

課題番号 50

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

(京都大学大学院生命科学研究科
附属放射線生物研究センター)

対応者：田中 構三

(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 15 万円

[2] 研究経過

がん細胞の特徴の一つとして、DNA 損傷ストレスに耐性を示し、ゲノム DNA 上に、ある程度の損傷が生じて細胞増殖を続けることが知られている。この耐性を生む機構の一つとして細胞増殖促進キナーゼである PLK1 がゲノム DNA 損傷の感知機構 (RAD9 タンパク質) を抑制し、がん細胞に DNA 損傷ストレス下でも増殖停止が起こりにくくなる仕組みが考えられることをこれまでに報告してきた (eLife 誌、Wakida et al. 2017)。実際 PLK1 のがん細胞における高発現は、放射線療法や化学療法に対する抵抗性を生む原因となることも知られている。

その一方で、がんは多様である。がんの個別情報を網羅した公共のがん情報データベース解析を行うことで、申請者らは、がんの中には PLK1 の発現の高いものや、発現の低いものまで存在することを見出している。例えば、各がん細胞株では下表のように PLK1 の発現量が異なっていた。昨年度までの共同研究においては、こういった、がん情報データベースの解析を通じた知見から、PLK1 の発現が高いがんにおいてはオートファジー経路が亢進していることを示唆する結果を得ていた。そこで、本年の研究課題においては、さらに実験的に PLK1 とオートファジー経路の関連を探ってみた。

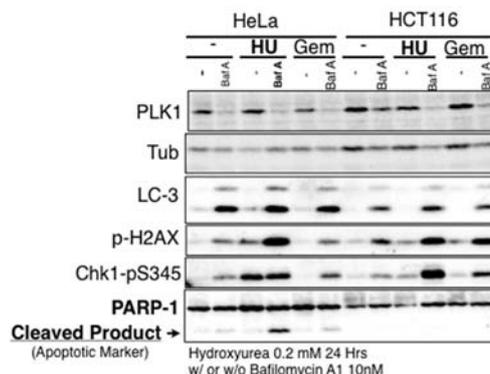
田中耕三教授とは分子生物学会にて議論を行い、進捗状況等を相談した。

	U-2-OS	HeLa	A549	HCT116
B-ACT	1.198	0.684	0.294	-1.344
PLK1	0.556	1.73	-0.765	-0.579
RAD9A	-0.125	-0.188	0.104	-0.321
ATG5	0.479	-1.067	-1.032	0.696
LC3A	-0.879	0.973	0.898	-1.087
LC3B	-0.813	-0.41	0.056	2.178
TUBA1A	0.553	-0.348	-0.227	-0.77
MTOR	-0.527	0.831	-1.984	-0.127

[3] 成果

(3-1) 研究成果

PLK1-RAD9 を共に高発現する 34 株を抽出し転写プロファイルの相関解析から MTOR の発現が PLK1 の転写が亢進したがん細胞において有意に低下していることはすでに見出していた。MTOR は細胞増殖の促進因子であるとともに、オートファジー経路の絶対的な阻害酵素としても知られている。オートファジー経路はアミノ酸原の再利用システムである。正常細胞においてはがん抑制に非常に重要である一方で、がん細胞においてもがんの生存戦略として悪用されていることがわかっているが、がん抑制やがん増殖促進といった側面がオートファジー経路のどのような機



能を反映しているかはわかっていない。そこで、オートファジー経路と Plk1 の発現の関係をより掘り下げることで、がん増殖をより多面的に捉えることができると考え、それを実験的に検証した。

Plk1 を高発現するがん細胞として HeLa 細胞を、Plk1 を発現しない細胞として HCT116 を選出 (左表) した。Plk1 の mRNA が、オートファジー阻害剤の添加後 24 時間で極度に低下することは、昨年度にすでに見出している。タンパク質レベルにおいても昨年度は予備的ながらオートファジー阻害により、HeLa 細胞において Plk1 の発現が低下することを見出していた。また、HCT116 細胞においては Plk1 タンパク質の低下がオートファジー阻害では見られなかった (昨年度予備的ながら報告済み)。次に、オートファジー阻害による、ゲノムストレス応答の違いを探るため、DNA 損傷誘導剤 (ヒドロキシウレア) を同時に細胞に添加した。Plk1 が高発現する HeLa 細胞では、オートファジー阻害とゲノムストレスにより細胞死

