

中心体複製の制御因子 SHD1 の発現異常による

ゲノム不安定性誘導機構

(課題番号 17590271)

平成 17 年度～平成 18 年度科学研究費補助金 (基盤研究(C))
研究成果報告書

平成 19 年 3 月

研究代表者 桑原一彦
(熊本大学大学院医学薬学研究部助教授)

はしがき

正常細胞周期ではゲノムの複製に先行して中心体（centrosome）が複製され、染色体の分離、分配に関与するが、癌細胞では中心体複製の異常によって、しばしば染色体の多重化が観察され、その結果染色体不均等分配とゲノム不安定性が生じると考えられている。中心体複製に重要な働きをする SHD1 分子を同定し、この分子の中心体複製制御機構を解析することで、細胞癌化に関連する新規中心体複製メカニズムの一端を明らかにすることを目指した。中心体において SHD1 と結合する分子の探索を行い、新規分子 THP1 を同定した。この分子に対する良い抗体が得られていないため、中心体で SHD1 と実際に結合しているかについてはまだ不明である。THP1 の生体内での機能を明らかにするために、B 細胞特異的 THP1 欠損マウスを作成したところ、末梢 B 細胞数が激減し、成熟 B 細胞の生存維持ができないことが判明した。THP1 の遺伝子ノックダウンでアポトーシスが誘導されることより、ノックアウトマウスにおいて B 細胞数の減少につながったと考えられた。一方、SHD1 の中心体複製における *in vivo*での機能を明らかにする目的で、SHD1 欠損マウスを作成したが、予想に反して顕著な表現系は得られず、生体内で SHD1 の機能を代償する分子の存在が示唆された。また SHD1 の酵母相同分子 Sac3 はセントリンと結合することが報告されているが、マウスの系では SHD1 とセントリンの結合は確認できず、酵母とマウスでは機能が異なることが考えられた。以上の結果を論文として投稿する準備をしている。最後に阪口薫雄教授はじめ多くの共同研究者に感謝の意を表します。

平成 19 年 3 月吉日

桑原 一彦

研究組織

研究代表者： 桑原 一彦 （熊本大学大学院医学薬学研究部助教授）

交付決定額（配分額）

	直接経費	間接経費	合計
平成 17 年度	2,000,000 円	0 円	2,000,000 円
平成 18 年度	1,100,000 円	0 円	1,100,000 円
総 計			3,100,000 円

研究発表

(1) 学会誌

欧文：

1. Nobuo Sakaguchi, Tetsuya Kimura, Shuzo Matsushita, Satoru Fujimura, Junji Shibata, Masatake Araki, Tamami Sakamoto, Chiemi Minoda, and Kazuhiko Kuwahara. Generation of high-affinity antibody against T cell-dependent antigen in gap gene-transgenic mouse. *J. Immunol.* 174:4485-4494, 2005.
2. Satoru Fujimura, Yan Xing, Motohiro Takeya, Yasuyuki Yamashita, Koichi Ohshima, Kazuhiko Kuwahara, and Nobuo Sakaguchi. Increased expression of germinal center-associated nuclear protein RNA-primase is associated with lymphomagenesis. *Cancer Res.* 65:5925-5934, 2005.
3. Yousuke Kawatani, Hideya Igarashi, Takeshi Matsui, Kazuhiko Kuwahara, Satoru Fujimura, Nobutaka Okamoto, Katsumasa Takagi, and Nobuo Sakaguchi. Cutting Edge: Double-stranded DNA breaks in the *immunoglobulin V-region* gene were detected at lower frequency in affinity-maturation impeded GANP^{-/-} mice. *J. Immunol.* 175:5615-5618, 2005.
4. Toshiro Kageshita, Kazuhiko Kuwahara, Masahiro Oka, Donglai Ma, Tomomichi Ono, and Nobuo Sakaguchi. Increased expression of germinal center-associated nuclear protein (GANP) is associated with malignant transformation of melanocytes. *J. Dermatol. Sci.* 42:55-63, 2006.
5. Taichi Ezaki, Kazuhiko Kuwahara, Shunichi Morikawa, Kazuhiko Shimizu, Nobuo Sakaguchi, Kouji Matsushima, and Kenjiro Matsuno. Production of two novel monoclonal antibodies that distinguish mouse lymphatic and blood vascular endothelial cells. *Anat. Embryol.* 211:379-393, 2006.

