

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590360

研究課題名(和文)哺乳類Mitotic Exit Networkの腫瘍抑制機構解明

研究課題名(英文)Elucidation of tumor suppressive role of mammalian Mitotic Exit Network

研究代表者

國仲 慎治(Kuninaka, Shinji)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10404336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：ノックアウトマウスの解析より細胞周期進行におけるcdk1(cyclin-dependent kinase1)の重要性が再認識されているが、その制御機構は酵母と比較すると十分明らかになっていないのが現状である。申請者は酵母でcdk1制御を司るシグナル伝達系であるMitotic Exit Network(MEN)の哺乳類における意義を明らかにすることを目的として本研究を行った。その結果、哺乳類MENは酵母と異なるシグナル伝達を介して機能している可能性が強く示唆された。この違いが単細胞生物と多細胞生物の差異に由来するか否かを含め、高等生物におけるMENシグナル伝達の意義を今後も検討したい。

研究成果の概要(英文)：Recent advance of knock out mice study has focused on the importance of Cdk1 on cell cycle progression. However, our understanding of Cdk1 regulation is still limited compared with that of yeast Cdk1. We carried out this project to reveal the significance and signaling mechanism of mammalian MEN (mitotic exit network), one of the Cdk1 regulatory signaling cascade originally found in budding yeast. Although each component of MEN is highly conserved to human, our data strongly suggest signaling of mammalian MEN (e.g. downstream target) is somewhat different from that of the yeast one. Further analysis will be required to elucidate the content of this difference.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：Mitotic Exit Network LATS1 MYPT1 PLK1 APC/C CDC26

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

正常細胞や癌細胞の増殖に重要な役割を果たしている Cyclin-dependent kinase1 (Cdk1) の制御機構として、Mitotic Exit Network (MEN) というシグナル伝達系が出芽酵母に存在する。MEN の個々の構成分子は進化上も高度に保存されているが、哺乳類における同シグナルの詳細は依然不明な点が多い。

2. 研究の目的

出芽酵母 MEN 構成分子である Dbf2 キナーゼは、Cdc14 ホスファターゼを直接リン酸化することでその局在変化(核小体から細胞質へ)を促進することが知られている。しかし Dbf2 のヒトホモログである LATS1 がホスファターゼを基質とすることはこれまで知られていなかった。そこで本研究は LATS1 の下流に位置するホスファターゼを同定することで、ヒトにおける MEN シグナル伝達機構とその意義を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 質量分析による LATS1 基質スクリーニング

慶應義塾大学(現 京都大学)の石濱泰博士との共同研究としてスクリーニングを行った。具体的には脱リン酸化した HeLa 細胞溶解液を基質としてリコンビナント LATS1 タンパクにより試験管内キナーゼ反応を行った。キナーゼの無い対照反応も同時に行い、ジメチル標識法を用いて両者で得られたリン酸化ペプチドを比較し、LATS1 特異的なリン酸化ペプチドを同定した。

(2) 部分欠失変異体を用いたリン酸化部位の同定と同部位に対するリン酸化抗体の作成
大腸菌培養液から精製分離した変異体リコンビナント蛋白の試験管内キナーゼ反応でリン酸化領域の絞り込みを行い、候補領域を同定する。次に候補領域に含まれているセリン・スレオニン残基をアラニンに置換した変

異体を用いて同様の実験を行い、リン酸化部位を同定する。次いで同部位に対する特異的リン酸化抗体を作成する。

(3) 特異的リン酸化抗体を用いた細胞内での LATS1 基質の確認

LATS1 活性化刺激(DNA ダメージやノコダゾールなど)により標的ホスファターゼのリン酸化変化を上記抗体で検討する。

(4) LATS1 によるリン酸化が標的ホスファターゼの機能・局在におよぼす影響

同定されたリン酸化部位をグルタミン酸などの酸性アミノ酸に置換し、変異ホスファターゼの機能変化を検討する。

(5) MEN の酵母とヒトにおける差異

LATS1 によるホスファターゼリン酸化が分裂期におよぼす影響を明らかにして、酵母との違いの有無を検討する。具体的には、タイムラプス顕微鏡などを用い、ホスファターゼリン酸化の有無による分裂期動態変化を観察する。

