

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570193
 研究課題名（和文） 小分子阻害剤によるタンパク質間相互作用の細胞周期進行における役割の解析
 研究課題名（英文） Analysis of the role of protein-protein interaction for the cell cycle progression using small molecule inhibitors
 研究代表者
 渡邊 信元 (WATANABE NOBUMOTO)
 独立行政法人理化学研究所・化合物バンク評価研究チーム・先任研究員
 研究者番号：90221689

研究成果の概要：

蛍光タンパク質標識 PBD とその標的リン酸化ペプチドの結合を蛍光プレートリーダーで定量する系を構築し、PBD 依存結合を阻害する小分子を化合物ライブラリーから探索し purpurogallin (PPG) を見出した。PPG は、試験管内で PBD と標的タンパク質(Wee1)の結合を 1 μ M でほぼ完全に阻害した。PPG を用いた解析で、PBD に依存した結合は、Plk1 の細胞分裂における種々の役割の中でも、特に分裂中期における染色体の整列に最も重要な役割を有することが明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞周期, Plk1, PBD, タンパク質リン酸化、タンパク質間相互作用

1. 研究開始当初の背景

ポロ関連キナーゼ 1(Polo Like Kinase 1; Plk1)は、ショウジョウバエの細胞分裂期に異常な紡錘体形成を引き起こす変異の原因遺伝子 POLO の、ほ乳類での類縁遺伝子のひとつである。siRNA 実験などにより、Plk1 は分裂開始、中心体の成熟、姉妹染色体の分離、中期染色体整列、細胞質分裂など細胞分裂の様々な段階で重要な役割を有することが明らかにされている。

Plk1 タンパク質は N 端側にキナーゼドメイン、C 端側にポロ関連キナーゼ群に保存されたポロボックスドメイン(PBD)を持つ。最近、

PBD がリン酸化タンパク質に配列特異的に結合する領域であることが明らかにされ、PBD に結合する細胞分裂期に重要な因子も明らかにされてきていた。しかし、研究開始当初、PBD 依存性の結合を阻害する小分子化合物は知られていなかった。

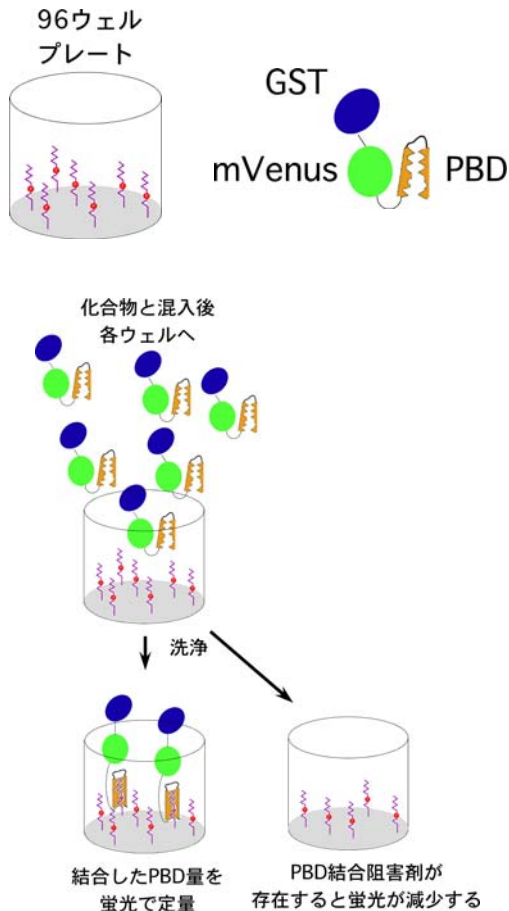
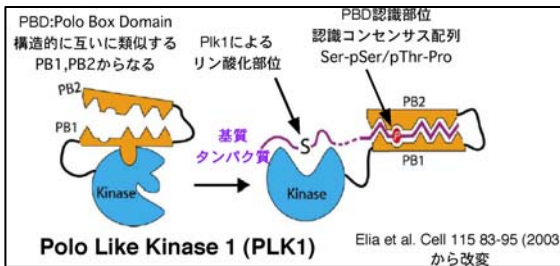
2. 研究の目的

