

令和 6 年 4 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07126

研究課題名(和文) 前立腺癌関連遺伝子SPOPによるDNA複製ストレス解消の分子基盤

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of attenuating DNA replication stress mediated by a prostate cancer-associated gene SPOP

研究代表者

前川 大志 (Maekawa, Masashi)

慶應義塾大学・薬学部(芝共立)・講師

研究者番号：10771917

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)：本研究では、cullin-3 (CUL3)型ユビキチンリガーゼの基質認識受容体であるSPOP (speckle type POZ protein)によるゲノム不安定化阻止機能の分子機構の解明を目的とした。解析を進めた結果、ヒト不死化皮膚角化細胞において、SPOPがDNA複製のG1期からS期への進行に必須なDNA複製ライセンスングにおいて重要な機能を有することを明らかにした。更に、脂質代謝の観点から解析を進めた結果、DNA複製ライセンスングが止まった細胞では中性脂質分子種が顕著に減少することを見出した。SPOPがG1/S遷移に必要であり、この際に特徴的な脂質代謝が生じている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前立腺癌は男性の罹患率が急増している癌種であり、高齢化社会を迎えている我が国において、その発症機構を解明し、治療法のレパートリーを拡充することは極めて重要である。SPOP (speckle type POZ protein)は前立腺癌患者の約15%においてアミノ酸変異が見られる前立腺癌関連遺伝子である。そこで本研究ではSPOPの分子機能の詳細に迫った。解析の結果、SPOPが前立腺癌細胞におけるDNA複製ストレス解除に関わるだけでなく、正常な皮膚角化細胞においては、DNA複製の正常な進行 (DNA複製ライセンスング)に必須な遺伝子であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the molecular mechanisms of SPOP (speckle type POZ protein), a substrate recognition receptor for cullin-3 (CUL3) ubiquitin ligase-mediated prevention of genomic instability. We found that SPOP has a critical role in DNA replication licensing, which is essential for the G1/S phase transition in HaCaT cells. SPOP knockdown inhibited translation of Cdc6 and Cdt1 mRNA, which are required for DNA replication licensing. Our untargeted lipidomics also showed that neutral lipid species were significantly reduced in SPOP-, Cdc6- or Cdt1-knockdown cells, in which DNA replication licensing was inhibited. Our results suggested that SPOP is required for the G1/S transition, and neutral lipid species may be lipid signatures during the phase.

研究分野：腫瘍脂質生物学

キーワード：SPOP DNA複製 脂質代謝 タンパク質代謝

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子変異や染色体異常等のゲノム不安定性は癌の hallmark の一つである。特に前立腺癌患者の約 60%で TMRSS2-ERG 等の融合遺伝子が見られ、ゲノム不安定性誘導が前立腺癌発症の一因となる。従って、前立腺上皮細胞におけるゲノム不安定性維持機構を分子レベルで解明する事は、前立腺癌の発症機構の理解と新規治療戦略開発に資する。SPOP (speckle type POZ protein)は CUL3 型ユビキチン (Ub)リガーゼの基質認識受容体で、約 15%の前立腺癌患者において SPOP に遺伝子変異が認められる。申請者は今までに、SPOP がゲノム不安定性維持に必須な DNA 複製ストレス解消に必要である事を見出している (Watanabe, Maekawa et al., Mol. Biol. Cell. 2020)。我々の真核細胞は新生 DNA 鎖同志の絡み合い (DNA 複製ストレスの一種)の解消機構として、トポイソメラーゼによる積極的な DNA 鎖の切断と TDP による DNA 鎖からのトポイソメラーゼの切断を行っている。申請者は今までに SPOP を前立腺癌細胞で発現抑制すると TDP2 のタンパク質発現が減少する事を見出している。しかしながら、SPOP による DNA 複製ストレス解消の詳細な分子基盤は良く分かっていない。更に、癌化する前の正常細胞における SPOP の機能については殆ど不明なままである。

