



Over-expression of Aurora-A targets cytoplasmic polyadenylation element binding protein and promotes mRNA polyadenylation of Cdk1 and cyclin B1

篠山， 隆司

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2005-10-12

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙2840

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2002840>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 157 】

氏 名・(本 籍) 篠山 隆司 (岡山県)
博士の専攻分野の名称 博士 (医学)
学 位 記 番 号 博ろ第1956号
学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当
学位授与の 日 付 平成17年10月12日

【 学位論文題目 】

Over-expression of Aurora-A targets cytoplasmic polyadenylation element binding protein and promotes mRNA polyadenylation of Cdk1 and cyclin B1
(過剰発現した Aurora-A は cytoplasmic polyadenylation element binding protein を標的とし、Cdk1 と cyclin B1 のメッセンジャー RNAのポリアデニル化を促進する)

審 査 委 員

主 査 教 授 千原 和夫
教 授 黒田 義和
教 授 片岡 徹

ヒト Aurora-A は中心体に存在するセリン/スレオニンキナーゼで、細胞分裂を制御する蛋白である。通常分裂開始前より発現し始め、蛋白質量、酵素活性とも分裂期にピークを持ち、分裂期終了とともに消失する。また、ヒト Aurora-A をげっ歯類の線維芽細胞に過剰発現させると足場非依存性の細胞増殖を起こし、その細胞はヌードマウスの皮下に腫瘍を形成し、さらに様々な悪性腫瘍でヒト Aurora-A の発現亢進が認められているために癌遺伝子と位置づけられている。しかし、ヒト Aurora-A の過剰発現がどのようなメカニズムで癌を引き起こすかについては殆どわかっていない。我々は、ヒト Aurora-A は培養細胞では分裂期に纺錘体に局在するが、ヒト Aurora-A の発現が亢進している乳癌組織においては細胞周期と無関係に細胞質に存在していることに着目した。(Figure 1A) このヒト Aurora-A が活性化型 Aurora-A であるかを Aurora-A リン酸化抗体を用いて免疫染色すると染色されたことから(Figure 1A)、細胞質に存在するヒト Aurora-A は活性化型ヒト Aurora-A である可能性が示唆された。

ヒト Aurora-A のアフリカツメガエルのホモログである Eg2 は、卵母細胞の成熟過程において cytoplasmic polyadenylation element binding protein(CPEB)をリン酸化し、細胞周期関連分子のメッセンジャーRNA(mRNA) 3'非翻訳領域のポリアデニル酸を伸張させ、細胞周期関連蛋白の翻訳を促進することが知られている。この CPEB 蛋白は卵母細胞の細胞質に存在する蛋白であるために、ヒト体細胞でも細胞質に局在するものと思われた。そして、ヒト体細胞、特に腫瘍細胞において、細胞質に過剰発現したヒト Aurora-A がヒト CPEB をリン酸化し、mRNA のポリアデニル化を促進しているのではないかと考え、以下の研究を行った。

ノーザンプロットにおいて、ヒト CPEB mRNA は HeLa (子宮頸癌) , U373 (グリオーマ) , U251 (グリオーマ) , A549 (肺癌) , Panc1 (膵臓癌) , MM-LM (悪性黒色腫) , U2OS (骨肉腫) などさまざまな腫瘍細胞株で発現していた。(Figure 1C) しかし、MCF7 (乳癌) , HCT116 (大腸癌) , SW480 (大腸癌) などいくつかの細胞株でヒト CPEB mRNA の発現を認めなかった。(Figure 1C) ヒト CPEB の細胞内局在を調べるために、pcDNA3-HA-tagged-hCPEB プラスミドあるいは pEGFP-hCPEB プラスミドを細胞内に導入し、ヒト CPEB 蛋白を強制発現させると、ヒト CPEB 蛋白は細胞質優位に局在した。ノーザンプロットにおいて、ヒト CPEB mRNA が発現していた MM-LM 細胞と HeLa 細胞、また発現していない MCF7 細胞において、ヒト CPEB 抗体を用いて内因性ヒト CPEB 蛋白を蛍光免疫染色すると、内因性ヒト CPEB 蛋白も細胞質に局在していることが明らかとなった。(Figure 1E)

