

論文内容の要旨

論文題目 **Pim** キナーゼのがんにおける発現亢進機構、及び増殖促進機構の解明

氏名 森下 大輔

<序>

近年の化学療法の発展にも関わらず、未だがんに対する有効な治療法は確立されておらず、がんは未だ深刻な問題として残されている。発がん、さらにはがんの悪性化においては、細胞増殖・細胞死を制御する **proto-oncogene** の活性化、及び **tumor suppressor gene** の不活性化が深く関わっている。よって、これら遺伝子産物が、どのように活性化・不活性化するか、さらにどのように発がん、及びがんの悪性化に寄与しているかを明らかにすることは、抗がん剤開発において極めて有益な情報をもたらす。

proto-oncogene の1つとして、セリン・スレオニンキナーゼ **Pim** がある。がんにおいて発現亢進した **Pim** は細胞増殖を促進し、また、*pim* transgenic mice は発がん率が上昇する。また、siRNA による *pim* の発現抑制によりがん細胞の増殖は有意に抑制され、*pim* ノックアウトマウスは個体が著しく小さくなる。これらのことから、**Pim** は発がん、細胞増殖を促進すると考えられる。しかし、がんでは発現亢進した **Pim** が細胞周期上のどの段階で、どのような因子を介してがん細胞の増殖を促進しているかについては十分な理解が得られていない。

また、**Pim** はどのような機構で、細胞内で発現が亢進するのかについてもよく分かっていない。**Pim** は翻訳後、自己リン酸化を経て即時に活性型となること、タンパク質の半減期が極めて短いという特徴を有する。よって、**Pim** の活性制御においては、タンパク質自体のキナーゼ活性の制御ではなく、タンパク質量の制御が重要であると考えられており、**Pim** の発現調節の破綻による発現亢進は、細胞増殖、発がんを導く。実際に、がんにおける **Pim** の発現亢進は、**Pim** タンパク質の半減期が正常細胞に比べ 10 倍以上も延長することに起因することが示唆されてきた。しかし、がん細胞において **Pim** の

半減期が延長し、発現亢進する機構については未解明のままである。

本研究において私は、がん細胞において発現亢進した Pim は、細胞周期阻害因子である p27 を翻訳後段階だけでなく、転写段階においても負に制御し、その結果、細胞増殖、がんの悪性化を促進していることを明らかにした。さらに、がん細胞において Pim が発現亢進する機構は、Pim タンパク質の分解異常による半減期の延長であることを初めて明らかにした。

[結果]

<Pim によるがん細胞増殖、悪性化を導く機構の解明>

1. Pim は CDK2 の活性化を伴い、G1/S 期の進行を促進する

まず Pim が細胞増殖を促進する上で、細胞周期上のどの段階を促進しているかを検討し、Pim は G1/S 期の進行を促進していることを見出した。また、Pim は G1/S 期の進行を司る CDK2 の活性を亢進させることを見出した。CDK2 の活性は、CDK 結合タンパク質である CDK inhibitor (CKI) によって制御されている。そこで、Pim が CKI を負に制御している可能性について検討した結果、Pim は CKI の一つである p27 の発現を顕著に抑制した。

2. Pim は p27 Thr157, Thr198 をリン酸化し、核外移行、タンパク質分解を誘導する

Pim が p27 の発現を抑制する上で、キナーゼである Pim が、p27 を直接リン酸化する可能性を想定した。まず p27 の一次配列上における、Pim がリン酸化する consensus 配列の有無を検索し、Thr157、及び Thr198 を含む 2 つの領域を見出した。そこで、Pim が p27 Thr157, Thr198 をリン酸化する可能性を検討した結果、Pim は p27 Thr157, Thr198 を直接的にリン酸化することを明らかにした。さらに、Pim によってリン酸化された p27 Thr157, Thr198 周辺の配列は、細胞内局在を制御する 14-3-3 タンパク質の結合配列と極めて類似していることを見出し、Pim によるリン酸化依存的に p27 と 14-3-3 との結合が促進されること、Pim のリン酸化依存的に p27 の細胞質局在が促進されることを明らかにした。また、細胞質に輸送された p27 のユビキチン化が促進されることも明らかにした。以上の結果から、Pim による p27 の発現抑制機構として、直接 p27 をリン酸化することにより、核外移行を促進し、細胞質における分解を導く機構が関与していることが明らかとなった。

