

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591834

研究課題名(和文)リン酸化プロテオーム情報を基盤とした放射線感受性機構の解析と予測法の開発

研究課題名(英文)Analysis of cellular radiation-sensitivity by phosphoproteomics

研究代表者

榎本 敦 (ENOMOTO, ATSUSHI)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20323602

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：STK38は、AGCグループに属するプロテインキナーゼである。研究代表者は、これまで様々な癌細胞株において高いSTK38活性が保持されていること、STK38が酸化ストレス特異的に活性化されること、STK38のノックダウンは顕著な放射線増感を誘導すること等を報告してきた。本研究では、STK38の放射線感受性制御における意義を明らかにするためにリン酸化プロテオーム解析を駆使してSTK38の基質探索を行った。これまでに*in vitro*における基質としてDNA修復、細胞周期、細胞死誘導などの放射線応答を制御する因子を複数同定した。現在、これらの基質についてSTK38によるリン酸化の意義を解析している。

研究成果の概要(英文)：STK38 (Serine/threonine kinase 38), also known as NDR1 (nuclear Dbf2-related 1), is a serine/threonine protein kinase belonging to a subclass of the protein kinase A (PKA)/PKG/PKC-like (AGC) family. I have recently reported that STK38 is activated by oxidative stresses such as X-irradiation or H₂O₂, and that knockdown of STK38 enhanced cellular sensitivity to DNA damage. To further clarify a role of STK38 in DNA damage response, I tried to identify a substrate of STK38 using phosphoproteome analysis. I have identified not less than 30 *in vitro* substrates, some of which are known to be implicated in DNA damage response such as DNA repair, cell cycle checkpoint arrest, and apoptosis. I have investigated the significance of the STK38-mediated phosphorylation of their substrates

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：リン酸化プロテオーム STK38 放射線感受性

1. 研究開始当初の背景

Serine-Threonine Kinase 38 (STK38) は、Protein kinase A/C/G ファミリーに属するセリン・スレオニンキナーゼである。酵母ホモログ Dbf-2 は、分裂制御因子として機能していることが知られている。一方、研究代表者は、哺乳類細胞において STK38 がアポトーシス誘導に重要な役割を果たすストレス応答 JNK シグナルの活性化を抑制することを明らかにした (Enomoto et al., Oncogene, 2008)。

STK38 は、X 線や H₂O₂ などの酸化ストレスによって顕著に活性化され、その活性化は、PI-3K 阻害剤 Wortmannin によって抑制されることを見出した (榎本ら, 放射線生物研究, 2008)。また PI-3K 経路に着目した生化学的な解析から、AKT の基質である GSK-3 が、STK38 の Serine 6 (S6), Threonine 7 (T7) をリン酸化し、それらのリン酸化によって STK38 活性が抑制されていることを明らかにした。また多くのヒト癌細胞株では正常細胞より高い STK38 活性を有していることが判明した。このことから、STK38 を標的とすることにより、増感が可能となるのではないかと考え、siRNA 導入により放射線増感を検証した。その結果、STK38 を標的とすることにより、ヒト子宮頸癌由来 HeLa, ヒト乳癌由来 T47D, ヒト胎児腎由来 HEK293T 細胞などにおいて、JNK シグナルの亢進と細胞死の増強が顕著に見られ、増感効果が認められた。これらの結果から、酸化ストレス誘発活性化の意義は、過度のストレスシグナルを抑制し、細胞を防御することにあると推測した。しかしながら、STK38 の細胞内基質や増感に至るプロセスの詳細な分子メカニズムについては、未解明であった。

2. 研究の目的

タンパク質のリン酸化は、タンパク質の安定化、酵素・転写因子等の活性化制御、タンパク質間の相互作用・複合体形成など様々な生命現象における重要な調節機構である。特に、放射線応答の初期過程においては、リン酸化を始めとした翻訳後修飾が、DNA 修復、細胞周期、細胞死の誘導等の制御に深く関わっており、その後の細胞の運命を決定する上で、重要な役割を果たしている。STK38 を標的として放射線増感が誘発されることから、STK38 がリン酸化を介した細胞運命決定機構において重要な役割を担っていると示唆される。STK38 シグナル伝達の解明は、放射線感受性や癌化のメカニズム機構のみならず新しい治療法の開発に有用な情報を与えることが大いに期待される。そこで、本研究は、これまでに構築した STK38 を標的とした放射線増感法を用いて、リン酸化プロテオーム情報を基盤とした放射線増感メカニズムの解明と感受性予測への応用を目指す。