次にヒト Aurora-A 蛋白とヒト CPEB 蛋白との結合について解析した。HEK293T 細胞に Flag-tagged ヒト Aurora-A 蛋白と HA-tagged ヒト CPEB 蛋白を過剰発現させ、免疫沈降後にウエスタンプロットを行うと、ヒト Aurora-A とヒト CPEB が結合していることが示された。(Figure 2A) 次にヒト Aurora-A とヒト CPEB との結合が直接的な結合かを検討するために、リコンビナント GST-tagged ヒト Aurora-A 蛋白とリコンビナント maltose

binding protein(MBP)-tagged ヒト CPEB 蛋白を用いて *in vitro* binding assay を行うと、両蛋白が直接結合していることが明らかとなった。(Figure 2B) ヒト Aurora-A のアフリカツメガエルのホモログである Eg2 はアフリカツメガエルの CPEB と N 末端で結合していることが報告されているが、Eg2 のどの部位と結合しているかはまだ報告されていない。したがって、ヒト Aurora-A のどの部位とヒト CPEB が結合しているかを検討するために、C 末端欠失変異体 (Δ C1) 、キナーゼドメイン欠失変異体 (Δ C2) の 2 種類の欠失変異体を作製した。(Figure 2C) これらの変異体を HEK293T 細胞に発現させ、免疫沈降後にウエスタンプロットを行うと、キナーゼドメイン欠失変異体 (Δ C2) では免疫沈降されなかったことから、ヒト CPEB はヒト Aurora-A のキナーゼドメインの部分で結合していることが明らかとなった。(Figure 2D)

アフリカツメガエルでは Eg2 が CPEB をリン酸化することが報告されているので、ヒトでもヒト Aurora-A がヒト CPEB をリン酸化するか否かを検討した。*In vitro* kinase assay を行うと、リコンビナント GST-tagged ヒト Aurora-A はリコンビナント His-tagged ヒト CPEB を強くリン酸化した。(Figure 3A) しかし、酵素不活性型リコンビナント GST-tagged ヒト Aurora-A ではリコンビナント His-tagged ヒト CPEB のリン酸化は認められなかった。(Figure 3A) 次に、ヒト CPEB のリン酸化をウエスタンプロットでの CPEB バンドのシフトアップで解析した。Flag-tagged ヒト CPEB を細胞内に発現させると、55kDa, 57kDa に 2 本バンドが認められた。Flag-tagged ヒト CPEB に HA-tagged ヒト Aurora-A を追加して発現させても 55kDa, 57kDa の 2 本バンドは変わらなかつたが、更に Aurora-A 活性化因子である Ajuba を共発現させると、60kDa にヒト CPEB のシフトアップバンドが認められた。しかし、酵素不活性型 HA-tagged ヒト Aurora-A を強発現させると、57kDa, 60kDa のシフトアップバンドが減弱した事から、このシフトアップバンドはヒト Aurora-A の活性化によって生じたものと考えられた。(Figure 3B) この 57kDa, 60kDa のシフトアップバンドはアルカリリフォスマターゼ処理によって消失、減弱したことから、過剰発現したヒト Aurora-A は細胞内でヒト CPEB をリン酸化することが示唆された。

ヒト Aurora-A によるヒト CPEB のリン酸化部位を同定するために種々のヒト CPEB 変異体を作成し、*in vitro* kinase assay を行うと、ヒト CPEB のアミノ基側の 91~121 アミノ酸の部分でリン酸化されることが見出された(Figure 4A-C)。この部分はアフリカツメガエルの CPEB が Eg2 によってリン酸化される部位とほぼ一致した。