(2) 口頭発表

平成 17 年度

桑原一彦、阪口薫雄

「RNA プライマーゼ GANP の発現低下による乳癌発症」

第 9 回がん分子標的治療研究会総会、京都、平成 17 年 7 月 1 日

桑原一彦、阪口薫雄

「RNA プライマーゼ GANP のヘテロ欠損マウスにおける乳癌発症」

第 9 回基盤的癌免疫研究会総会、東京、平成 17 年 7 月 14 日

桑原一彦、阪口薫雄

「RNA プライマーゼ GANP の発現低下による乳癌発症」

第 64 回日本癌学会学術総会、札幌、平成 17 年 9 月 14 日

藤村 睦、松井 健、五十嵐英哉、桑原一彦、阪口薫雄

「DNA 脱メチル化による B 細胞分化段階選択的な遺伝子発現」

第 35 回日本免疫学会学術集会、横浜、平成 17 年 12 月 13 日

吉田 尊、桑原一彦、藤村 睦、阪口薫雄

「抗体のクラススイッチに関わる GANP の役割」

第 35 回日本免疫学会学術集会、横浜、平成 17 年 12 月 13 日

桑原一彦、吉田 尊、阪口薫雄

「抗体の親和性亢進における GANP の分子生物学的機能」

第 35 回日本免疫学会学術集会、横浜、平成 17 年 12 月 13 日

平成 18 年度

桑原一彦、阪口薫雄

「GANP の機能異常と乳癌発症」

第 10 回がん分子標的治療研究会総会、東京、平成 18 年 6 月 15 日

阪口薫雄、桑原一彦

「二重鎖切断 (DSB) 制御分子 GANP 欠損と腫瘍発症」

第 10 回基盤的癌免疫研究会総会、札幌、平成 17 年 7 月 14 日

桑原一彦、岩瀬弘敬、阪口薫雄

「二重鎖切断制御分子 GANP 欠損と腫瘍発症」

第 65 回日本癌学会学術総会、横浜、平成 17 年 9 月 29 日

吉田 尊、桑原一彦、阪口薫雄

「Role of GANP in regulation of DNA repair mechanism associated with Ig class-switch recombination」

第 36 回日本免疫学会学術集会、大阪、平成 18 年 12 月 11 日

桑原一彦、吉田 尊、阪口薫雄

「Identification of a novel GANP-associated THP1 protein that is necessary for B-cell maintenance」

第 36 回日本免疫学会学術集会、大阪、平成 18 年 12 月 11 日

(3) 出版物 (総説)

桑原一彦

「タンパク質リン酸化研究におけるアイソトープの活用の一工夫」

細胞工学 RI の逆襲：意外と使えるアイソトープ、25:1204-1205, 2006.

研究成果による工業所有権の出願・取得状況

該当なし

研究成果

正常細胞周期ではゲノムの複製に先行して中心体 (centrosome) が複製され、染色体の分離、分配に関与する。一方、癌細胞では中心体複製の異常によって、しばしば中心体の多重化が観察され、この結果生じる染色体不均等分配とゲノム不安定性は細胞の癌化に寄与すると考えられている。私たちは中心体複製に重要な働きをするマウス分子 SHD1 を同定し、この分子が中心体複製に重要な役割を果たしていることを見出した。そこで細胞癌化に関連する中心体複製メカニズムの一端を明らかにするために、SHD1 が中心体でどのような分子と相互作用するのかを分子レベルで解析した。さらに、SHD1 発現異常によって誘導される中心体複製異常及びゲノム不安定性が実際に腫瘍化の誘導に至るのかを解析する目的で遺伝子変異マウスの作製し、個体レベルで解析した。

