく阻害されることが判明した。すなわち、14-3-3 は Chk1 が Cdc25A をリン酸化するためのプラットフォームとして機能していると言える。

(2)CDK による Chk1 セリン 286 及びセリン 301 のリン酸化反応

我々は以前、Chk1 のセリン 286 及びセリン 301 が M 期特異的にサイクリン B / CDK1 複合体によってリン酸化されることを同定した。今回、M 期における Chk1 リン酸化の生理的意義を明らかにするため、G2 期から M 期に移行する際の Chk1 の細胞内局在を詳細に検討した。その結果、Chk1 は分裂前期 (prophase) において Crm-1 依存的に核から細胞質へ排出されることが判明した。さらに、セリン 286 及びセリン 301 をアラニン置換した Chk1 変異体 (S286A・S301A) を誘導発現する細胞株を樹立して解析を進めたところ、Chk1-S286A・S301A 変異体では分裂前期に核から細胞質への排出が著しく抑制されることが分かった。また、S286A・S301A 細胞では G2 期から M 期への移行にも遅延がみられることが明らかとなった。すなわち、これまで

Chk1 は Cdc25 を介して CDK1 を抑制的に制御することが知られていたが、細胞が G2 期から M 期へ進行する際には、CDK1 が Chk1 のセリン 286 及びセリン 301 を直接リン酸化して核外へ排出することで、その抑制作用を解除するメカニズムがあることを明らかにした。

我々はさらに、DNA 障害チェックポイントにおいても、Chk1 のセリン 286 及びセリン 301 のリン酸化反応が起こること、このリン酸化は CDK2 によって遂行されることも見出した。DNA 障害チェックポイントにおけるセリン 286 及びセリン 301 リン酸化の生理的意義については未だ分かっておらず、今後の検討課題と言える。

#### 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 10 件)

1. P. Bargagna-Mohan, R.R. Paranthan, A. Hamza, N. Dimova, B. Trucchi, C. Srinivasan, G.I. Elliott, C.G. Zhan, D.L. Lau, H. Zhu, K. Kasahara, M. Inagaki, F. Cambi, R. Mohan (2010) Withaferin A targets intermediate filaments GFAP and vimentin in A model of retinal gliosis. *J Biol Chem.* 285: 7657-7669.
2. M. Enomoto, H. Goto, Y. Tomono, K. Kasahara, K. Tsujimura, T. Kiyono, M. Inagaki (2009) A novel positive feedback loop between Cycline-dependent kinase 1 (CDK1) ad CHK1 in the nucleus during the G2/M transition. *J. Biol. Chem.* 284: 34223-3433.

3. K. Ikeda, Y. Nakayama, M. Ishii, Y. Obata, K. Kasahara, Y. Fukumoto, N. Yamaguchi (2009) Requirement of the SH4 and tyrosine-kinase domains but not the kinase activity of Lyn for its biosynthetic targeting to caveolin-positive Golgi membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1790: 1345-1352.
  4. I. Sato, Y. Obata, K. Kasahara, Y. Nakayama, Y. Fukumoto, T. Yamasaki, K.K. Yokoyama, N. Yamaguchi (2009) Differential trafficking of c-Src, Lyn, c-Yes, and Fyn is specified by the state of palmitoylation in the SH4 domain. *J. Cell Sci.* 122: 965-975.
  5. A. Takahashi, Y. Obata, Y. Fukumoto, Y. Nakayama, K. Kasahara, T. Kuga, Y. Higashiyama, T. Saito, K.K. Yokoyama, N. Yamaguchi (2009) Nuclear localization of Src-family tyrosine kinase is required for growth factor-induced euchromatinization. *Exp. Cell Res.* 315: 1117-1141.
  6. Y. Ikegami, H. Goto, T. Kiyono, M. Enomoto, K. Kasahara, Y. Tomono, K. Tozawa, A. Morita, K. Kohri, M. Inagaki (2008) Chk1 phosphorylation at Ser286 and Ser301 occurs with both stalled DNA replication and damage checkpoint stimulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 377: 1227-1231.
  7. K. Ikeda, Y. Nakayama, Y. Togashi, Y. Obata, T. Kuga, K. Kasahara, Y. Fukumoto, N. Yamaguchi. (2008) Nuclear localization of Lyn tyrosine kinase mediated by inhibition of its kinase activity. *Exp. Cell Res.* 314: 3392-3404.
  8. K. Kasahara, Y. Nakayama, N. Yamaguchi. (2008) v-Src and c-Src, nonpalmitoylated Src-family kinases, control lysosome distribution via Rab7 in an SH2 domain-dependent manner. *Cancer Lett.* 262: 19-27.
  9. J. Aoyama, Y. Akazawa, K. Kasahara, Y. Higashiyama, I. Kikuchi, Y. Fukumoto, S. Saburi, Y. Nakayama, M.N. Fukuda, N. Yamaguchi. (2008) Nuclear localization of magphinins, alternative splicing products of the human trophinin gene. *J. Cell. Biochem.* 103: 765-777.
  10. T. Kuga, M. Hoshino, Y. Nakayama, K. Kasahara, K. Ikeda, Y. Obata, A. Takahashi, Y. Higashiyama, Y. Fukumoto, N. Yamaguchi (2008) Role of Src-family kinases in formation of the cortical actin cap at the dorsal cell surface. *Exp. Cell Res.* 314: 2040-2054.
- P
- 〔学会発表〕(計 15 件)
1. 笠原広介、後藤英仁、稲垣昌樹：多彩なリン酸化によってチェックポイントキナーゼ 1 (Chk1) は機能修飾される。第 68 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2009 年 10 月 (シンポジウム)
  2. Kasahara, K.: Regulatory mechanism of Chk1 by its autophosphorylation in checkpoint response. Global Center of Excellence (COE) Program 1st International Symposium “ Signaling

