

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06619

研究課題名(和文) プロテインホスファターゼPP2Aによるシグナル伝達と細胞増殖の制御

研究課題名(英文) Regulation of signal transduction and cell growth by protein phosphatase 2A

研究代表者

桜井 博 (Sakurai, Hiroshi)

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：00225848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：網膜芽細胞腫がん抑制タンパク質RBは、細胞の増殖、運動性、アポトーシスを制御している。RBは、細胞増殖に必要な遺伝子群の発現を誘導するE2Fの転写活性化能力を抑制する。RBのリン酸化状態は、RBとE2Fの相互作用を制御する。本研究では、IER2とIER5はRBに結合し、PP2AによるRBの脱リン酸化を促進し、さらに、さまざまな細胞周期関連遺伝子の発現を抑制することを明らかにした。IER2とIER5は適切なG1期の進行に関与していた。これらの結果から、PP2Aアダプタータンパク質はRBのリン酸化状態を調節しRB-E2F相互作用および細胞周期進行の重要な制御因子であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん抑制遺伝子として初めて同定されたRBの機能は多くのがんで不活化しており、細胞のがん化やがんの進行に関与する。RB-E2F相互作用において、キナーゼの作用機構は詳細に研究されているが、ホスファターゼの関与については明らかになっていない。本研究は、PP2AおよびPP2AのアダプタータンパクがRBの活性制御に関与することを示した初めての報告である。細胞のがん化制御におけるPP2Aの活性制御を標的にした創薬にも発展する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The retinoblastoma tumor suppressor protein RB participates in various cellular processes including cell proliferation, motility, and apoptosis. RB suppresses the activity of E2F transcription factors, a family of regulators of genes needed for cell proliferation. RB exhibits phosphorylation-sensitive interactions with E2F. In this study, I have shown that both IER2 and IER5 interact with RB, enhances RB dephosphorylation by PP2A, and repress the expression of various cell cycle-related genes. Consistently, IER2 and IER5 are involved in the proper progression of the G1 phase. These results suggests that PP2A adapter proteins are critical regulators of the phosphorylation status of RB, and thus modulate the RB-E2F interactions and cell cycle progression.

研究分野：分子生物学

キーワード：Protein phosphatase 2A PP2Aアダプタータンパク IERタンパク RBがん抑制遺伝子 E2F転写調節因子 細胞周期 細胞運動

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

タンパク質のリン酸化は主要なシグナル伝達ツールであり、リン酸化の有無によりシグナル伝達タンパク、代謝調節タンパクや転写調節因子の機能が正または負に制御される。事実、ヒト細胞のタンパク質の約 30%がリン酸化による調節を受けている。したがって、プロテインキナーゼとプロテインホスファターゼの活性調節はシグナル伝達経路の中心を担っており、これら酵素遺伝子の変異・欠失・増幅は、細胞のがん化や死を引き起こす。

PP2A は細胞内セリン/スレオニンホスファターゼ活性の 90%以上を担っており、さまざまな機能に關する 300 種以上のリン酸化タンパク質の脱リン酸化を触媒することが知られている。さらに、PP2A と標的タンパクの両方に結合するアダプタータンパクは、PP2A の基質特異性を正または負に制御する。アダプタータンパクの IER2 や IER5 (immediate-early response 2 and 5) は、標的タンパク [細胞周期制御因子 CDC25A, CDC25B、転写調節因子 HSF1、翻訳に關する ribosomal protein S6 kinase (S6K)] に結合し、PP2A によるこれらのタンパク質の脱リン酸化を促進する。さらに、IER2 は細胞周期の進行や細胞の運動に、また IER5 の発現は、子宮体がん・肺がん・腎臓がん患者の予後と關することから、腫瘍形成に深く關することが示唆されている。

2. 研究の目的

細胞周期の進行は Cyclin-CDK (cyclin-dependent kinase) により制御されている。G1 期の進行および G1/S 期の移行における CDK の主要な標的は RB がん抑制タンパクと E2F 転写調節因子の複合体であり、リン酸化 RB が E2F から解離することにより E2F の転写活性が増大し細胞周期の進行に必要な遺伝子の発現が誘導される。Cyclin-CDK 活性は CDC25A phosphatase や CDK inhibitor (CKI) により調節されている。本研究では、「PP2A とアダプタータンパクの相互作用、および、PP2A-アダプターが [CDC25A Cyclin-CDK Rb-E2F] リン酸化カスケードの脱リン酸化にどのように關し細胞増殖や腫瘍形成をどのように制御するか」について明らかにする。

