

課題番号 63

ゲノムストレス応答因子 Plk1 を介したオートファジー経路の 染色体維持機構における機能考察

[1] 組織

代表者：古谷 寛治

(京都大学大学院生命科学研究所
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 15 万円

[2] 研究経過：

がん細胞は、ゲノム DNA 上に、ある程度の損傷が生じてこれら DNA 損傷ストレスに耐性を示す異常な細胞増殖を続けることが知られている。これまでに我々は、この異常増殖時に、DNA 損傷ストレス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 は、がん細胞において高発現となり、それにより、放射線療法や化学療法に対する抵抗性を生むことが報告されていることから、PLK1 の発現調節機構と、がん細胞の悪性化との関連性が示唆されている。

我々のこれまでの成果により、特定の遺伝子の発現異常ががんの異常増殖を引き起こすことが示唆された一方で、がんは多様であることも知られている。この多様ながんの個別情報を網羅した資料として、公共のがん情報データベース解析がある。我々はがん情報データベースの解析を行うことで、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。これまでの共同研究においては、がん情報データベースの解析を通じ、がん細胞種間の違いに関し、PLK1-RAD9 を共に高発現する 34 株を抽出し、転写プロファイルを相関解析から紐解くことで、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を見出していた。MTOR は細胞増殖の促進因子であり、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。すなわち、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。これらの知見は実験的にも (ウエスタンブロット、RT-qPCR) PLK1 とオートファジー経路の相互関係として検証された。オートファジー経路は、アミノ酸源の再利用システムでありかつ正常細胞においてはがん抑制に非常に重要である。その一方で、オートファジー経路は、がん細胞において、がんの生存戦略として悪用されていることも知られている。しかしながら、がん抑制やがん増殖促進といったそれぞれの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かった。われわれのデータベース上の知見から、オートファジー経路の働きを PLK1 の発現の関係を視点に掘り下げることが可能となり、それを通じて、多様ながん細胞種 (ここでは PLK1 発現の異なるがん細胞種) が作られる制御基盤の理解につながると考えた。

以上の知見を踏まえ、我々は、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) していた。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。PLK1 発現量の違いが細胞応答の違いに影響することは、オートファジー阻害 DNA 損傷誘導剤 (ヒドロキシウレア) を同時に細胞に添加することで見出している。すなわち、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

	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

ンパク質の部分分解が指標となる) が強度に誘導された一方で 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。したがって以上の結果はオートファジー経路の違いから PLK1 発現が異なるがん細胞が作られ、ゲノムストレス下でのがん増殖に影響を与えることが示唆された。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

我々の結果は放射線発がんにおいて、オートファジーと PLK1 が協調して働くこと、PLK1 の高発現を介したガン異常増殖を引き起こしうることを示唆しており、放射線発がんとの関わりを示す結果であると考えている。そこで、今回、我々は、どのようなゲノムストレスが、オートファジー依存的な異常増殖へと導くかを引き起こすかを知る目的で、種々の放射線を照射した。照射後、ウェスタンブロット法にて PLK1 のリン酸化と LC-3 のタンパク質の挙動を追ったところ、高線量の放射線照射を高線量率にて行った際に、PLK1 のリン酸化が亢進し、オートファジー機構の活性化を示す、LC-3 の部分分解の亢進が引き起こされた。逆に定線量率においてはこれらの挙動は見られなかった。

こういった結果を、現在並行して進めている、個々の細胞レベルでの解析、すなわち免疫染色法における PLK1 や、PLK1 のリン酸化の発現状況、オートファジー経路の亢進 (LC-3 抗体)、による解析と今後は合わせる予定である。昨年度までに報告したように、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) が検出できている。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。一連の結果から、PLK1 とオートファジー経路がゲノムストレス下、とりわけ、高線量放射線においては、同期して、細胞内で亢進し、PLK1 発現の違いを生み出すことに貢献していることを示していると考え、次年度以降、取り組む予定である。

所内連絡者である田中教授とはメール、電話により議論を行った。

(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している。我々のアプローチである、データベース解析を駆使し、最後に分子生物学実験により検証する、という形は、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。

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

転写の調節機構への関与は知られておらず、既存の仕組みと共通部分があるのかは今後研究をすすめ、理解を深める必要がある。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、次のステップとして個別の細胞間の違いに着目した研究につなげることで、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。

[4] 成果資料

(ポスター発表)

(1) 発表者: 古谷寛治、井倉正枝、井倉毅

講演タイトル「オートファジーを介したリン酸化シグナル調節によるがん細胞のゲノム DNA 損傷ストレス抵抗性獲得戦略: Autophagy mediates phosphorylation-dependent cancer signaling as to acquire the resistance to genomic DNA damage stress」

第 44 回日本分子生物学会年会

2021 年 12 月 3 日