次に、ヒト Aurora-A が mRNA の 3'非翻訳領域のポリアデニル化を促進するかを検討した。野生型ヒト Aurora-A、酵素不活性型ヒト Aurora-A の安定発現細胞株を rat-1 細胞にて作製し、正常 rat-1 細胞、野生型ヒト Aurora-A 安定発現 rat-1 細胞、酵素不活性型ヒト Aurora-A 安定発現 rat-1 細胞それぞれで、細胞周期関連分子(Cdk1, Cdk2, cyclin A2, cyclin B1)の mRNA の 3'非翻訳領域ポリアデニル酸の長さを poly(A) tail assay (PAT assay) にて解析すると、Cdk2, cyclin A2 ではポリアデル酸の長さに殆ど差を認めなかつたが、Cdk

1, cyclin B1 では野生型ヒト Aurora-A 安定発現 rat-1 細胞においては正常 rat-1, 酵素不活性型ヒト Aurora-A 安定発現 rat-1 細胞に比較してポリアデニル酸の長さが伸長していた。(Figure 5A) 次に、ヒト CPEB を発現していない MCF-7 細胞に HA-tagged ヒト CPEB, Flag-tagged ヒト Aurora-A を発現させると、これらを発現していない細胞に比べ cyclin B1, Cdk1 の mRNA のポリアデニル酸の長さが伸長した。(Figure 5B) 更に Aurora-A の活性化因子 Ajuba を HA-tagged ヒト CPEB, Flag-tagged ヒト Aurora-A と共に発現させると、更に cyclin B1, Cdk1 の mRNA のポリアデニル酸の長さが伸張し、酵素不活性ヒト Aurora-A を共発現させるとポリアデニル酸の長さは短縮した。(Figure 5B) 細胞周期、細胞増殖、細胞死などに関係するさまざま分子の mRNA で同様の PAT assay を行ったが、cyclin B1, Cdk1 以外に明らかにヒト Aurora-A、ヒト CPEB の発現によってポリアデニル化が促進されるものは認めなかった。

以上の結果より、ヒト Aurora-A が過剰発現したヒト体細胞において、細胞質蛋白であるヒト CPEB がヒト Aurora-A の標的分子となり、その結果、細胞周期関連分子 Cdk1, cyclin B1 のポリアデニル化が促進され、mRNA の安定化、さらには蛋白発現亢進に寄与している可能性が考えられた。

| 論文審査の結果の要旨 | | | |
|-------------------------------|---|----|-------|
| 受付番号 | 乙 第 1959 号 | 氏名 | 條山 隆司 |
| 論文題目 Title of Dissertation | Over-expression of Aurora-A targets cytoplasmic polyadenylation element binding protein and promotes mRNA polyadenylation of Cdk1 and cyclin B1 過剰発現した Aurora-A は cytoplasmic polyadenylation element binding protein を標的とし、Cdk1 と cyclin B1 のメッセンジャーRNA のポリアデニル化を促進する | | |
| 審査委員 Examiner | 主査 Chief Examiner 千原 和夫 副査 Vice-examiner 黒田 喜和 副査 Vice-examiner 片岡 徹 | | |
| 審査終了日 | 平成 17 年 9 月 27 日 | | |

(要旨は 1, 000 字～2, 000 字程度)

ヒト Aurora·A は中心体に存在するセリン/スレオニンキナーゼで、細胞分裂を制御する蛋白である。申請者は、ヒト Aurora·A は培養細胞では分裂期に纺錐体に局在するが、ヒト Aurora·A の発現が亢進している乳癌組織においては細胞周期と無関係に細胞質に存在していることに着目した。リン酸化抗体を用いた解析から、細胞質に局在するヒト Aurora·A が活性化型 Aurora·A である可能性が示唆された。