## 2. 研究の目的

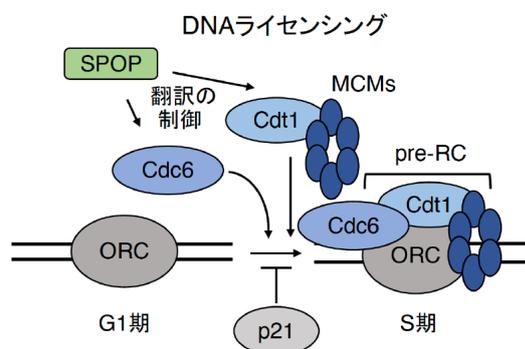
以上の研究開始当初の背景を踏まえ、本研究では SPOP の DNA 複製における詳細な分子機構および、正常細胞における SPOP の機能を明らかにすることを目的とした。SPOP や前立腺癌をはじめとする多種多様な癌患者においてアミノ酸変異が同定されているため、SPOP 研究の殆どは癌細胞株を用いて進められてきた。そこで本研究では、癌化する前の正常細胞における SPOP の機能により集中して解析を進めた。

## 3. 研究の方法

前立腺癌細胞株として PC3、Du145、LnCaP cells を、癌化する前の正常細胞として不死化されたヒトのケラチノサイトである HaCaT cells を用いた。SPOP の機能を解析する手法として、siRNA のトランスフェクションによる遺伝子発現抑制を採用した。オフターゲット効果を検証するために、siRNA は遺伝子ごとに 2 種類の siRNA oligos を用いた。また、DNA 複製ライセンス因子である Cdc6、Cdt1 についても同様に 2 種類の siRNA oligos を用いて、発現抑制を行った。各遺伝子や各タンパク質の発現レベルは、定量 PCR 法または、ウェスタンブロッティング法により検討した。DNA 複製能は Edu の取り込みとその後のクリックケミストリーによる蛍光色素ラベルにより共焦点顕微鏡 (FV3000) 下で観察した。脂質解析は細胞から一相抽出により脂質画分を抽出し、LC-MS9030 を用いたノンターゲットリポドミクスに供した。データ解析は MS-DIAL4 により実施した。

## 4. 研究成果

PC3、Du145、LnCaP、HaCaT cells において SPOP の mRNA レベルを約 80%減少させる発現抑制系の構築に成功した。この時、全ての細胞株で細胞増殖が著しく阻害された。そこで、SPOP を発現抑制した各種細胞株における増殖や DNA 複製に関連するタンパク質の発現レベルをウェスタンブロッティング法で調べた結果、3 種の前立腺癌細胞株では TDP2 の発現が減少し、HaCaT cells では Cdc6 と Cdt1 の発現が減少していた。このお互いの表現型は別の細胞株で見られなかったことから、前立腺癌細胞株において、SPOP は DNA 複製後の DNA 複製ストレス応答のプロセスにおいて、HaCaT cells においてはその上流の DNA 複製ライセンスのプロセスで機能していることが示唆された。解析を進めた結果、SPOP は Cdc6 と Cdt1 の mRNA の翻訳を正に制御すること、SPOP を発現抑制すると p21 の mRNA レベルが上昇し、細胞増殖が阻害されることが明らかになった。以上より、正常細胞である HaCaT cells において、SPOP は Cdc6 と Cdt1 のタンパク質レベルを適切に維持することで、G1 期から S 期への遷移を制御していることが分かった (図 1; Sanada, Maekawa et al., BBRC. 2023)。