細胞分裂期(M 期)進行に重要なタンパク質間相互作用の中でも、Plk(Polo Like Kinase)ファミリータンパク質リン酸化酵素のリン酸化酵素活性部位の C 末端側にあり、Plk ファミリーの活性化、基質認識、細胞内局在に

重要であるポロボックスドメイン (PBD) と、他の基質との結合を阻害することでその役割を解析できる小分子 (small molecule) の探索系の開発・探索を行い、得られる小分子を用いて M 期進行における PBD の役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

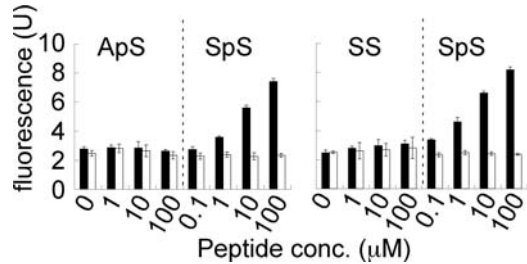
PBD 依存性の結合を阻害する化合物探索系を新たに構築した。PBD を GST-mVenus-PBD 融合タンパク質として大腸菌内で発現した。GST-mVenus-PBD 融合タンパク質を、阻害剤候補化合物と混ぜた後、標的リン酸化ペプチドが共有結合されている 96 ウェルプレートに入れ、結合しなかったタンパク質を洗浄後、結合したタンパク質を mVenus の蛍光として定量する。結合を阻害する化合物を選び出し、阻害能を確認した後、細胞周期進行への影響を解析した。



4. 研究成果

(1) 化合物探索系の構築

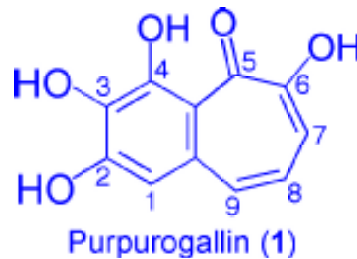
我々は PBD 依存結合を化学生物学的に解析する目的で、蛍光タンパク質標識 PBD とその標的リン酸化ペプチドの結合を蛍光プレートリーダーで定量する系を構築した。PBD 依存性結合は標的ペプチドのリン酸化とリン酸化された残基のアミノ端側のセリンがきわめて重要であるがこの重要性を正しく再現する系を構築することができた。



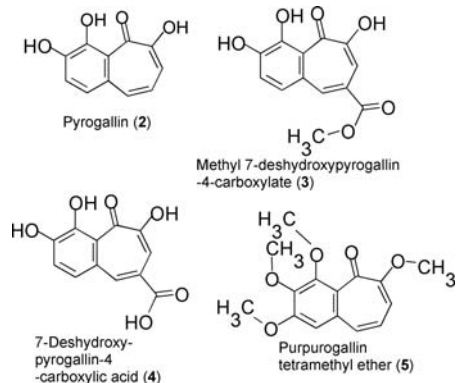
PBD の結合に重要なアミノ酸を変異させた PBD 変異体では結合は認められなかった (図: 白棒)

(2) PBD 依存性阻害化合物の探索

PBD 依存結合を阻害する小分子を数千化合物からなる化合物ライブラリーから探索した。もっとも結合を阻害する活性をもつことが明らかになった小分子である purpurogallin は、試験管内で PBD と標的タンパク質 (Wee1) の結合を $1 \mu\text{M}$ でほぼ完全に阻害した。