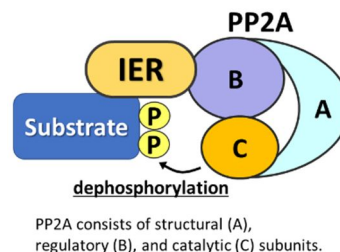
3. 研究の方法

HeLa (ヒト子宮頸がん由来) HEK293 (ヒト胎児腎臓由来) T98G (ヒトグリア芽細胞腫由来) HepG2 (ヒト肝芽腫由来) 細胞を用いた。遺伝子 DNA 断片や cDNA は HeLa 細胞より PCR および RT-PCR 法により増幅し、哺乳動物細胞内発現ベクター (pcDNA3.1 や pEB-Multi-Hyrgomycin) や大腸菌内発現ベクター (pGEX) にクローン化した。プラスミド DNA と siRNA は Lipofectamine 3000 と RNAiMAX を用いて細胞内に導入した。リアルタイム PCR には THUNDERBIRD Next SYBR qPCR Mix や PowerUp SYBR qPCR Mix と LightCycler 96 System を用いた。ルシフェラーゼアッセイにはプロモーター DNA を連結した pGL3 ベクターと pRL-TK を用い Dual-Luciferase Reporter Assay System によりルシフェラーゼ活性を測定した。ウエスタンブロッティングでは、一次抗体と horseradish peroxidase 標識二次抗体を反応後、イムノスターによる発光を ChemiDoc イメージングシステムにより検出した。一次抗体は、Proteintech Group, Abcepta, GeneTex, Santa Cruz Biotechnology, Abcam, Cell Signaling Technology, Novus Biologicals, Sigma-Aldrich, MBL 社から購入した。Phos-tag を用いたウエスタンブロッティング、RT (reverse transcription)-qPCR、クロマチン免疫沈降、共免疫沈降、プルダウンアッセイ、ホスファターゼアッセイ、フローサイトメトリー、細胞運動解析は常法に従った。統計解析には t-検定を用いた。

4. 研究成果

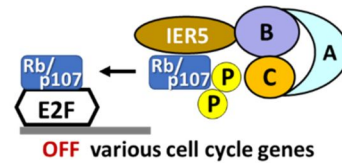
(1) アダプタータンパクの PP2A 結合領域の構造解析

PP2A は A (足場) サブユニット、C (触媒) サブユニットと B (調節) サブユニットからなるヘテロ三量体である (右図参照)。アダプターの IER2 と IER5 は N 末端の相同領域を介して PP2A の B55 調節サブユニットに結合する。この相同領域の構造解析を試みた。この領域を大腸菌内で過剰発現したが、ほとんどが沈殿してしまい精製には至らなかった。そこで PP2A との共発現により IER-PP2A 複合体の精製を試みた。大腸菌内での共発現では PP2A の A サブユニットと C サブユニットの複合体は得られたが、B55 調節サブユニットや IER タンパクを含む IER-B55/A/C 複合体は得られなかった。今後は B55 や IER タンパク質を昆虫細胞で発現し A/C 複合体を添加後、IER-B55/A/C 複合体を得る予定である。



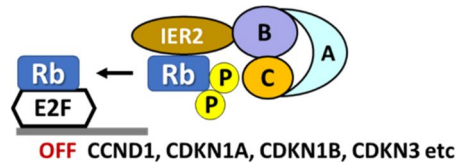
(2) IER2 による細胞周期関連遺伝子の負の発現制御

IER2 は成長因子誘導性遺伝子であり、IER2 タンパク質は細胞周期進行に関わるタンパク質の活性を制御している可能性が考えられた。そこで、IER2 siRNA で処理した細胞における細胞周期制御タンパク質の発現の変動を RT-qPCR 法、ルシフェラーゼアッセイやウェスタンブロット法により分析した。Cyclin A2, B1, D1, E, CDK1, CDK2, CDK4, p21, p27, CDC6, CDC25A, GMNN, DHFR などの発現を調べたところ、IER2 は Cyclin D1, p21, p27 の発現を転写レベルで負に制御することが明らかになった。クロマチン免疫沈降の結果、これらの遺伝子の発現は、おもに RB-E2F1 により制御されることが示された。IER2-PP2A が RB を脱リン酸化することにより、RB 活性が阻害され、E2F1 がこれらの遺伝子の発現を誘導すると考えられた。ウェスタンブロットティング、ホスファターゼアッセイやプルダウンアッセイの結果、IER2 は RB に結合し PP2A による RB のリン酸化 Thr821 と Thr826 の脱リン酸化を促進することが明らかになった。フローサイトメトリーにより細胞周期の進行を解析したところ、IER2 は G1 期の進行を阻害することが示された。これらの結果を右の図にまとめた。



