

論文の内容の要旨

論文題目 Polo-like kinase に作用する薬剤開発に関する研究

氏名 飯田 雅人

Polo-like kinase (Plk) は *Drosophila melanogaster* の分裂細胞に染色体分配の異常を引き起こす原因遺伝子 polo の哺乳類ホモログであり、酵母からヒトまで広く保存されているセリン・スレオニンキナーゼである。哺乳類においては 4 つの Plk が同定されており C 端に共通して Polo box domain を保持している。Plk family の中で Plk1 については G2/M 期における重要な細胞周期制御因子として知られている。

Plk1 はがんとの関連について報告があり、例えば、Plk1 の発現と非小細胞肺がんの予後との間に相関があるとの報告や、Plk1 の発現と扁平上皮がんの悪性度との関連を示す報告がある。また、NIH3T3 細胞に Plk1 を導入した場合には形質転換することも知られている。さらに siRNA や中和抗体を用いて Plk1 を阻害することでがん細胞に細胞死を誘導するという報告があり、Plk1 の抗がん剤ターゲットの可能性が示唆されている。

現存する抗がん剤の多くのものが、がん細胞の活発な増殖という現象に標的をおいたものであり、細胞周期の特定の時期に作用するものである。これらの中で細胞周期の M 期をターゲットとした薬剤として taxol、vincristine 等が良く知られている。M 期は核膜崩壊後に染色体の凝集、分離、分配が空間的・時間的な制御のもとに進行する細胞増殖に必須の過程であり、その阻害は細胞に対し致命的に働く可能性が高いと考えられる。taxol や vincristine 等の M 期をターゲットとした抗がん剤はいずれも tublin に結合することにより細胞の有糸分裂を阻害するものであり、がん細胞に対し強力な致死作用をもたらす、強い腫瘍の退縮をもたらす。これらのうち、taxol 及びその誘導体は現在最も広く効果が認められている抗がん剤であり、M 期作用薬の有効性を証明するものである。その一方で、これらの M 期作用薬は、増殖する正常細胞に対しても等しく致命的に作用するため、嘔吐、脱毛、

骨髄抑制といった副作用も認められる。さらに taxol や vincristine は、チューブリンに結合する性質から来る細胞周期非依存の副作用である神経毒性を引き起こす。

このような背景から、M 期をターゲットとしたアプローチはがん細胞に対する強い殺細胞効果を期待でき、M 期の進行を制御する分子は抗がん剤のターゲットの候補となると考えられる。また、これら M 期の制御機構におけるがん細胞と正常細胞の違いを見つけることが出来れば、より毒性の少ない新しいタイプの M 期作用薬を期待できる。

M 期の進行は主に蛋白質のリン酸化で制御されており、これらのリン酸化を担う protein kinase として CDK1/cyclin B, Plk1, Aurora kinase 等が挙げられる。これらの中で Plk1 は前述のような特徴をもち、抗がん剤のターゲットの候補となると考えられる。また、Plk1 阻害剤は taxol や vincristine と作用部位が異なるので前述したような神経毒性は生じないと考えられる。さらに最近、RNAi を介した Plk1 の除去により、p53 が欠損しているがん細胞に選択的に細胞死が誘導されるという報告があることから Plk1 阻害剤のがん細胞選択的な薬効が期待される。

そこで、第一に、Plk1 の阻害剤開発を目的とする実験系を構築した。酵素阻害剤の研究開発について初期の段階においては、組み換え蛋白質を作製し、酵素の活性を阻害する阻害剤のスクリーニング系を構築する必要がある。系の構築には用いる酵素の活性を十分に検出する系が必要となるため、基質として報告されている Cdc25C の Ser¹⁹⁸ を含む配列のアミノ酸を改変し、リン酸化を受けやすい配列を探索した。その結果、-1 位、+1 位、+2 位を疎水性残基に置換した配列が野生型に比べて 200 倍のリン酸化効率を示すことが分かり、得られた配列を用いてスクリーニング系を構築し、阻害剤を探索した。次に、この阻害剤が細胞内で Plk1 の酵素活性を阻害していることを示すためには、Plk1 の細胞内の基質の同定及び基質のリン酸化を検出する系の構築が必要となる。そこでこの 200 倍の比活性を示したペプチドを *in vitro* で Plk1 によってリン酸化させ、市販の抗リン酸化モチーフ抗体を用いて、クロス反応する抗体を探索した。その結果、抗リン酸化-RX(Y/F)XS 抗体を見出し、この抗体が Plk1 のキナーゼ活性依存的に細胞内においてシグナルを検出することが分かった。さらに、この抗体を用いて細胞抽出液から免疫沈降した蛋白質を MALDI-TOF MS にて解析し、この蛋白質が β -カテニンであることが明らかになった。

Plk1 による β -カテニンのリン酸化を詳細に解析するために、GST 融合 β -カテニンの欠損変異体 $\Delta 1$ (1-423 アミノ酸残基)、 $\Delta 2$ (423-781 アミノ酸残基) 及び $\Delta 3$ (1-90 アミノ酸残基) を作製した。組み換え Plk1 が GST 融合 β -カテニンをリン酸化できるかを確かめるため、*in vitro* キナーゼ反応を行い、オートラジオグラフィーによる [γ -³²P]ATP の取り込みを調べるとともに抗リン酸化-RX(Y/F)XS 抗体を用いてウエスタンブロットによる解析を行った。ラジオリラベルされた ATP は β -カテニンのすべての欠損変異体に取り込まれたことから、Plk1 が β -カテニンのいくつかの領域をリン酸化できることが示唆された。しかしながら、抗リン酸化-RX(Y/F)XS 抗体は $\Delta 2$ のみに反応した。このことから、Plk1 によるリン酸化部位は β -カテニンの C 末端側に位置することが示された。さらに、抗リ