3. 研究の方法

これまでに研究代表者は、多くのヒト癌細胞株で STK38 活性が亢進していることおよび複数の癌細胞株で STK38 を標的として放射線増

感が起こることを見出している。そこで増感の有無 (未処理、X 線単独照射、*stk38* siRNA を導入しかつ X 線照射) におけるリン酸化タンパク質の挙動を解析するため、各細胞群のトータルタンパク質からリン酸化タンパク質特異的カラムを用いてリン酸化タンパク質画分を精製したのち、二次元電気泳動を行った。またリコンビナント活性化型 STK38 と細胞抽出液を用いて *in vitro* kinase assay を行い、キナーゼ反応物を二次元展開した。次にリン酸化タンパク質染色法により、増感細胞に特異的に変化するリン酸化タンパク質あるいは活性化型 STK38 によってリン酸化されるスポットをスクリーニングする。スクリーニングの結果、候補となるタンパク質をゲルスポットカッターにより切り出し、トリプシン消化を行った後、精製した。次に精製したタンパク質を質量分析法によって解析を行い、分子量情報を得たのち、トリプシン消化物の分子量データベースをもとにした質量分析用検索エンジン (MASCOT Research) を行い、同一の消化パターンを持つタンパク質を探索した。質量分析法により同定された放射線感受性制御因子の候補について、そのタンパク質をコードする遺伝子の過剰発現もしくは siRNA 発現ベクターを構築した。また候補因子が STK38 のダイレクトな基質であるかを *in vitro* kinase assay により検討する。また STK38 の発現量とその候補因子のタンパク質安定性、リン酸化/活性化との相関について、その候補因子に対する特異的抗体または抗リン酸化抗体を用いた Western blot により解析した。

4. 研究成果

タンパク質相互作用解析や二次元電気泳動そしてリン酸化タンパク質染色法などのプロテオーム解析を駆使して STK38 の基質探索を行った結果、これまでに、*in vitro* における基質として 30 種以上のタンパク質を同定した。それらの中には、DNA 修復、チェックポイント制御、アポトーシス誘導などの放射線細胞応答を制御する因子が複数含まれていることが判明した。リン酸化部位変異体の解析から、ある細胞周期制御に関わることが知られているタンパク質に関しては、STK38 によるリン酸化が、細胞内のそのタンパク質の安定性を制御する上で重要な意義を担っていることが判明した。さらに *stk38* ノックダウン細胞においては、X 線照射後の G2 期停止の細胞の割合が低下していた。STK38 によるその基質の安定性と DNA 損傷誘発 G2 期停止の関連においてさらに研究を進める必要がある。現在、その他の基質について、欠失変異体やリン酸化抗体を用いて、リン酸化部位の同定を進め、リン酸化部位変異体を作製して STK38 によるリン酸化の意義を解析している。

一方、STK38 相互作用因子として HSP90 を同定した。面白いことに HSP90 阻害剤 17-AAG は、STK38 の遺伝子発現を低下させることが

判明した。STK38 遺伝子のプロモーター解析から 17-AAG は Sp-1 のプロモーター領域への結合を阻害すること、そしてこの阻害は 17-AAG による Sp1 分解に起因していることが判った。17-AAG は、放射線増感剤としての有用性が期待されている。STK38 のノックダウンが放射線増感を起こすことことから、17-AAG の増感メカニズムの 1 つとして STK38 の遺伝子発現抑制が考えられた。

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 5 件)

1) A. Miyasaka, K. Oda, Y. Ikeda, O. Wada-Hiraike, T. Kashiyama, A. Enomoto, N. Hosoya, T. Koso, T. Fukuda, K. Inaba, K. Sone, Y. Uehara, R. Kurikawa, K. Nagasaka, Y. Matsumoto, T. Arimoto, S. Nakagawa, H. Kuramoto, K. Miyagawa, T. Yano, K. Kawana, Y. Osuga, T. Fujii. Anti-tumor activity of olaparib, a poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitor, in cultured endometrial carcinoma cells. BMC Cancer 14 (2014) 査読有

