

論文概要

○ 主論文題目

Suppression of centrosome amplification after DNA damage depends on p27 accumulation

(p27 タンパク質の蓄積による DNA 損傷後の中心体数異常の抑制)

○ 指導教員

人間総合科学研究科 分子情報・生体統御医学専攻 石井哲郎教授

(所 属)筑波大学大学院人間総合科学研究科 分子情報・生体統御医学専攻

(氏 名) 杉原 英志

目的

中心体は細胞周期と密接に同調し、G1 期から S 期にかけて 2 個に複製し、分裂期にて染色体の両端に配置され、染色体を均等に分配する機能を持つ。中心体の異常によって中心体が過剰に複製されると、分裂期にて染色体の分配異常が生じ、多くのがん細胞でみられる染色体不安定性が起こると考えられている。正常細胞は DNA 損傷時、細胞周期停止や DNA 修復、アポトーシスといった機構が働く。細胞周期が停止した時、中心体の過剰な複製も停止することが細胞の生存にとって非常に重要である。しかしながら、DNA 損傷時における中心体複製制御の分子機構はほとんど明らかになっていない。私はこれまでにがん遺伝子 MYCN を導入した神経芽腫の細胞株において DNA 損傷後に中心体数異常が生じることを明らかにしてきた。本研究は DNA 損傷後、MYCN によって制御される分子機構に着目し、DNA 損傷時における中心体複製制御の分子機構を解明することを目的とした。

対象と方法

神経芽腫細胞株(SHEP)、MYCN もしくは empty vector を導入した SHEP 株 (SEHP/MYCN, SHEP/vector)、マウス野生型胎児線維芽細胞(MEF)、p27^{-/-}-MEF、p53^{-/-}-MEF、ヒト正常線維芽細胞(NB1RGB)を対象として研究を行った。各細胞株は DNA 損傷として γ 線もしくは Doxorubicin 処理を行い、その後のタンパク質の動向をウエスタンブロット法、免疫沈降法、RNA の動向は RT-PCR を行い、検出した。中心体は γ -tubulin 及び centrin-3 の免疫染色にて染色し、計測した。DNA 含有量は PI 染色による Flow cytometry にて検出した。HA-p27 発現ベクターや各種 siRNA は常法通り、遺伝子導入を行った。

結果

中心体複製制御に関わるタンパク質の発現量を SEHP/MYCN 細胞と SEHP/vector 細胞において γ 線照射後、経時的に調べたところ、p27 のタンパク質量が SEHP/MYCN 細胞において著しく低下していることがわかった。そこで、p27 発現ベクターを SEHP/MYCN 細胞へ導入し、 γ 線照射後の中心体数を調べたところ、中心体数異常が抑制された。これらの結果から、MYCN による中心体数異常は p27 の低下が原因であることが示唆された。

次に、正常細胞においても p27 の発現低下は DNA 損傷後の中心体数異常を誘発するのではないかと考えた。そこで、p27^{-/-}-MEF へ同様に γ 線を照射したところ、野生型に比べ、有意に中心体数異常が増加することがわかった。また、増加した中心体は一对の中心小体を持つことと、p27^{-/-}-MEF が多核化しなかったことから DNA 再複製に伴う中心体数異常でないことがわかった。加えて、p27 の siRNA を処理したヒト正常線維芽細胞へ γ 線を照射しても中心体数異常が増加し、分裂期に多極紡錘体形成による異常な分裂像を呈した。以上の結果から、p27 は DNA 損傷時の中心体数制御に重要であることが明らかになった。

そこで p27 の DNA 損傷後の挙動を解析したところ、p27 は DNA 損傷後にタンパク質レベルで経時的に増加することがわかった。この増加は p27 のユビキチン結合タンパク質である Skp2 の発現低下と p27 の mRNA の転写増加と相関していた。また、p27 の発現増加は DNA 損傷シグナル応答経路として知られる ATM や p53 の経路を介していないことがわかった。

次に、MYCN による p27 の発現低下の原因を調べたところ、MYCN はユビキチン-プロテアソーム経路を介して p27 タンパク量を減少させていることがわかった。また、SEHP/MYCN 細胞において Skp2 量が増加していることがわかったので、Skp2 の siRNA を同細胞へ処理したところ、p27 のタンパク量が回復し、DNA 損傷後の中心体数異常が抑制された。これらの結果から、Skp2 増加による p27 タンパク量の低下が MYCN の及ぼす DNA 損傷後の中心体数異常の原因であることが明らかになった。

考察

本研究の結果から p27 は DNA 損傷後の中心体数異常を抑制する非常に重要な因子であることがわかった。p27 は細胞周期を負に制御する因子として注目されているタンパク質の一つであるが、本研究では DNA 損傷時の p27 の役割として新たな機能を明らかにした。一般的にがん細胞は染色体数レベルでの異常が頻繁にみられ、近年、中心体数異常がその一因であることが報告されている。また、p27 の発現低下や Skp2 の発現上昇においても多くのがんで報告されており、本研究は p27 による中心体数制御とがんの関連を示唆するものであると考えられる。MYCN は神経芽腫で非常に有力な予後不良因子であり、頻繁に遺伝子増幅や過剰発現がみられるがん遺伝子である。本研究の結果から MYCN は Skp2 を介して間接的に p27 のタンパク量を減少させることで DNA 損傷後の中心体数異常を誘発することが分かった。この知見は過去に報告のない新しい MYCN の機能であり、神経芽腫の悪性化の一因ではないかと考えている。DNA 損傷は抗がん剤、酸化ストレス、炎症反応などで広く見られる現象であり、p27 がこれら DNA 損傷時にタンパクレベルで上昇することによって中心体数の過剰複製を抑制する機構が染色体安定性の維持に働くと考えられる。今後は p27 欠損マウスを使った発がん時における中心体数異常の役割の解明や p53-p21, KLF4 といった別の中心体数制御の経路とどのように関わるかなどを明らかにしていきたいと考えている。

結論

DNA 損傷時における p27 タンパク蓄積という中心体数制御の新しいシグナル経路を明らかにした。また、MYCN は p27 を分解に導く Skp2 の上流に位置することを明らかにした。