

平成 22 年 2 月 7 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791338
 研究課題名（和文） Aurora-A の安定性を制御するリン酸化調節機構と口腔癌におけるその異常
 研究課題名（英文） Aurora-A; Phosphoregulation and its abnormality in Oral Cancer

研究代表者
 北島 正二郎(KITAJIMA SHOJIRO)
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号：00452590

研究成果の概要（和文）：

本研究は、リン酸化／脱リン酸化を介した、ユビキチン・プロテアソーム系による Aurora-A キナーゼの分解メカニズムの詳細について明らかにし、口腔癌でみられたリン酸化異常に起因する過剰発現の原因を解明することを目的とした。そのために、タンパク結合や、Aurora-A のフォスファターゼである PP2A 活性について詳細な検討を行うと同時に、B サブユニットを介した PP2A の機能調節機序とその生物学的意義について検討し、明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this project is to reveal the mechanism of Aurora-A degradation mediated by phosphorylation and the mechanism that causes Aurora-A overexpression. We examined the binding of Aurora-A to PP2A complex and the activity of PP2A in oral cancer cell lines. We further approached the regulation of PP2A mediated by regulatory B subunit and its biological meanings.

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	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：Aurora-A PP2A 口腔癌 リン酸化

1. 研究開始当初の背景

Aurora-A は、細胞分裂期の進行を制御するセリン／スレオニンキナーゼで、細胞分裂に必須の因子である一方、様々な癌での過剰発

現が報告されており、癌遺伝子のひとつと考えられていたが、その過剰発現のメカニズムの全容は明らかでなかった。我々はこれまでに、口腔癌症例において Aurora-A の 51 番目

のセリンが高頻度でリン酸化されており、このリン酸化がユビキチン化を阻害することでタンパクを安定化し、結果として過剰発現につながっているということを明らかにしていた。しかし、リン酸化された Aurora-A がどうしてユビキチン化されにくくなるのか、またどうして Aurora-A が口腔癌で細胞周期を通して恒常的にリン酸化状態にあり、過剰発現しているのかは明らかでなかった。一方、別の研究グループにより、Aurora-A の 51 番目のセリンが、セリン/スレオニンフォスファターゼである PP2A によって脱リン酸化され得るという報告がなされていたが、リン酸化抗体がなかったため、直接的な証明には至っていなかった。また、この PP2A を含む脱リン酸化酵素に関する報告は、リン酸化酵素のそれに対して非常に数が少なく、多くのサブユニットのファミリーを有する PP2A の局在や活性がどのように制御され、口腔癌の発生にどのように関与しているのかについては、ほとんど不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、51 番目のセリンのリン酸化が、Aurora-A のユビキチン分解に対して及ぼす影響を、分子レベルで明らかにすると同時に、口腔癌において、恒常的なリン酸化が生じている原因について、分子病理学的に検討することを目的とした。さらに、得られた結果より、リン酸化制御をターゲットとした新たな分子治療法の可能性についても検討することまで視野に入れた。

3. 研究の方法

我々がこれまでに得ていた、51 番目のセリン特異的なリン酸化抗体を用い、脱リン酸化のタイミングを生化学的に詳細に検討した。さらにこの結果から、その脱リン酸化に影響を及ぼす因子について、分子間結合の観点から検討した。

細胞の培養は、HeLa 細胞においては、10%FBS 含有 DMEM を、また口腔癌細胞株においては、10%FBS 含有 RPMI によっておこなった。細胞の分裂期同調は、微小管重合阻害剤である nocodazole を、50~200ng/mL の濃度で培養液に添加し、12 時間後、形態的に丸くなり、培養皿への接着が弱くなったものを回収し、これを分裂中期の細胞として回収、もしくは新鮮培養液中に戻して細胞周期をさらに進行させた。脱リン酸化酵素阻害剤を用いた検討は、この方法を応用し、回収した分裂期の細胞を PBS で洗浄後、新鮮培養液中に戻し、さらに各脱リン酸化酵素阻害剤をそれぞれ加え、37°C で 4 時間培養した後、全ての細胞を回収した。脱リン酸化酵素阻害剤は、I-2 (PP1 阻害剤)、Endothall (PP2A 阻害剤)、カルシニューリン阻害剤 (PP2B 阻害剤)、お