アフリカツメガエルの卵母細胞の成熟過程において、Eg2(Aurora·A のホモログ) は細胞質蛋白 CPEB(cytoplasmic polyadenylation element binding protein) をリン酸化し、細胞周期関連分子のメッセンジャーRNA(mRNA) 3' 非翻訳領域のポリアデニル酸を伸張させ、細胞周期関連蛋白の翻訳を促進することが知られている。このことから、申請者はヒト体細胞でも Aurora·A が CPEB をリン酸化して、ポリアデニル酸を伸張するかを検討した。ノーザンプロットにおいて、ヒト CPEB mRNA は HeLa, U373, U251, A549, Panc1, MM-LM, U2OS などさまざまな腫瘍細胞株で発現していることを明らかにした。ヒト CPEB の細胞内局在を調べるため、ヒト CPEB 遺伝子を導入して蛋白を強制発現させたところ、ヒト CPEB 蛋白は細胞質優位に局在し、また、内因性ヒト CPEB 蛋白も細胞質に局在していることを見出した。次に、蛋白結合について、免疫沈降法、*in vitro* binding assay 法を用いて解析したところ、ヒト Aurora·A とヒト CPEB は直接結合していることを明らかにした。Aurora·A の変異体を用いた解析から、その結合には catalytic domain が必要であることを見出した。さらにリン酸化について申請者は解析した。*In vitro* kinase assay を行ったところ、ヒト Aurora·A はヒト CPEB を強くリン酸化し、一方酵素不活性型ヒト Aurora·A ではヒト CPEB のリン酸化は認められなかった。Aurora·A 活性化因子である Ajuba とヒト Aurora·A をヒト CPEB と共に発現させると、ヒト CPEB のリン酸化シフトアップバンドが認められたことから、細胞内でもリン酸化されていることを明らかにした。また、ヒト Aurora·A によるヒト CPEB のリン酸化部位を同定するために申請者は種々のヒト CPEB 変異体を作成し、*in vitro* kinase assay を行ったところ、ヒト CPEB のアミノ基側の 91~121 アミノ酸の部分でリン酸化することを見出した。この部分はアフリカツメガエルの CPEB が Eg2 によってリン酸化される部位とほぼ一致した。次に、ヒト Aurora·A が mRNA の 3'非翻訳領域のポリアデニル化を促進するかを申請者は検討した。野生型ヒト Aurora·A、酵素不活性型ヒト Aurora·A の安定発現細胞株を rat·1 細胞にて作製し、細胞周期関連分子(Cdk1, Cdk2, cyclin A2, cyclin B1) の mRNA

A の 3'非翻訳領域ポリアデニル酸の長さを poly(A) tail assay (PAT assay) にて解析した。野生型ヒト Aurora·A 安定発現 rat·1 細胞においては、正常 rat·1、酵素不活性型ヒト Aurora·A 安定発現 rat·1 細胞に比較して Cdk1, cyclin B1 のポリアデニル酸の長さが伸長していた。Cdk2, cyclin A2 ではポリアデニル酸の長さに殆ど差を認めなかった。次に、ヒト CPEB を発現していない MCF-7 細胞にヒト CPEB、ヒト Aurora·A を発現させると、これらを発現していない細胞に比べ cyclin B1, Cdk1 の mRNA のポリアデニル酸の長さが伸長した。更に Aurora·A の活性化因子 Ajuba を追加発現させると、更に cyclin B1, Cdk1 の mRNA のポリアデニル酸の長さが伸張した。また、酵素不活性型ヒト Aurora·A ではポリアデニル酸の長さは短縮した。このことから、ヒト体細胞でも過剰発現したヒト Aurora·A は CPEB を介して cyclin B1, CDk1 の mRNA のポリアデニル酸を伸張することを明らかにした。

本研究は、細胞分裂を制御する蛋白で癌遺伝子産物と位置付けられている Aurora·A について、過剰発現した Aurora·A による細胞の癌化のメカニズムを研究したものであるが、従来知られていなかった“ヒト Aurora·A がヒト体細胞において cytoplasmic polyadenylation element binding protein(CPEB) に直接結合しリン酸化することによって cyclin B1, CDk1 の mRNA のポリアデニル酸を伸長すること”を見出し、Aurora·A によるヒト体細胞の発癌機構について重要な知見を得た価値ある集積である。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。