



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。



【 1 5 7 】

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紡錘体に局在するが、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。

ノーザンブロットにおいて、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 (骨肉種) 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、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。ノーザンブロットにおいて、ヒト CPEB mRNA が発現していた MM-LM 細胞と HeLa 細胞、また発現していなかった 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ブロットを行うと、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 ($\Delta C1$)、キナーゼドメイン欠失変異体 ($\Delta C2$) 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ブロットを行うと、キナーゼドメイン欠失変異体 ($\Delta C2$) 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ブロットでの 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ったが、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ことから、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フォスファターゼ処理によって消失、減弱したことから、リン酸化によるシフトアップバンドであることが明らかとなった。(Figure 3C) 以上のことから、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 ではポリアデニル酸の長さに殆ど差を認めなかったが、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 を発現していなかった 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、酵素不活性型ヒト 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な分子の 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	篠山隆司
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 千原和夫 Chief Examiner 副 査 黒田嘉和 Vice-examiner 副 査 片岡 徹 Vice-examiner		
審査終了日	平成 17 年 9 月 27 日		

(要旨は1, 000字～2, 000字程度)

