

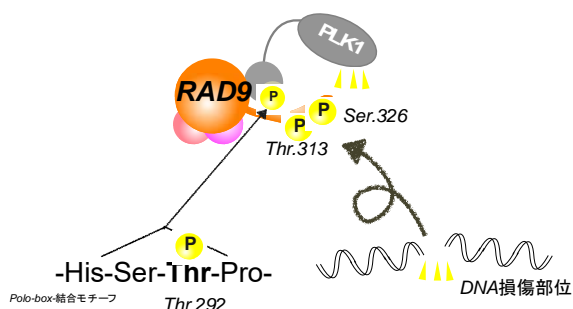
ゲノム DNA 損傷応答における 分裂期促進キナーゼ PLK1 の役割

[1] 組織

代表者：古谷 寛治
(京都大学・放射線生物研究センター)
対応者：田中 耕三
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 45 万円

[2] 研究経過



本研究では、細胞がゲノム DNA 損傷を乗り越えながらも増殖を推し進めるための新たなリン酸化シグナル伝達経路を同定した。例えば、がん細胞は不死化した細胞であり、強い増殖能力をもつことはよく知られている。一方で正常細胞には異常な増殖を防ぐ様々な防御ネットワークが様々な形で備わっていることがわかっており、その一つが DNA チェックポイントと呼ばれる機構である。一般に細胞が放射線・紫外線、DNA 複製阻害剤等に曝され、遺伝情報である DNA に傷が生じると、DNA 上の損傷を感知し、細胞増殖の速度が遅くなるが、我々の同定した新規のリン酸化シグナル経路は、DNA チェックポイント機構のうち、DNA 上の損傷を感知する役割を担う RAD9 タンパク質を損傷 DNA から解離させ、DNA チェックポイント機構の発動を抑えていることが明らかとなった(図)。そのリン酸化を誘導する酵素は PLK1 であった。PLK1 は分裂期の進行を促進する酵素であり、がん細胞に置いて頻繁に高発現することが報告されている。また、がん細胞では DNA 修復機構がうまく働かなくなり、それゆえに DNA 損傷を蓄積し、異常な遺伝子変化を引き起こすことも知られており、我々の PLK1 による

RAD9 へのシグナル伝達経路の知見は、がん細胞の傷つきながらも増殖をし続ける特有の性質を説明するとともに、がん細胞特異的な分子標的を提示するものと期待できる。これらの成果は、eLife 誌に投稿した。また、DNA 損傷ストレスが続く染色体分配へと影響を与えることが知られているが、この研究成果を元にその分子詳細の理解を進めることが可能と思われる。田中教授とは 12 月に開催された染色体ワークショップ(愛知)にて議論を行い、研究の進捗について相談した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

細胞の増殖シグナルの中でも有名なものは CDK (サイクリン依存性キナーゼ) である。我々は DNA チェックポイント機構の活性化を担う RAD9 タンパク質が CDK によりリン酸化を受けることを見出した。

1. RAD9 のリン酸化を認識する抗体(抗 pThr292) や、CDK によるリン酸化を受けない RAD9 変異体タンパク質 (RAD9-T292A) の解析を行うことで、CDK がリン酸化することで RAD9 タンパク質を DNA 損傷部位から解離させ(クロマチン分画実験)、DNA チェックポイント機構を抑制し、細胞増殖の進行が遅くならないようにしていること (FACS 及び DNA コーミングアッセイによる DNA の取り込み速度の測定実験) を見出した。
2. RAD9 のリン酸化部位は PLK (ポロ様キナーゼ: Polo-Like Kinase) と呼ばれるリン酸化酵素が結合する配列と酷似していることを見出した(左図参照)。PLK はリン酸化されたペプチドに結合する Polo-Box domain を有するリン酸化酵素である。5 種類ある PLK タンパク質群のなかでも PLK1 が、リン酸化を受けた RAD9 に直接結合することを試験管内の再構成実験系により示した。
3. RAD9 が受ける PLK1 依存的なリン酸化こそが RAD9 を DNA 損傷部位から解離させるものであることを見出した。PLK1 によるリン酸化部位を質量分析解析により同定した。また、リン酸化を受けない RAD9 は損傷クロマチンから解離しにくくなっていることをクロマチン分画実験により