よびオカダ酸 (PP1 および PP2A 阻害剤) をそれぞれ用いた。RNAi および発現ベクターの細胞内導入には、リポフェクション法を用いた。タンパク発現の生化学的解析は、ウエスタンブロット法を用いて行った。8~12% SDS-PAGE によってタンパクを分離した後、セミドライ方式でタンパクをニトロセルロース膜に転写し、3%スキムミルクでブロッキングした後、1次抗体、2次抗体をかけ、化学発光法により、シグナルを検出した。B56 α のリン酸化に関する検討では、ウエスタンブロット法を応用し、phos-tag を加えた SDS-PAGE によってリン酸化タンパクを非リン酸化タンパクと分離することで、目的のタンパクのリン酸化を検出した。

免疫沈降法は、タンパク溶液 1000 μ L に対して抗体を 2 μ L 加え、さらにプロテイン G アガロース溶液を 20 μ L 加え、4°C で 3 時間から 1 晩反応を行った。その後遠心に向け、プロテイン G アガロースを沈殿させたものに、サンプリングバッファーを加えて熱処理したものを遠心し、その上清をサンプルとし、ウエスタンブロット法を応用して解析した。

51 番目のセリン特異的な Aurora-A のリン酸化検出は、上記の免疫沈降法を応用した。リン酸化抗体を用いて免疫沈降した後、サンプル中の Aurora-A 量を、別の Aurora-A 抗体を用いてウエスタンブロット法によって、検出した。

また脱リン酸化酵素活性の測定についても、上記の免疫沈降法と、マラカイトグリーンによる遊離リン酸基の検出を応用して行った。まず、反応時に、内因性のリン酸基が検出されないように、キレート剤を含有する TBS 溶液で細胞を回収した。細胞を超音波で破碎した後、PP2A-C サブユニットに対する抗体を用いて 1 晩反応を行うことで、各細胞由来の PP2A 複合体を、活性を維持したまま回収した。ここに、PP2A 複合体が基質特異的に認識する配列のリン酸化ペプチドを加え、30°C で 15~45 分反応させた後、遠心し、上清中の遊離リン酸基の濃度を、マラカイトグリーンによる染色と吸光度の測定によって算出した。この方法により、口腔癌細胞における PP2A の活性を測定し、リン酸化レベルとの比較検討を行うと同時に、B サブユニットである B56 ファミリー因子による PP2A の活性制御機構について調べ、その生物学的意義を検討した。B56 に関する免疫蛍光染色は、カバースリップ上で培養した細胞を、メタノールで 10 分固定した後、0.1% Triton X-100 含有 PBS にて 2 分間処理し、続いて 3% BSA 含有 PBS で 30 分ブロッキングを行ったものに、一次抗体、二次抗体を順次反応させ、蛍光顕微鏡で検出した。動原体の局在の検出には、セントロメアタンパクである抗 CENP-A 抗体を用いた。また分裂期の微小管の染色には、抗 α

-tubulin 抗体を用いた。核および染色体の染色には、DAPI を用いた。

B56 α のリン酸化に関する検討については、発現ベクターを用いて、Site Direct Mutagenesis によってリン酸化候補部位のセリンもしくはスレオニンをアラニンに変換することで、擬似的に非リン酸化状態にしたものを細胞内で過剰発現させることで行った。

4. 研究成果

(1) Aurora-A の 51 番目の脱リン酸化のタイミングを検討するため、HeLa 細胞を nocodazole によって分裂期に同調した後、細胞周期を進め、短時間で経時的に回収し、リン酸化抗体を用いてリン酸化の動きを検討した。その結果、nocodazole で同調した時期（分裂中前期に相当）よりも、その 30 分後（分裂中期～分裂後期に相当）で、リン酸化レベルが最も高いことがわかり、その後急速に脱リン酸化されることがわかった。このことは、51 番目のセリンのリン酸化による Aurora-A の安定化機構が、厳密に制御されていることを示唆している。また、nocodazole による同調から解放して 4 時間後のリン酸化状態を、様々な阻害剤を加えて検討したところ、対照ではリン酸化は検出されなかったが、PP2A 阻害剤の投与によりリン酸化が維持されていたことから、PP2A が Aurora-A を脱リン酸化していることを初めて、リン酸化抗体によって直接検出することができた。