(PARP-1 タンパク質の部分分解が指標となる) が強度に誘導された。その一方で HCT116 細胞株ではゲノムストレス下でのオートファジー阻害は細胞死を誘導しなかった。これらの結果はオートファジー経路に依存した PLK1 高発現がゲノムストレス下でのがん増殖に大きく貢献していることを示唆している。

Plk1 の発現は細胞ごと、あるいは細胞周期等の変化に伴い、量変動する。Plk1 の発現とオートファジー経路の亢進が同時に見られるのか、あるいは異なる細胞において並列にみられるのかを知るため、免疫染色法にて、HeLa 細胞に対して Plk1 発現とオートファジー経路の亢進の検証をおこなった。オートファジー経路の亢進は LC-3 抗体を用いて行った。結果、Plk1 の発現が高い細胞において LC-3 抗体によるオートファジーの活性化 (ドット状シグナル) が検出できた。また、ゲノムストレスが亢進するに従い、オートファジーの活性も高くなっていった。このことは、Plk1 とオートファジー経路がゲノムストレス下においては、同期して、細胞内で亢進し、機能することを示していると考えた。現在、計時的、定量的に解析を進めており、代謝制御等との関連も含め検討中である。

(3-2) 波及効果と発展性など

PLK1 は細胞分裂期の推進に関わり、多くのがん組織において高発現する。我々は一連の共同研究を通してがん細胞の多様性を、PLK1 発現が高いもの、低いものを分類し、相関解析から、がんシグナルネットワークの解析を試みてきた。一連の解析ではデータベース解析を駆使し、最後に分子生物実験により検証する、という形を取っている。令和2年度は実験的な検証もしながら、その結果も踏まえデータベース解析も再検討する予定である。実験とデータベース解析を行き来する手法は各種データベースの充実とともに今後、分子生物学研究において非常に重要になってくると思われる。

分子制御という点においてはオートファジー経路がどのようにして転写亢進に関わるかを知ることが重要だと考えている。オートファジー経路はタンパク質の分解を通じてアミノ酸のリサイクルに関わり、核酸代謝にも関わることも知られている。例えば、本研究で示したような転写の調節機構としての仕組みはほとんど分かっていない。転写因子レベルでの活性化なのか、mRNA の安定性なのか、あるいは核酸代謝等に関わる制御なのか、本研究で取り上げる仕組みは、栄養源環境変化やゲノムストレスといった細胞外の状況に応じた細胞増殖の制御機構を知ることにもつながり、ひいてはがんの多様な増殖戦略を知るきっかけにもなると期待している。実際に我々は、RAD9 がヌクレオチド代謝の律速段階を制御する因子と物理

的に相互作用する (令和元年度、未報告) ことをプロテオミクス解析から得ている他、別の実験系から、蛋白合成経路の細胞ごとの量の調節がゲノムストレス下での細胞増殖と密接に関係することを示す結果を得ている (同、未報告)。こういった核酸・アミノ酸代謝とゲノムストレス下での増殖制御の知見は本共同研究における解析の発展から繋がりが見えてきたものであり、今後、さらに幅広い展開が期待できるはずである。

[4] 成果資料

(原著論文、総説論文)

- (1) [Furuya, K.](#), Ikura, M., Ikura, T*.
“Epigenetic interplays between DNA demethylation and histone methylation for protecting oncogenesis.”
J Biochem, Apr. 1 2019, vol.165, pp297-299.

(ポスター発表)

- (1) [古谷寛治](#)、井倉正枝、井倉毅
「データベース解析から紐解くがん細胞のゲノム DNA 損傷ストレス抵抗性獲得戦略」
A new role of autophagy in cancer proliferation signaling revealed by cancer database analysis
第 42 回日本分子生物学会 2019 年 12 月 3-6 日
- (2) [古谷寛治](#)、井倉正枝、井倉毅
「オートファジー機構によるがんシグナル経路の調節」
Interplay between autophagy regulation and cancer signaling
日本放射線影響学会第 62 回大会
2019 年 11 月 14-16 日