示し、さらにリン酸化を受けないRAD9を発現するがん細胞ではDNAチェックポイントの発動が強くなっており、本来顕著な影響が見られないDNA損傷ストレス下でもDNA複製期の進行の遅延が起こり、増殖が極端に遅くなること示した(FACS及びDNAコーミングアッセイによるDNAの取り込み速度の測定実験)。

(3-2) 波及効果と発展性など

前述のように、PLK1は細胞分裂期の推進にリン酸化を通じて関与することが知られているほか、多くのがん組織において高発現することも知られている。正常細胞ではPLK1の発現量は低くても細胞の増殖にはあまり影響を与えないが、p53を欠失したり、Ras変異を伴うがん細胞の増殖においてはPLK1の発現量の亢進が必須となっていることも報告されており、「PLK1-addiction」と称するモデルも立てられている。さらには、PLK1の高発現はがん細胞がDNA損傷を誘導する抗がん剤(Gemcitabineなど)に対する耐性を獲得する際の鍵となる因子であることも明らかになっている。我々の知見は、こういったPLK1の機能が亢進したがん細胞での放射線・化学療法に対する耐性をも説明できる、非常に重要なものと思われ、その治療にむけた分子標的を提示する重要な知見と思われる。また、細胞分裂の推進機構がゲノムDNA損傷応答制御と密接な連携をとるという我々の知見は、細胞増殖の関わる多くの生命現象とゲノムDNA損傷ストレス応答との関わりを提示するものと思われる。今後はがん化のみならず、老化、発生などといった生命現象における仕組みの理解へとつながることを期待している。

[4] 成果資料

(原著論文発表)

Wakida T., Ikura M., Kuriya K., Ito S., Shiroiwa Y., Habu T., Kawamoto T., Okumura T., Ikura T., and ***Furuya K.**, The CDK-PLK1 axis targets the DNA damage checkpoint sensor protein RAD9 to promote cell proliferation and tolerance to genotoxic stress., *eLIFE*, (2017) 6: e29953. (京都新聞 12月20日朝刊掲載、関西テレビ「みんなのニュース」12月19日放送)

(口頭発表)

古谷 寛治 「がん増殖におけるDNAチェックポイント因子RAD9とPLK1キナーゼの相互連携の意義」、第19回生命科学研究所シンポジウム□、2017年7月6-7日(京都大学・芝蘭会館)

○古谷寛治、井倉正枝、井倉毅：「ゲノム損傷ストレス下での細胞増殖を保障するCDK-PLK1経路によるDNA損傷シグナリングの調節」、日本放射線影響学会第60回大会、2017年10月25-28日(千葉市、京葉銀行プラザ)

○Kanji FURUYA, Masae IKURA, Tsuyoshi IKURA: "CDK-PLK1 axis targets DNA checkpoint sensor protein RAD9, promoting tolerance to genotoxic stress and cell proliferation.", 33rd International Symposium of Radiation Biology Center, Kyoto University, "Cutting Edge of Radiation and Cancer Biology" 4th-5th December, 2017 (Kyoto COOP-IN)

□○古谷寛治、井倉正枝、井倉毅：「ゲノム損傷ストレス下での細胞増殖を保障するCDK-PLK1経路によるDNA損傷シグナリングの調節」第35回染色体ワークショップ・第16回核ダイナミクス研究会合同開催、2017年12月20-22日、(グリーンホテル三ヶ根(愛知県西尾市))

(ポスター発表)

○古谷寛治、井倉正枝、井倉毅：「ゲノム損傷ストレス下での細胞増殖を保障するCDK-PLK1経路によるDNA損傷シグナリングの調節」、2017年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017)、2017年12月6-9日、(神戸ポートアイランド)