

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 耕三

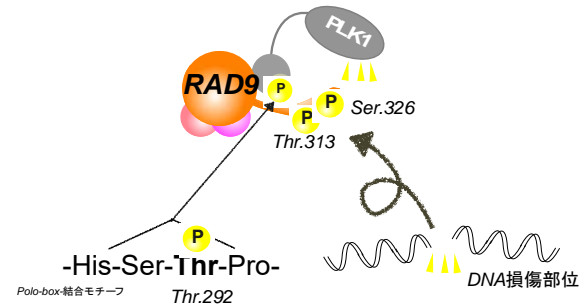
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 20 万円

[2] 研究経過

我々は、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てきた。こういったシグナル伝達経路はがん細胞の生存戦略に転用されている。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おり、がんを理解する上では細胞のストレス応答戦略の理解は重要な知見となる。

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。DNA チェックポイント機構は、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らせる。我々はこのチェックポイント機構を端緒に、新規のリン酸化シグナル経路機構、すなわち、DNA チェックポイント機構における 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る仕組みを明らかにしてきた(右上図)。前年度はそのリン酸化を誘導する酵素が PLK1 であることを示し、報告した(eLife 誌、Wakida et al. 2017)。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、がん細胞特有の傷つきながらも増殖し続ける性質を説明すると期待できた。その一方で、PLK1 はすべてのがん細胞において高発現するわけではないという矛盾もあった。そこで、今年度はがん情



報データベースを中心に解析をすすめることで、どういったがん細胞種において PLK1 が高発現するのか、という点に注目して解析をすすめた。

受け入れ先の田中耕三教授とは第 41 回分子生物学会会場で打ち合わせを行い、今後ともがん増殖における PLK1 を介したリン酸化シグナルを引き続き行うことを確認するとともに詳細な議論をおこなった。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本研究課題における研究戦略は、(i) がん情報データベース解析による全体像の把握 (ii) データベース成果をもとにした分子知見の検証の流れで行なった。がん情報データベースは、近年充実が著しく、がんの転写機構などの細胞種ごとの個別情報が網羅されている。本研究課題では、データベースのなかでも、TCGA (The Cancer Genome Atlas) により、公開されているデータベース情報をカスタマイズし、解析ツールとして用いた。

- (1) 我々は主に培養細胞として確立されているがん培養細胞株を対象としてデータベース解析に着手した。全 971 株のがん細胞株をまず解析したところ、予想に反して PLK1 と RAD9 が共に高発現する傾向が相関解析により明らかとなった。当初はがん細胞においては増殖抑制因子である DNA チェックポイント機構は抑制を受けると考えていたからである。このことから、我々は PLK1 と RAD9 を共に高発現する細胞株を PLK1-RAD9 経路が亢進するがん細胞と定義した。まず、PLK1 を高発現するがん細胞株 108 株、そして RAD9 を高発現する細胞株 164 株をデータベースより抽出し、さらに PLK1-RAD9 を共に高発現する 34 株を抽出した。
- (2) PLK1-RAD9 を共に高発現する 34 株のなかでの

転写プロファイルを比較した。これらの 34 株の相関解析から、いくつかの遺伝子発現が優位に上昇、あるいは低下していることが確認された。このなかで我々が注目したのは **MTOR** である。**MTOR** は栄養源環境を検知し、細胞増殖のスタートを制御するリン酸化酵素であり、なかでもオートファジー経路の絶対的な阻害酵素として重要な機能を果たすことが知られている。

オートファジー経路はタンパク質をアミノ酸源として再利用するリサイクル機構であり、細胞の生存戦略の上で、栄養源環境、増殖状態を繋ぐ重要な位置付けにある。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。

我々の知見は **PLK1-RAD9** 経路の亢進と **MTOR** の機能低下（発現低下）が関連していることを表しており、すなわち、オートファジー経路の亢進と相関があることを示していると考えた。

- (3) 次にこれらのがん情報データベースからの情報を細胞内で実際に起こっているのかを検証することに着手した。仮説として、**PLK1** の高発現がオートファジー経路により亢進を受けると考え、オートファジー阻害に伴い、**PLK1** の転写やタンパク質発現がどういった影響を受けるかを検証した。

mRNA レベルでは、オートファジー阻害剤の添加により、**PLK1** の mRNA が培養後 24 時間で極度に低下することを見出した。また、タンパク質発現も HeLa 細胞において低下することを見出した。ただ、HCT116 細胞においては低下が見られなかった。HeLa 細胞株はもともと **PLK1** の発現が高く、HCT116 細胞株は比較的 **PLK1** の発現が抑えられている。このことは **PLK1** の発現がオートファジー経路により影響を受けるものと受けないものの少なくとも 2 種類あることが言えると考えた。

- (4) 最後にこの **PLK1** 発現がオートファジーに依存するものとししないものとしてどう細胞の応答に違いが見られるか、を調べるため、オートファジー阻害剤と共に DNA 損傷誘導剤である、ヒドロキシウレアを細胞に添加した。HeLa 細胞では細胞死 (**PARP-1** タンパク質の部分断裂を指標にした) が強度に誘導されたのに対し、HCT116 細胞株では細胞死の誘導がみられず、オートファジー経路に依存した **PLK1** 高発現が細胞生存に大きく貢献していることが示唆された。

(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

化シグナル経路の発動を通じて関わ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。その一方で、がん細胞は多様であり、**PLK1** 発現が高いもの、低いものがみられる。こういった増殖形態の違いがどのような細胞応答の違いに現れるのか、また、なぜ違いが生まれるのかは理解されていない。こういった細胞ごとの違いがなぜ生まれるのかという点はがん治療を考える上で重要であると予想できる。

また、オートファジー経路のように、正常細胞ではがん抑制機構として働き、がん細胞においてはがん生存戦略として働く因子では細胞ごとにどのような使い分けがあるのか、という知見を得ることは困難を伴う。我々の知見はまだ、途上ではあるものの、がん情報データベース解析と分子解析を併用することで、こういったがんの多様性獲得戦略を明らかにすることができることを示唆していると考えている。来年度は得られた結果をより詳細な分子解析を用いることで検証することを考えている。

[4] 成果資料

(原著論文、総説論文)

(1) Shingo Nozaki, **Kanji Furuya**, *Hironori Niki. The Ras1-Cdc42 pathway is involved in hyphal development of *Schizosaccharomyces japonicus*. *FEMS Yeast Res.* 2018 Jun 1;18(4). doi: 10.1093/femsyr/foy031.

(2) **Kanji Furuya**, Masae Ikura, *Tsuyoshi Ikura. Epigenetic interplays between DNA demethylation and histone methylation for protecting oncogenesis. *J Biochem.* 2019 Jan 3. doi: 10.1093/jb/mvy124.

(招待講演)

第 91 回日本生化学会大会 2018 年 9 月 26 日
シンポジウム「状態論的考察に立脚した動的生命像」

古谷 寛治

「オートファジー機構から見たがん細胞のゲノム DNA 損傷ストレス抵抗性獲得戦略」

(ポスター発表)

古谷寛治、井倉正枝、井倉毅

「オートファジー機構から見たがん細胞のゲノム DNA 損傷ストレス抵抗性獲得戦略」

The role of Autophagy in cancer cell signaling

第 41 回日本分子生物学会 2018 年 11 月 28-30 日