3. Pim は転写段階において p27 遺伝子の発現を抑制する

さらに私は、Pim が p27 mRNA 量を負に制御していることを見出した。p27 遺伝子の転写活性化は転写因子 FoxO が担っている。そこで、Pim が FoxO をリン酸化することによって、FoxO の p27 遺伝子に対する転写活性を抑制している可能性について検討を行った。その結果、Pim が FoxO をリン酸化すること、このリン酸化が FoxO の p27 遺伝子に対する転写活性を抑制することを見出した。以上の結果から、Pim は転写段階においても p27 の発現を抑制していることが明らかとなった。

Pim による p27 の負の抑制が、がんの悪性化に寄与しているかを検討する目的で、予後不良であった前立腺がん患者由来の組織における発現解析を行い、Pim は発現亢進しているのに対し、p27 は発現低下しており、両因子の発現に負の相関があることを見出した。がん患者における p27 の発現低下は、予後不良と強い相関があることが報告されている。よって、本研究において私が同定した Pim の新規基質 p27 は、Pim による細胞増殖、及びがん化において重要な基質であることが強く示唆された。

<Pim タンパク質のがんにおける発現亢進機構の解明>

がんにおける Pim 発現亢進の原因として、Pim タンパク質の分解機構に異常が生じた可能性がある。しかし、Pim の分解制御因子はこれまで未同定であり、Pim の分解機構は不明であった。そこで、私はまず Pim の分解に関わる因子の同定を試み、同定した因子による Pim の分解機構を解析した。

1. Pim タンパク質の分解を担う因子群の同定

細胞周期依存的なタンパク質の発現パターンの解析は、どのような分解因子群によって分解制御を受けているかについて、重要な示唆を与える。そこで、私はまず細胞周期依存的な Pim タンパク質の発現解析を行い、Pim は G1 期から S 期への移行時に最も発現量が高く、S 期において発現が著しく低下すること、さらに Pim は S 期においてユビキチン依存的な分解を受けることを見出した。

S 期におけるユビキチン依存的なタンパク質分解の一部は、SCF (Skp1-Cullin-F-box)-complex が担っている。Pim が SCF 複合体により分解を受ける可能性を検討する目的で、Pim が Cullin family 1-6 と相

互するかについて検討した結果、Cullin 1 との特異的な相互作用を見出した。さらに、*cullin1* ノックダウンにより Pim の発現量の増大が確認された。よって、Pim は SCF 複合体により分解を受けることが予想された。SCF 複合体がユビキチン化する基質の特異性は、E3 ligase として機能する F-box タンパク質によって規定される。よって、Pim を認識する F-box タンパク質の同定が、Pim の分解機構を理解するうえで必須である。そこで、私は Pim と結合し、かつ Pim の発現を抑制する F-box を網羅的に解析することにより、Fbw5 を同定した。さらに Fbw5 は Cullin1 と特異的に相互作用することを見出した。よって、Pim は Skp1-Cullin1-Fbw5 によって分解制御を受けている可能性が示唆された。

Fbw5 によって Pim が分解を受ける可能性を検討する目的で、Fbw5 の過剰発現、及びノックダウン時の Pim のタンパク質量、半減期、ユビキチン化を検討した。Fbw5 過剰発現により、Pim タンパク質の発現は低下し、Pim の半減期の短縮、ユビキチン化の亢進が認められた。また、*fbw5* ノックダウンにより、Pim の半減期の延長、ユビキチン化の低下が認められ、Pim タンパク質量は増加した。以上の結果から、Pim が Fbw5 によって分解を受けると考えられる。

2.リンパ腫患者において認められる Pim 変異体は Fbw5 による分解耐性を導く

リンパ腫患者において見られる変異型 Pim が Fbw5 依存的な分解に耐性を示すか否かを検討した結果、いくつかの変異型 Pim はユビキチン化の低下を伴い、分解に対して耐性を示した。以上の結果より、リンパ腫患者において高頻度に認められる Pim の発現亢進の原因の一つに、Pim の変異を伴う分解耐性機構があることが示唆された。

[まとめ]

本研究において、私は Pim が細胞増殖を促進する機構として、Pim は p27 を直接リン酸化し、ユビキチン・プロテアソーム依存的な分解を誘導するだけでなく、転写段階において p27 を発現抑制することにより、G1/S 期の細胞周期の進行を促進していること明らかにした。さらに予後不良の患者由来の腫瘍組織において、Pim と p27 の発現は負の相関が見られたことから、本機構は Pim によるがんの悪性化において重要な機構であると考えられる。私はまた、Pim タンパク質の分解を担う因子群として、Skp1-Cullin1-Fbw5 を同定した。さらにリンパ腫において見られる Pim の変異体は、これらの複合体による分解に耐性を示した。本結果より、これまで不明であった Pim ががんで発現亢進する機構が明らかとなったと考えられる。