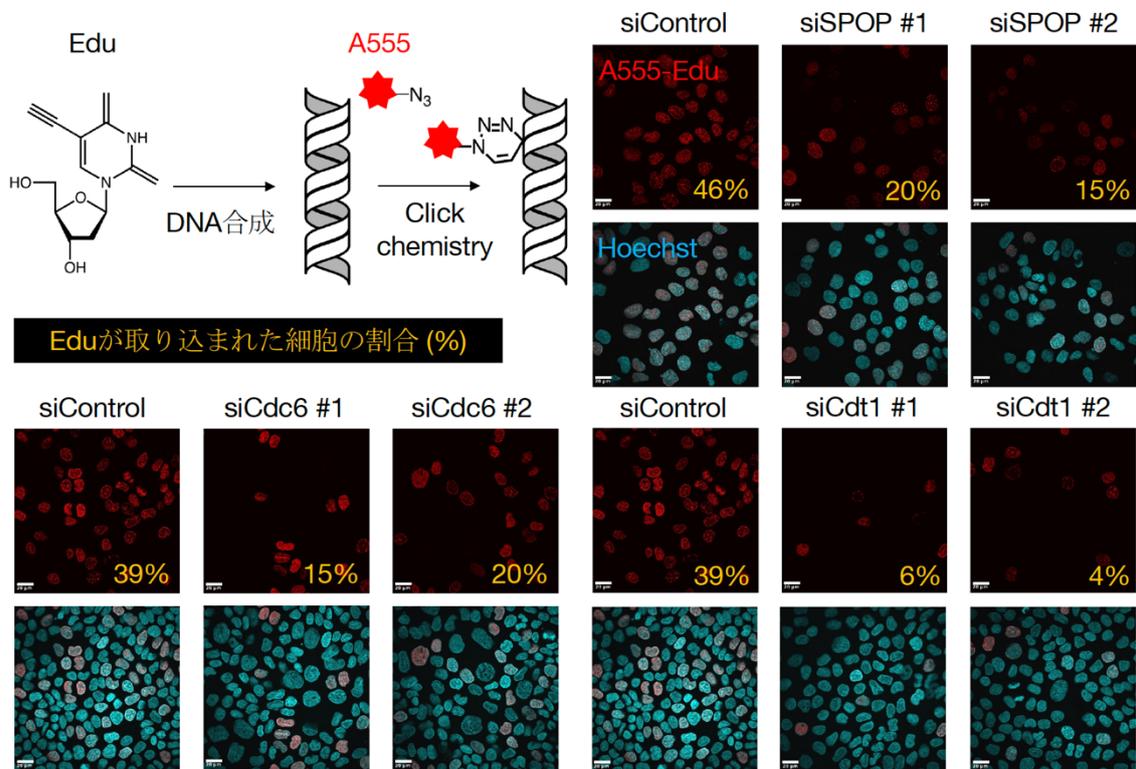
【図1】 Cdc6とCdt1はG1期からS期への移行の際の preRCの形成に必須である (DNAライセンスング)。SPOPはCdc6とCdt1の翻訳を正に制御する。

を進めた結果、SPOP は Cdc6 と Cdt1 の mRNA の翻訳を正に制御すること、SPOP を発現抑制すると p21 の mRNA レベルが上昇し、細胞増殖が阻害されることが明らかになった。以上より、正常細胞である HaCaT cells において、SPOP は Cdc6 と Cdt1 のタンパク質レベルを適切に維持することで、G1 期から S 期への遷移を制御していることが分かった (図 1; Sanada, Maekawa et al., BBRC. 2023)。

解析を進める中で、SPOP を発現抑制した HaCaT cells においてコレステロールプローブ D4H (Maekawa and Fairn. J. Cell Sci. 2015)の細胞内局在が変化することを見出した。この時、HaCaT cells におけるコレステロール量および、コレステロールエステル量は、SPOP の発現抑制により変動しなかった。D4H プローブは生体膜脂質環境によりコレステロールの結合親和性に変化することが知られている。即ち、SPOP の発現抑制により細胞内の生体膜脂質環境が変動している可能性が強く示唆された。そこで次に、SPOP/Cdc6/Cdt1 の軸で制御される DNA 複製ライセンスリングが停止した際の脂質代謝をノンターゲットリポドミクスで計測、解析を行った。

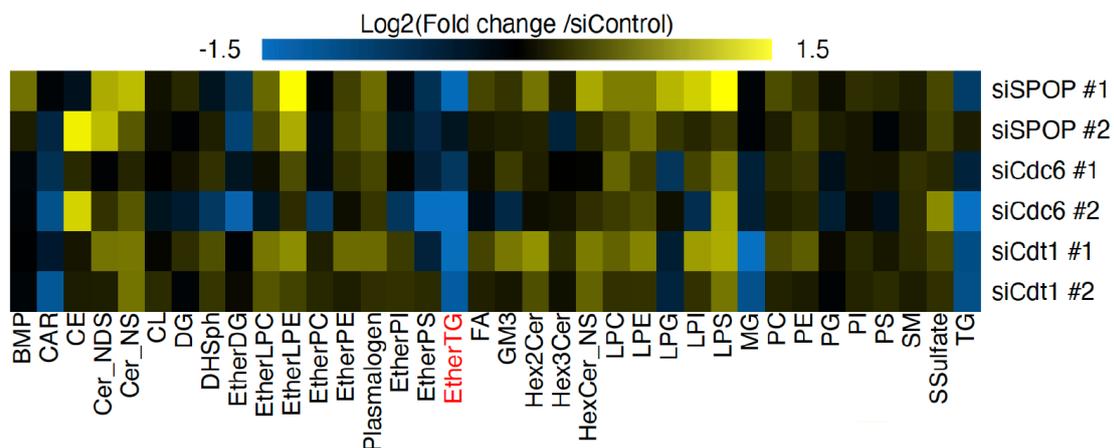
まず、SPOP, Cdc6, Cdt1 を発現抑制した HaCaT cells は、Edu の取り込みが抑制され、DNA の新規合成の抑制と G1 期から S 期への遷移が阻害されていることが確認された (図2)。この状態において、細胞から脂質を一相抽出し、ノンターゲットリポドミクスに供した。その結果、図3に示すように各種脂質分子種のうち、エーテル型のトリアシルグリセロール (エーテル TG) が、3 種の遺伝子の発現抑制において共通して、顕著に減少していることを見出した。これらの結果は、DNA 複製と脂質代謝との間に何らかの因果関係があることを示唆するものである。