中心体における SHD1 結合分子の同定及び解析

これまでの解析で中心体複製に関与することが報告されている分子群 (NPM/B23 や Mps1 など) と SHD1 の会合は確認できていない。また中心体複製機構は Cdk2/cyclin E によるリン酸化が重要であることが明らかにされているが、リコンビナント SHD1 を Cdk は *in vitro* でリン酸化することはできず、SHD1 がリン酸化を受けるというデータも得られていない。このことは、SHD1 がこれまでに知られている分子群とは異なるメカニズムで中心体複製の制御を行っていることを示唆する。そこで、酵母ツーハイブリッド法とプロテオミクス解析を併用して SHD1 結合分子を探索した。その結果、新規分子 THP1 と二種類の既知分子が結合していることが明らかとなった。二種類の既知分子はこれまでに局在が明らかにされており、中心体での局在は否定的だったため、以後 THP1 のみを解析した。マウス THP1 は 399 アミノ酸をコードし、プロテアソームとの相同性を認める。酵母 THP1 は遺伝子の組換え制御に関与することが報告されているが、機能解析はまだ十分に行われていない。THP1 に対する良い抗体は現在までに得られていないため、THP1 が中心体に発現しているかは確定していない。THP1 の生体内での機能を明らかにするために、コンディショナル THP1 欠損マウスを作成し、CD19-Cre マウスとの交配によって B 細胞特異的 THP1 欠損マウスを樹立した。このマウスは末梢リンパ組織において、B 細胞数が激減し、FACS 解析では成熟 B 細胞の集団が減少していた。しかし THP1 欠損マウス B 細胞の増殖能はコ

ントロールマウス由来の B 細胞と比較しても特に差は見られなかった。成熟 B 細胞の減少がアポトーシスによるものかを解析するために、NIH3T3 細胞を用いて THP1 遺伝子のノックダウンを行った。その結果、THP1 遺伝子のノックダウンをした細胞ではアポトーシスの増加を認め、THP1 は細胞の生存維持に重要な働きをしていることが示唆された。

SHD1 欠損マウスおよびトランスジェニックマウスの作成

マウス個体レベルで中心体複製異常が実際に腫瘍化を誘導できるかを検証する目的でコンディショナル SHD1 欠損マウスを作成し、まず B 細胞特異的に SHD1 を欠損させたマウスの解析を行った。このマウスでは B 細胞の増殖、分化は正常に起こり、特に異常を認めなかった。さらに CAG-Cre マウスとの交配により全組織で SHD1 を欠損させたが、この場合も正常に生まれて生育し明らかな表現系を認めなかった。NIH3T3 細胞を用いた *in vitro* の実験では SHD1 発現異常が中心体複製に必須であったが、マウスでは SHD1 の機能を代償する分子が存在している可能性が考えられた。次に、SHD1 を全組織あるいは T 細胞で過剰発現させたトランスジェニックマウスを作成した。腫瘍発生の有無を調べるため、Balb/c マウスへのバッククロスを行った。リンパ細胞の分化に特に異常は認めず、腫瘍発生が見られるか観察した。約半年間の観察では腫瘍は発生しなかったが、今後さらに長期観察する必要がある。

考察

本研究で、SHD1 結合分子の一つとして THP1 を同定することができた。この分子の酵母相同分子は遺伝子組換え制御に関与することが報告されているが、中心体複製に関与するかは現時点では明らかではない。THP1 の機能を *in vivo* で明らかにする目的で B 細胞特異的 THP1 欠損マウスを作成したが、B 細胞分化が障害されてしまうため中心体複製異常をはじめとしたゲノム不安定性誘導などの解析を行うことが困難であった。この点についてはさらなる解析が必要である。また中心体複製における SHD1 の役割を解析するために、遺伝子欠損マウスとトランスジェニックマウスを作成したが、予想に反して著明な表現系は得られなかった。SHD1 は酵母相同分子 Sac3 との相同性から、Sac3 相同領域がその機能に重要であることが考えられている。この領域を持つ遺伝子は最低 3 種類存在し、最近私たちはすべての分子の欠損マウスを作成することに成功している。

これらを交配することで、他の分子による機能の相補性に関して新たな知見が得られることが期待される。