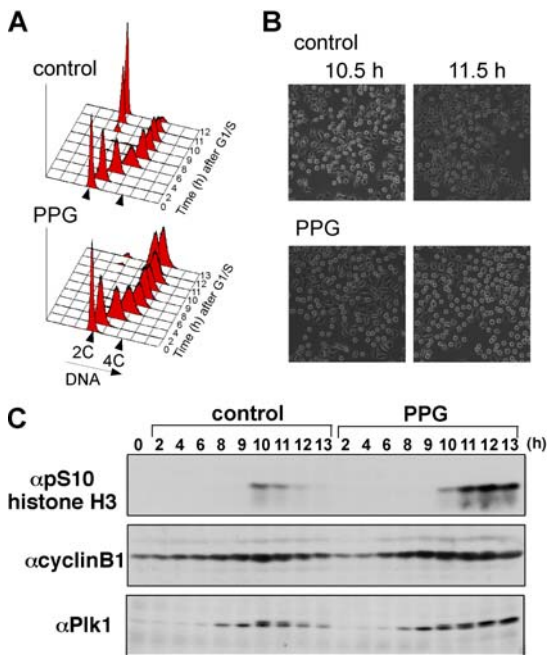


purpurogallin の類縁化合物の解析を行い、2 位に水酸基のない化合物には PBD 依存性結合阻害能がないことが明らかになった。従って purpurogallin の 2 位の水酸基が活性に重要である。

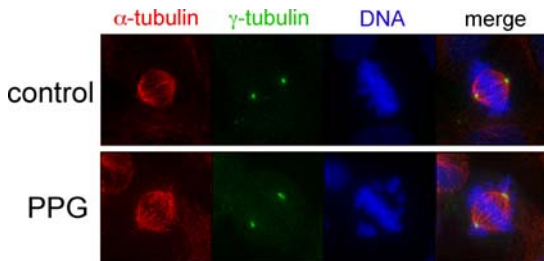


(3) purpurogallin を用いた PBD 依存性結合の役割の解析

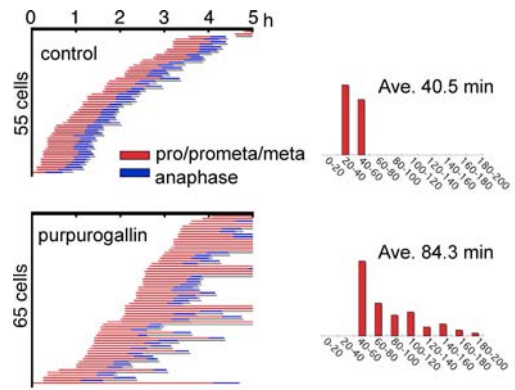
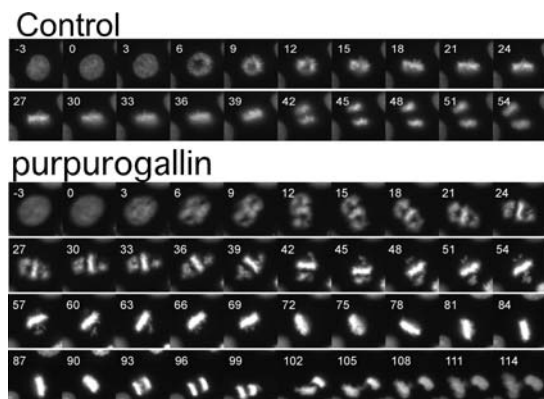
purpurogallin を HeLa 細胞に投与すると、分裂開始がやや遅延するのみならず、細胞分裂期からの離脱が大きく遅延した。



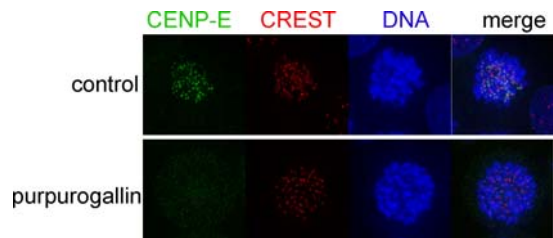
これは染色体の赤道面への整列が遅れることによって紡錘体チェックポイントが活性化されることによることが明らかになった。