2) A. Morita, S. Ariyasu, S. Ohya, I. Takahashi, B. Wang, K. Tanaka, T. Uchida, H. Okazaki, K. Hanaya, A. Enomoto, M. Neno, M. Ikekita, S. Aoki, Y. Hosoi. Evaluation of zinc (II) chelators for inhibiting p53-mediated apoptosis. Oncotarget. 4 (2013) 2439-2449. 査読有

3) A. Enomoto, T. Fukasawa, N. Takamatsu, M. Ito, A. Morita, Y. Hosoi, and K. Miyagawa. The HSP 90 inhibitor 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin modulates radiosensitivity by downregulating serine/threonine kinase 38 via Sp1 inhibition. Eur. J. Cancer. 49 (2013) 3547-3558. 査読有

4) A. Enomoto, N. Kido, M. Ito, N. Takamatsu, and K. Miyagawa. Serine-Threonine Kinase 38 is regulated by Glycogen synthase kinase-3 and modulates oxidative stress-induced cell death. Free Radic. Biol. Med. 52 (2012) 507-515. 査読有

5) 深澤 毅倫、榎本 敦、宮川 清
「STK38 の機能と分子標的としての可能性」
放射線生物研究 47 (2012)8-21. 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

1) 第 16 回癌治療研究増感シンポジウム
「STK38 は放射線細胞応答を多面的に制御する」
2014 年 2 月 8 日、奈良県奈良市奈良県文化会館、榎本 敦、深澤 毅倫、宮川 清
2) FIRST 合同国際シンポジウム
「HSP90 阻害剤 17-AAG は Sp1 阻害を介した STK38 ダウンレギュレーションにより放射線増感を起こす」2014 年 2 月 24 日、札幌市

札幌パークホテル、榎本 敦、宮川 清

3) 第 36 回日本分子生物学会年会
「酸化ストレス応答と STK38」2013 年 12 月 3 日、兵庫県神戸市神戸国際会議場、榎本 敦、

4) 日本放射線影響学会第 56 回大会 WS
「酸化ストレス応答と STK38」2013 年 10 月 19 日、青森県青森市ホテルクラウンパレス青森、榎本 敦

5) 東京大学医学系研究科疾患生命工学センター 10 周年記念シンポジウム

「リン酸化プロテオーム情報を基盤とした放射線感受性メカニズムの解析」2013 年 9 月 25 日、東京都文京区伊藤国際学術研究センター、榎本 敦、深澤 毅倫、宮川 清

6) 第 15 回癌治療研究増感シンポジウム
「STK38 は放射線細胞応答を多面的に制御する」2013 年 2 月 10 日、奈良県奈良市猿沢荘、

7) 第 35 回日本分子生物学会

「A role of STK38 in DNA damage response」
2012 年 12 月 13-14 日、福岡県博多市福岡国際会議場、榎本 敦、深澤 毅倫、宮川 清

8) 第 55 回日本放射線影響学会大会

「基質からみた STK38 の放射線感受性制御における役割」2012 年 9 月 7 日、東北大学医学部キャンパス、榎本 敦、深澤 毅倫、宮川 清

9) 第 41 回制癌シンポジウム

「HSP90 阻害剤 17-AAG による STK38 を介した放射線増感」2012 年 6 月 30 日、沖縄県那覇市カルチャーリゾートフェストーネ、榎本 敦、深澤 毅倫、宮川 清

10) 第 34 回日本分子生物学会

「STK38/NDR1 の発現制御機構の解析と酸化ストレス増感への応用」2011 年 12 月 15 日、神奈川県横浜市パシフィコ横浜、榎本 敦、伊藤 道彦、高松 信彦、宮川 清

11) 第 54 回日本放射線影響学会大会

「HSP90 阻害剤 17-AAG の新しい放射線増感メカニズム」2011 年 11 月 19 日、兵庫県神戸市神戸商工会議所、榎本 敦、深澤 毅倫、宮川 清

〔図書〕(計 2 件)

1) 「リン酸化タンパク質研究用ポリアクリルアミドゲルスーパーセップ Phos-tag を用いた放射線照射後のリン酸化タンパク質の解析」
榎本 敦 和光純薬時報 1 (2014) p36.

2) 「放射線細胞応答に至るシグナル伝達のメカニズム解析と増感への応用」 榎本 敦
放影協ニュース 4 (2014) p9-10.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

榎本 敦（ENOMOTO ATSUSHI）

東京大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20323602

(2)研究分担者

（ ）

研究者番号：

(3)連携研究者

（ ）

研究者番号：