- of Cancer Cells ”, Nagoya. 2009 (ポスター)
3. Kasahara, K.: 14-3-3 mediates Cdc25A proteolysis to induce S and G2 arrest after DNA damage. Global Center of Excellence (COE) Program 2nd International Symposium “ Signaling of Cancer Cells ”, Nagoya. Nov. 2009 (ワークショップ)
  4. Goto, H., Kasahara, K., Tomono, Y., Enomoto, M., Kiyono, T. and Inagaki, M.: 14-3-3 mediates Cdc25A proteolysis to induce S and G2 arrest after DNA damage. The 49th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Diego. Oct. 2009 (ポスター)
  5. 笠原広介, 後藤英仁, 榎本将人, 池上要介, 友野靖子, 稲垣昌樹: Negative feedback regulation of Chk1 by its own kinase activity. 2008年 BMB2008(第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学大会 合同大会、神戸) (ポスター)
  6. 笠原広介, 後藤英仁, 榎本将人, 友野靖子, 清野透, 稲垣昌樹: The association between autophosphorylated Chk1 and 14-3-3gamma is required for Chk1 function in DNA damage checkpoint. 第61回日本細胞生物学会大会 (名古屋) 2009年6月 (ポスター)
  7. 榎本将人, 後藤英仁, 友野靖子, 笠原広介, 池上要介, 辻村邦夫, 清野透, 稲垣昌樹: The association between autophosphorylated Chk1 and 14-3-3gamma is required for Chk1 function in DNA damage checkpoint. 第61回日本細胞生物学会大会 (名古屋) 2009年6月 (ポスター)
  8. 榎本将人, 後藤英仁, 友野靖子, 笠原広介, 辻村邦夫, 清野透, 稲垣昌樹: G2/M期におけるCdk1によるChk1の制御機構の解析. 第82回日本生化学大会 (神戸) 2009年11月 (ポスター)
  9. Enomoto, M., Goto, H., Ikegami, Y., Kasahara, K., Tomono, Y., Tsujimura, K., Kiyono, T. and Inagaki, M.: Chk1 phosphorylation by Cyclin-dependent kinases (Cdks). International Symposium on Chromosome Dynamics in Ise, Shima. (ポスター)
  10. Goto, H., Enomoto, M. Tomono, Y., Kasahara, K., Ikegami, Y., Tsujimura, K., Kiyono, T. and Inagaki, M.: Chk1 phosphorylation by Cyclin-dependent kinase 1 promotes mitotic entry. The 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Francisco. (ポスター)
  11. 笠原広介, 後藤英仁, 榎本将人, 池上要介, 友野靖子, 稲垣昌樹: Negative feedback regulation of Chk1 by its own kinase activity. 2008年 BMB2008(第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学大会 合同大会、神戸) (ワークショップ)
  12. Goto H., Enomoto M., Tomono Y., Kasahara K., Ikegami Y., Tsujimura K., Kiyono T., Inagaki M.: Chk1 phosphorylation by Cyclin-dependent kinase 1 promotes mitotic entry. 2008 American Society for Cell Biology (ASCB) (ポスター)
  13. 笠原広介, 後藤英仁, 榎本将人, 池上要介, 友野靖子, 稲垣昌樹: Negative

feedback regulation of Chk1 by its own kinase activity. 2008年	学社、2008
BMB2008(第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学大会 合同大会、神戸) (ポスター)	〔産業財産権〕 出願状況 (計0件)
14. 笠原広介、後藤英仁、池上要介、榎本将人、友野靖子、稲垣昌樹: Ser-296 phosphorylation of Chk1 in checkpoint response. 2008年 第67回日本癌学会 学術総会 (名古屋) (ポスター)	取得状況 (計0件)
15. 笠原広介、後藤英仁、池上要介、榎本将人、友野靖子、稲垣昌樹: Autophosphorylation of Chk1 in checkpoint response. 2008年 第60回日本細胞生物学会 (横浜) (ポスター)	〔その他〕 なし
16. 高橋明格、福本泰典、中山祐治、笠原広介、久家貴寿、小幡裕希、東山幸弘、山口直人: nuclear localization of Src tyrosine kinases is required for growth factor-induced euchromatinization. (細胞増殖因子刺激により誘導されるユークロマチン化における核局在 Src 型チロシンキナーゼの役割) 2008年 BMB2008(第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学大会 合同大会、神戸) (ポスター)	6. 研究組織 (1)研究代表者 笠原広介 (KOUSUKE KASAHARA) 愛知県がんセンター (研究所) 発がん制御研究部・研究員 研究者番号: 90455535
〔図書〕(計2件)	(2)研究分担者 なし
1. 笠原広介、後藤英仁. リン酸化によるM期制御-染色体サイクル ゲノム恒常性維持、継承とダイナミクス-正井久雄、升方久夫、釣本敏樹、仁木宏典、篠原彰編、蛋白質核酸酵素、54巻、4号、441-446、2009	(3)連携研究者 なし
2. 笠原広介、後藤英仁、稲垣昌樹. 細胞の構造と分裂終期-図説 分子病態学-一瀬白帝、鈴木宏治 編、34-39、中外医	