ン酸化-RX(Y/F)XS 抗体によって認識される Plk1 による β -カテニンのリン酸化部位を同定するために、 β -カテニンの C 末端のセリン残基について、抗リン酸化-RX(Y/F)XS 抗体が認識するモチーフを調べたところ、Ser⁷¹⁵、Ser⁷¹⁸、Ser⁷²¹ がこれらのモチーフと一致した。よって $\Delta 2$ において S715A、S718A、S721A の 3 つの変異体を構築し、組み換え Plk1 による *in vitro* でのリン酸化を検討したところ、これらの変異体の中で、S718A においてのみリン酸化効率の低下が観察された。このことから、抗リン酸化-RX(Y/F)XS 抗体は β -カテニンの Ser⁷¹⁸ を認識することが示唆された。

さらに細胞内においても Plk1 を介した Ser⁷¹⁸ のリン酸化が起きるかどうかを決定するために、293T 細胞において Myc タグ付き β -カテニンの野生型 (WT) 又は S718A 変異体を Plk1 と共に発現させ、Ser⁷¹⁸ のリン酸化を抗リン酸化-RX(Y/F)XS 抗体を用いてモニターした。Plk1-WT (野生型) 又は Plk1-CA (活性化型) の発現により、Myc- β -カテニン-WT のリン酸化を誘導したが、Myc- β -カテニン-S718A のリン酸化は誘導しなかった。よって、*in vitro* 及び細胞内で Plk1 は β -カテニンの Ser⁷¹⁸ をリン酸化し、そのリン酸化は抗リン酸化-RX(Y/F)XS 抗体によって認識されることが分かり、同定された基質を用いて、細胞内で β -カテニンの脱リン酸化を指標とする阻害剤の細胞評価系の構築に役立てた。またこの結果は、最近報告されている β -カテニンの M 期における機能を支持し、さらに β -カテニンのがんとの関連から Plk1 が β -カテニンのリン酸化を介してがん化に関わっているのではないかということが示唆された。

次に阻害剤は副作用の軽減からできる限り標的酵素選択的である必要がある。そこで本研究では、阻害剤の選択性を調べるために他の Plk として Plk3 のスクリーニング系を構築した。系を構築するにあたって種々の蛋白質由来のペプチドを用いてリン酸化レベルを調べたところ、トポイソメラーゼ II α 由来のペプチドが Plk3 によっては良くリン酸化されるが、Plk1 によっては全くリン酸化されないことが分かった。このトポイソメラーゼ II α を改変して、Plk3 又は Plk1 によるリン酸化レベルの変化を詳細に調べたところ、+2 位と+4 位に酸性残基を好むことは Plk3 特異的な性質であること、+1 位におけるアミノ酸残基の多様性は Plk3 によっては許容されるが、Plk1 においては疎水性残基であることが必須であることが分かった。加えて、Plk3 によるトポイソメラーゼ II α の直接的なリン酸化を *in vitro* のキナーゼアッセイ及び細胞内の Plk3 の過剰発現により示した。さらに、Plk3 とトポイソメラーゼ II α の相互作用を明らかにした。これらの data からトポイソメラーゼ II α が Plk3 の新規の基質であり、Plk1 と Plk3 が細胞周期の進行において異なる役割を担うことが示唆された。また、トポイソメラーゼ II α は G2 チェックポイントとの関連が知られていることから、Plk3 はトポイソメラーゼ II α のリン酸化を介して G2 チェックポイントに関与しているのではないかということが示唆された。

続いて、Plk3 による増殖阻害のメカニズムを明らかにするために、Plk3 の過剰発現の影響を調べたところ、Plk3 の高発現は形態変化、アクチンの重合の変化、細胞の脱離をキナーゼ活性依存性に誘導した。アポトーシスは観察されなかったが、Plk3 の過剰発現は、長期

間コロニー形成アッセイにおいて、細胞増殖を阻害した。また、PIk3 と Ras は f-アクチンの重合に影響を与えるという報告があることから、PIk3 と Ras の共発現の影響を調べた。その結果、PIk3 単独で過剰発現した場合に比べて浮遊する細胞の数が相乗的に増えることが観察された。さらに NIH3T3 細胞に H-RasV12 を導入し形質転換させた細胞株を作製し PIk3 の過剰発現を行った。長期間コロニー形成アッセイにおいて、H-RasV12 によって形質転換させた NIH3T3 細胞は、親株の NIH3T3 細胞と比較して、PIk3 の過剰発現によりその増殖が阻害された。この阻害活性は、PIk3 のキナーゼ活性依存的であった。よって、PIk3 の活性化は細胞骨格の再構築をもたらし、Ras 経路が活性化されているがん細胞において、より顕著に細胞増殖を抑制した。これらの結果から、PIk3 は Ras のシグナルに依存して増殖している悪性度の高いがん細胞に形態変化を介して細胞増殖を抑制できるのではないかと示唆された。PIk3 に関して本研究において明らかになった知見を合わせると、チェックポイントや増殖抑制に關与する PIk3 の異常はがん細胞の悪性化に何らかの関わりがあるのではないかと示唆された。

以上、抗がん剤のターゲットとして PIk1 は阻害剤の開発が有望であるのに対し、PIk3 は発現誘導剤もしくは活性化剤の開発が有望でないかということが示唆された。