また、癌細胞株データベースを用いて Cdc6 が高発現する肺癌細胞株を選定し、Cdc6 低発現肺癌細胞株とで Edu 取り込みと脂質プロファイルと比較した。その結果、Cdc6 高発現細胞株では低発現細胞株と比較し、Edu の取り込み上昇に加えて、エーテル TG の顕著な増加を認めた。これ



【図2】 SPOP, Cdc6, Cdt1をHaCaT cellsにおいて発現抑制すると、EduのDNAへの取り込みが抑制され、DNAの新規合成が阻害される。

Scale bar: 20 μm



【図3】 SPOP, Cdc6, Cdt1をHaCaT cellsにおいて発現抑制すると、中性脂質の一種であるエーテルTGが顕著に減少する。

らの結果より、DNA 複製ライセンスが活性化している細胞ではエーテル TG を含む中性脂質の生合成亢進、または分解抑制が起きていると考えられた。中性脂質分子種の変動が G1 期から S 期への遷移の脂質シグナチュアになりうる。

最後に、上述の中性脂質変動と DNA 複製との因果関係について、阻害剤を用いて検討した。その結果、SPOP を発現抑制した HaCaT cells に TG 分解酵素の阻害剤を添加しても、DNA 複製阻害は回復しなかった。また、SPOP を発現抑制した HaCaT cells にアルキルグリセロールを添加し、初発酵素をバイパスする形でエーテル脂質を増やしても、DNA 複製阻害は回復しなかった。以上より、エーテル TG の減少は DNA 複製阻害の下流で起きており、DNA 複製阻害はエーテル TG の減少が原因で生じている可能性は低いと思われる。

G1 期から S 期への遷移の停止は、老化細胞のシグナチュアの一つとして知られている。また、老化細胞はゲノム不安定性が高頻度で生じる。今後は細胞老化の系における SPOP の発現量や脂質プロファイルを調べていくことで、細胞老化・ゲノム不安定性・脂質代謝変動の因果関係を明らかにしていく。

## 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 Sanada Sayoko, Maekawa Masashi, Tate Sota, Nakaoka Hiroki, Fujisawa Yasuhiro, Sayama Koji, Higashiyama Shigeki	4. 巻 651
2. 論文標題 SPOP is essential for DNA replication licensing through maintaining translation of CDT1 and CDC6 in HaCaT cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 30~38
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.02.012	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 眞田紗代子、前川大志、東山繁樹
2. 発表標題 ヒト角化細胞におけるSPOPの生理機能の解明
3. 学会等名 第81回 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 眞田紗代子、前川大志、田手壮太、戸澤麻美、森秀樹、中岡啓喜、東山繁樹
2. 発表標題 ヒト角化細胞におけるSPOPの生理機能の解明
3. 学会等名 第31回 日本形成外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masashi Maekawa, Ryuta Watanabe, Sayoko Sanada, Shigeki Higashiyama
2. 発表標題 Novel functions of SPOP in the DNA replication process
3. 学会等名 第94回 日本生化学会大会 シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大谷航平, 前川大志, 津川裕司, 有田誠
2. 発表標題 G1/S arrest細胞の脂質シグナチュアの解析
3. 学会等名 第17回 メタボロームシンポジウム
4. 発表年 2023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
---------	---------