(2) 口腔癌におけるリン酸化異常の原因を探るため、口腔癌細胞株を用い、Aurora-A と PP2A との結合状態を検討した。PP2A は、A、B、C のサブユニットからなる三量体のため、C サブユニットの抗体を用い、免疫沈降法によって Aurora-A との結合を検討した。その結果、一部の細胞株で結合状態が不安定なものが検出されたことから、PP2A との結合状態が、Aurora-A のリン酸化状態に影響していること、また、口腔癌ではしばしば結合異常が生じており、その結果恒常的なリン酸化状態になっていることが推察された。

次に、免疫沈降法の応用により、口腔癌細胞株において PP2A 複合体を抽出し、その脱リン酸化活性を *in vitro* で測定したところ、一部の細胞株では、PP2A 活性が著しく低下していることがわかった。そのような細胞では、Aurora-A のリン酸化レベルが非常に高かったことから、PP2A 活性を制御するなんらかのメカニズムが存在していると考えられた。また、免疫沈降法により、PP2A のそれぞれのサブユニットや Aurora-A との結合について検討したところ、一部の細胞株で、PP2A と Aurora-A との結合量が著しく低下していることが発見された。結合量の低下は脱リン酸化の反応を妨げると考えられる。これらの異常

が一部の口腔癌細胞株における Aurora-A の脱リン酸化異常につながり、Aurora-A を介した発癌に寄与している可能性が示唆された。

(3) PP2A は、それぞれ二種類の A および C サブユニット、そして二十種類以上の B サブユニットからなっており、B サブユニットが基質特異性を決めていると考えられている。そこで本研究では、PP2A の活性を制御するメカニズムについて考察するため、B サブユニットの中でも比較的よく研究されている因子である B56 α について、その動態制御を検討した。B56 α は、細胞周期を通して常に発現量が維持されているが、分裂期ではトライトン不溶画分に移行していることがわかった。また、免疫蛍光染色によって、それが染色体の動原体上に局在していることが確かめられた。また、B56 α に対する shRNA および siRNA を HeLa 細胞に導入したところ、細胞分裂像に異常をきたすことが分かった。また同時に、細胞分裂期が延長し、細胞分裂に失敗して死ぬ細胞が出現する割合が対照よりも増加していることも明らかとなった。一方、B56 α 自身のリン酸化を調べるため、phos-tag-SDS-PAGE とウエスタンブロット法を応用したところ、B56 α は分裂期の間、高度にリン酸化されていることがわかった。そこで、上記の RNAi を導入した細胞に、発現ベクターを用いて、野生型、もしくは非リン酸化型の B56 α を強制発現したところ、野生型では RNAi 対照群と同様な状態に戻ったが、非リン酸化型 B56 α を強制発現させた場合は全く戻らないという結果が得られた。これらの RNAi とプラスミドを用いた過剰発現系の検討により、B56 α 自身も細胞分裂期にリン酸化によって活性が制御されており、染色体分配到重要な役割を果たしていることが明らかとなった。このことは、PP2A の新しい活性制御機構を明らかにしたのみならず、PP2A によるタンパクの脱リン酸化が細胞分裂の中で劇的に変化する様々なタンパクのリン酸化状態を制御する為に非常に重要な役割を担っており、リン酸化/脱リン酸化の絶妙なバランスの上に細胞分裂が営まれていることが考察された。次に、口腔癌細胞株における B56 α のリン酸化状態を調べたところ、ある種の細胞株では、正常なリン酸化調節がなされていないこともあきらかとなった。この結果から、脱リン酸化酵素である PP2A は、Aurora-A などの癌遺伝子産物を脱リン酸化を介して制御しているのみならず、PP2A 活性もまた、癌遺伝子産物を含む様々な因子によって制御されている可能性が考えられた。本研究結果は、細胞分裂や発癌の鍵因子である Aurora-A の詳細な制御機構を明らかにしたのみならず、脱リン酸化酵素が細胞癌化の抑制に果たす役割を明らかにし、新たな分子

治療薬のターゲットとなりうる可能性まで示唆するものである。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

北島 正二郎 B56alpha-PP2A regulates chromosome alignment and stability, 第 32 回日本分子生物学会年会
平成 21 年 12 月 9 日パシフィコ横浜(横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北島 正二郎 (Kitajima Shojiro)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：00452590

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：