(6) ホスファターゼ以外に MEN に関連すると思われる LATS1 基質の同定とその生理的意義の解明

4. 研究成果

(1) 質量分析による LATS1 基質スクリーニング

当初の予想に反して申請者らのスクリーニングでは Cdc14 を基質として同定出来なかった。蓋然性の高い標的は Myosin Phosphatase-Targeting Subunit1 (MYPT1) と Protein phosphatase 1 regulatory subunit 11 (PP1RB) の2つのみであった。今回、前者を中心に解析した。

(2) MYPT1 リン酸化部位の同定

1090 アミノ酸からなる MYPT1 を 3 等分して試験管内キナーゼ反応を行ったところ LATS1 のリン酸化部位は中央部 (アミノ酸 345-653) に存在することが明らかになった。同部位に存在するセリン (S)・スレオニン (T) 12 残基のうち S445, S473, S507, T508, S509 の 5 残基が LATS1 の標的であることを見出した。実際に同部位すべてをアラニンに置換した 5A 変異 MYPT1 は LATS1 によるリン酸化が顕著に低下した。リン酸化抗体は MYPT1 S445 に対する抗体を Dundee 大学 Alessi 博士が作成しており、一部分与を得て以後の実験に用いた。

(3)特異的リン酸化抗体を用いた in vivo リン酸化の確認

LATS1 による MYPT1 リン酸化が試験管内だけではなく細胞内でも起こっていることを証明するため、上述した S445 リン酸化抗体を用いた。今回 DNA 損傷刺激 (放射線、アドリマイシン処理) による LATS1 活性化に特に着目した。同刺激により S445 リン酸化が増加すると共に LATS1 のノックダウンによりそのリン酸化が減少することから in vivo リン酸化を確認できた。

(4)LATS1 の MYPT1 活性化と Polo-like kinase1(PLK1)の抑制

(2)で述べた 5 つのリン酸化部位のうち S445 のみが ショウジョウバエホモログにおいても保存されていた。また S445 をアラニンに置換した S445A 変異体は 5 か所すべてを置換した 5A 変異体と同程度までホスファターゼ活性が低下していたことから、LATS1 の MYPT1 活性制御における S445 の重要性が明らかになった。また分裂期において野生型 MYPT1 と同様に 5A 変異体は中心体に局在したことから、LATS1 による MYPT1 リン酸化は局在ではなくホスファターゼ活性に関与していることが示唆された。この結果と一致するように

LATS1 と PLK1 の新しい関係も明らかになった。MYPT1 が PLK1 の活性化リン酸化部位 T210 を脱リン酸化してその機能を抑制することが報告されていたが、ノコダゾールによる分裂前期停止に伴う PLK1 活性化を LATS1 ノックダウンが MYPT1 ノックダウンと同程度に増強した。さらに MYPT1 過剰発現により見られた PLK1 T210 リン酸化低下が MYPT1 5A 変異体では減弱したことなどから、LATS1 は MYPT1 を介して PLK1 活性を抑制することが明らかになった。

(5) MEN の酵母とヒトにおける差異

出芽酵母 MEN に相同な分裂酵母のシグナル伝達系として SIN(septation initiation network)がある。MEN が Cdk1 の抑制と共に細胞質分裂にも関与する一方で SIN は細胞質分裂と G2/M 期制御に関与することが報告されている。Cdk1 の細胞増殖における重要性を考えると、この違いは驚きであるが、その意味するところは未だ不明である。申請者らはヒト MEN の重要な構成分子 LATS1 が MYPT1/PLK1 を介して DNA 損傷 G2 チェックポイントに関与していることを示すデータを得た。分裂酵母の LATS1 ホモログ Sid2 が G2/M 期進行に関与することを示すデータが最近報告されたことから、MEN シグナルの意義の統一的理解は未だ混迷の中にあると云える。申請者はその違いが多細胞生物と単細胞生物の差異に由来している可能性を今後検討する予定である。