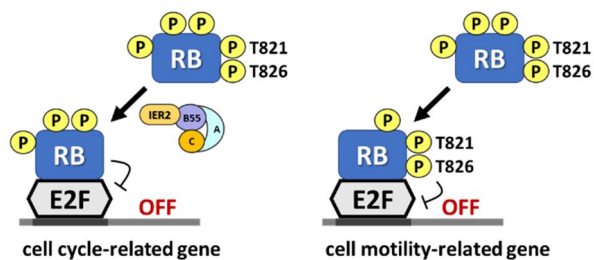
(3) IER5 による細胞周期関連遺伝子の負の発現制御

IER5 についても、ノックダウン細胞や過剰発現細胞を用いて、IER2 と同様の実験を行った。その結果、IER5 は Cyclin A2, D1, E1, CDK1, CDK2, CDK4, p27, DHFR の発現を転写レベルで負に制御することが明らかになった。Cyclin D1 や p27 の発現は RB-E2F1 により制御されるものの、その他 Cyclin A2, E1, CDK1, CDK2, CDK4, DHFR の発現は、おもに RBL1 (p107)/E2F4 で制御されていた (RBL1 は RB と類似の機能を持つ、また E2F4 は E2F ファミリーのメンバー)。IER5-PP2A が RB や RBL1 を脱リン酸化することにより、RB と RBL1 の活性が阻害され、E2F1 と E2F4 が細胞周期関連遺伝子の発現を誘導すると考えられた。これについて検討したところ、IER5 は RB や RBL1 に結合し PP2A による RB や RBL1 の脱リン酸化を促進することが明らかになった。細胞周期の進行を解析したところ、IER5 は G1 期の進行を促進することが示された。これらの結果を右の図にまとめた。



(4) RB-E2F1 の遺伝子特異的な作用機構

RB-E2F1 は細胞運動関連遺伝子群 (MMP9, MMP14, FN1, DDR1, ZEB2 など) の発現を誘導することが報告されている。RB ノックダウン細胞では、これらの遺伝子の発現が増大し、細胞運動が活発になることを明らかにした。しかしながら、IER2 ノックダウン細胞では、細胞周期関連遺伝子の発現は誘導されるのに対して、細胞運動関連遺伝子の発現はほとんど影響を受けなかった。さらなる解析より、Thr821 と Thr826 が脱リン酸化された RB は細胞周期関連遺伝子の発現を抑制するのに対し、細胞運動関連遺伝子の発現には影響を与えないことが明らかになった。したがって、IER2-PP2A による RB の脱リン酸化は、RB-E2F1 の遺伝子特異的な発現調節に深く関与することが示唆された。これらの結果を右の図にまとめた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kuriko Doi, Hiroto Takeuchi, Hiroshi Sakurai	4. 巻 293
2. 論文標題 PP2A-B55 and its adapter proteins IER2 and IER5 regulate the activity of RB family proteins and the expression of cell cycle-related genes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS Journal	6. 最初と最後の頁 745-762
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.16612.	査読の有無 有
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 土居久里子、櫻井博
2. 発表標題 Protein phosphatase PP2AアダプタータンパクによるRbのリン酸化と活性の制御
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 櫻井博、辻琴羽、土居久里子
2. 発表標題 プロテインホスファターゼ2Aとアダプタータンパクによる細胞周期遺伝子の調節
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹内寛人、古賀麻佑子、小林ななみ、土居久里子、櫻井博
2. 発表標題 転写調節因子E2F1のリン酸化による機能制御
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

櫻井 博 https://lab-science.w3.kanazawa-u.ac.jp/member-sakurai.html

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
研究分担者	荒磯 裕平 (Araiso Yuhei) (20753726)	金沢大学・保健学系・助教 (13301)	

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
---------	---------