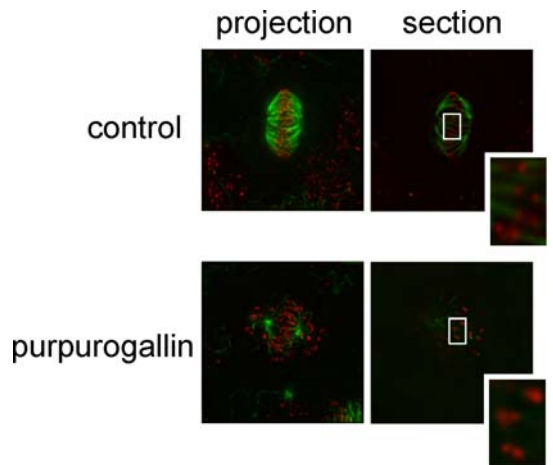
タイムラップスビデオ解析の結果からも、分裂の開始がやや遅れ、染色体の中期赤道面への整列が著しく遅れることが確認された。



染色体の整列に重要なタンパク質である CENP-E タンパク質の動原体への局在が purpurogallin 存在下では著しく阻害されていた。



また、染色体と紡錘糸の接着を解析したところ、purpurogallin 存在下では接着の安定化が起こっていないことが明らかになった。



これらの結果から、PBD に依存した結合は、Plk1 の細胞分裂における種々の役割の中でも、特に CENP-E タンパク質の局在を介して染色体と紡錘糸の接着を安定化することに重要で、分裂中期における染色体の整列に最も重要な役割を有することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

① Watanabe, N (7 人中 1 番目), Deficiency in chromosome congression by the inhibition of PLK1 polo box domain-dependent recognition. *J Biol. Chem.*, 284, 2344-2353 (2009), 査読有り

② Watanabe, N (7 人中 6 番目), Polo-like kinase 1 phosphorylates and regulates Bcl-x_L during pironetin-induced apoptosis. *Oncogene*, **28**, 107-116 (2009), 査読有り

③ Watanabe, N (5 人中 4 番目), The regulatory β -subunit of protein kinase CK2 regulates cell-cycle progression at the onset of mitosis. *Oncogene*, 27, 4986-4997 (2008), 査読有り

④ Watanabe, N (4 人中 2 番目), Human immunodeficiency virus type 1 Vpr binds to the N lobe of the Wee1 kinase domain and enhances kinase activity for CDC2. *J Virol.*, 82, 5672-5682 (2008), 査読有り

⑤ Watanabe, N (6 人中 4 番目), Fbxw7 acts as an E3 Ubiquitin ligase that targets c-Myb for nemo-like kinase (NLK)-induced degradation. *J Biol. Chem.*, 283, 30540-30548 (2008), 査読有り

⑥ Watanabe, N, Wee1, UCSD-Nature Molecule Pages
<http://www.signaling-gateway.org/molecule/query?afcsid=A002371>, (2008) 査読有り

⑦ 渡邊信元, 長田裕之 癌細胞の細胞周期異常 日本臨牀、67、71-76 (2009) 査読無し

[学会発表] (計 6 件)

① 渡邊信元 細胞分裂期進行における Plk1 ポロボックスドメイン依存性結合の役割の化学生物学的解析 日本ケミカルバイオロジー研究会第 3 回年会 2008 年 5 月 19 日

② Eugene Ong Development of a screening system for HIV-1 Vpr Inhibitors and the study of its mechanism of action, 4th Korea-Japan Chemical Biology Symposium, 2008 年 5 月 21 日日光

③ 渡邊 信元 Small molecule inhibitors of phosphorylation dependent protein-protein interactions Friday seminar by USM visiting professors, 2008 年 7 月 25 日 Univ. Sains, Malaysia, Penang

④ 渡邊 信元 小分子阻害剤による Plk1 ポロボックス依存性結合の細胞分裂進行における役割の解析第 67 回日本癌学会学術総会, 2008 年 10 月 28 日名古屋

⑤ 渡邊 信元 小分子阻害剤を用いた細胞分裂における PBD 依存性結合の役割の解析第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 (BMB2008), 2008 年 12 月 10 日神戸

⑥ 内田 早苗 SCFbeta-TrCP による Cdc25B の制御, 第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 (BMB2008), 2008 年 12 月 11 日, 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 信元 (WATANABE NOBUMOTO)

独立行政法人理化学研究所・化合物バンク評価研究チーム・前任研究員

研究者番号: 90221689