(6) ヒト MEN シグナル伝達系の解析

本研究より分裂酵母 MEN と異なりヒトでは Cdc14 を介さない分裂期制御を行っている可能性が明らかになった。そこで Cdc14 の標的である APC/C^{Cdh1} が LATS1 により直接制御を受けている可能性を検証してみたところ、APC/C の構成分子である Cdc26 が LATS1 の新規基質であることを初めて明らかにするこ

とが出来た。LATS1はCdc26のT7をリン酸化し、その結果Cdc26はAPC/C複合体から遊離することが示唆された。今後もLATS1によるAPC/Cの新規制御機構の詳細を明らかにするべく研究を継続していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Masuda K, Chiyoda T, Sugiyama N, Segura-Cabrera A, Kabe Y, Ueki A, Banno K, Suematsu M, Aoki D, Ishihama Y, Saya H, Kuninaka S: LATS1 and LATS2 phosphorylate CDC26 to modulate assembly of the tetratricopeptide repeat subcomplex of APC/C. 査読有 *PLoS One* 10:e0118662. 2015
doi: 10.1371/journal.pone.0118662

Nishimura K, Oki T, Kitaura J, Kuninaka S, Saya H, Sakaue-Sawano A, Miyawaki A, Kitamura T: APC(CDH1) targets MgcRacGAP for destruction in the late M phase. 査読有 *PLoS One* 8:e63001. 2013
doi: 10.1371/journal.pone.0063001

Kim M, Kim M, Lee S, Kuninaka S, Saya H, Lee H, Lee S, Lim DS: cAMP/PKA signalling reinforces the LATS-YAP pathway to fully suppress YAP in response to actin cytoskeletal changes. 査読有 *EMBO J* 32:1543-55. 2013
doi: 10.1038/emboj.2013.102.

Naoe H, Chiyoda T, Ishizawa J, Masuda K, Saya H, Kuninaka S: The APC/C activator Cdh1 regulates the G2/M transition during differentiation of placental trophoblast stem cells. 査読有 *Biochem Biophys Res Commun* 430:757-62. 2013
doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.075.

Chiyoda T, Sugiyama N, Shimizu T, Naoe H, Kobayashi Y, Ishizawa J, Arima Y, Tsuda H, Ito M, Kaibuchi K, Aoki D, Ishihama Y, Saya H and Kuninaka S: LATS1/WARTS phosphorylates MYPT1 to counteract PLK1 and regulate mammalian mitotic progression. 査読有 *J Cell Biol* 197:625-41. 2012
doi: 10.1083/jcb.201110110.

Takahashi A, Imai Y, Yamakoshi K, Kuninaka S, Ohtani N, Yoshimoto S, Hori S, Tachibana M, Anderton E, Takeuchi T, Shinkai Y, Peter G, Saya H and Hara E: DNA Damage Signaling Triggers Degradation of Histone Methyltransferases through APC/C(Cdh1) in Senescent Cells. 査読有 *Mol Cell* 45:123-31. 2012
doi: 10.1016/j.molcel.2011.10.018.

〔学会発表〕(計 2 件)

國仲慎治、千代田達幸、杉山直幸、石濱泰、青木大輔、佐谷秀行: 分裂期脱出ネットワークによる G2/M DNA 損傷チェックポイント制御 第71回日本癌学会総会 平成24年9月20日(19-20日)。札幌・ホテルロイトン札幌

千代田達幸、國仲慎治、増田健太、有馬好美、津田浩史、青木大輔、佐谷秀行: LATS1/MYPT1を介した新規PLK1活性制御機構 - 分裂期キナーゼの新しい機能連関 - 第71回日本癌学会総会 平成24年9月20日(19-20日)。札幌・ホテルロイトン札幌

〔図書〕(計 1 件)

國仲慎治、佐谷秀行: 細胞分裂 シグナル伝達キーワード事典 編集:山本雅、仙波憲太郎、山梨裕司 羊土社 2012

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ

<http://genereg.jp/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

國仲 慎治 (KUNINAKA, Shinji)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：10404336