

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 7 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究（C）一般

研究期間：2009～2011

課題番号：21590352

研究課題名（和文） がん細胞における Plk1 を介したシグナル伝達異常の解明

研究課題名（英文） Plk1-mediated signaling pathway in cancer cells

## 研究代表者

後藤 英仁 (GOTO HIDEMASA)

愛知県がんセンター（研究所）・発がん制御研究部・室長

研究者番号：20393126

研究成果の概要（和文）：Plk1 は、分裂期に活性化する蛋白質リン酸化酵素（キナーゼ）の一種であるが、その詳細な制御機構は不明な点が多い。本研究では、Plk1 とチェックポイントキナーゼ 1 (Chk1) の新規クロストーク機構を明らかにするとともに、Chk1 および Plk1 の新規結合蛋白質として、14-3-3 ガンマを同定した。解析の結果、Chk1 と 14-3-3 ガンマの結合はチェックポイントにおける細胞周期停止に重要であった。現在、Plk1 と 14-3-3 ガンマの結合の生理的意義を現在解析中である。

研究成果の概要（英文）：Plk1 is known as one of mitotic kinases but its regulation remains largely unknown. In this study, we have demonstrated novel inverse relationship between Plk1 and checkpoint kinase 1 (Chk1). We have also identified 14-3-3 gamma as a binding protein for Chk1 and Plk1. The binding between Chk1 and Plk1 is critical for cell cycle arrest in DNA damage response. Now, we are elucidating the significance of the binding between Plk1 and 14-3-3 gamma.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：Plk1、14-3-3 ガンマ、チェックポイント、Chk1

## 1. 研究開始当初の背景

がん細胞では異倍体核・多倍体核が出現するなど、染色体の恒常性が維持できなくなったものが数多く存在する。現在では、このような染色体の不安定性が細胞のがん化やがんの悪性化機構に重要な役割を果たしているのではないかと考えられている。がん細胞において染色体の不安定性を引き起こすメ

カニズムとしては、DNA の複製／障害チェックポイント機構の障害や分裂期の染色体分配機構の異常などが想定されている。

研究成果の集積から、これらの調節機構の多くに状況に応じて特異的に活性化される蛋白質リン酸化酵素（プロテインキナーゼ）群が染色体の恒常性維持に重要な役割を果たしていることが判明してきた。例えば、DNA

複製／障害チェックポイント機構においては、ATR から Chk1 および ATM から Chk2 に至るキナーゼカスケードがその中心的な役割を果たしている。また、分裂期においては、分裂期の開始に必須なサイクリン依存性キナーゼ 1 (Cdk1, Cdc2)に加えて、Aurora-A、Aurora-B、Plk1 (Polo-like kinase 1)などの分裂期キナーゼと一括されるキナーゼ群が重要な役割を担っている。

その中で、Plk1 は、分裂期への進入、セントロメア以外の姉妹染色体の接着の解除、中心体の成熟・分配、両極紡錘体 (bipolar spindle)の形成、動原体 (キネトコア)における張力の感知、細胞質分裂など、分裂期における様々な細胞現象 (特に、染色体の均等分配)を制御している分裂期キナーゼである。また、DNA の複製／障害チェックポイントの際には、Plk1 はその蛋白質質量および活性が抑制されていることが知られている。逆に、これらチェックポイント機構からの離脱の際には、Plk1 の再活性化が必須であると報告されている。このように、Plk1 は、分裂期の細胞現象だけでなく、チェックポイントからの離脱 (つまり、チェックポイントの寛容)機構を制御することを通じて、細胞の染色体の恒常性を維持していると考えられる。

Plk1 の制御異常とがんの関連性については、種々の報告がある。Plk1 は、種々のがん組織において、過剰発現していることが報告されている。また、Plk1 の過剰発現は、生命予後とも深く関連していることが知られている。また、Plk1 の恒常的活性型 (constitutively active form) を NIH3T3 細胞に発現させることで細胞を形質転換 (transform) できることやこの形質転換細胞はヌードマウスにおいて造腫瘍能を持っていることなどから、実験的にも、Plk1 の制御異常が細胞のがん化に深く関与していることが指摘されている。しかし、Plk1 のどのシグナル伝達経路が細胞のがん化やがんの悪性化に関与しているのかについては、不明な点が多いのが現状といえる。

## 2. 研究の目的

Plk1 を介した細胞がん化のメカニズムを明らかにするためには、上記のような Plk1 の多機能性がどのように制御されているかを明らかにする必要性に迫られる。つまり、Plk1 がどのような基質を時間的かつ空間的に選択しながら、細胞機能を調節しているかということ明らかにしていく必要がある。

研究成果の集積により、Plk1 は、その Polo-box domain (PBD)を介して、種々のリン酸化タンパク質と結合しうることが明らかになった。この PBD の結合に必要なリン酸化反応の多くは、Cdk1 や Plk1 自身によって遂行されることが知られている。また、この

結合により、Plk1 はそのキナーゼ活性が増大するだけでなく、多くの場合、その結合タンパク質もリン酸化することが知られている。つまり、Plk1 は、結合タンパク質を様々に変化させることによって、上記のような多機能性を制御している可能性が高いと考えられる。

本研究は、Plk1 の新規結合タンパク質を同定するとともに、新規 Plk1 のシグナル伝達機構の一端を明らかにしていくことをその目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 候補となる Plk1 結合タンパク質 (基質)および Plk1 (キナーゼ)を用いた *in vitro* アッセイ系を確立し、基質のリン酸化反応による機能変化を類推するとともに、そのリン酸化部位を同定する。

(2) 抗リン酸化抗体を用いて、細胞内におけるリン酸化反応の時間的・空間的変動を観察し、細胞内における生理機能を類推する。また、Plk1 をノックダウンした際のリン酸化反応の挙動も同時に観察することで、*in vivo* においてこのリン酸化反応が Plk1 依存的であるかどうかについても検討する。

(3) 各基質のリン酸化部位を (リン酸化反応が引き起こされない) アラニンや (リン酸化反応を模倣する) アスパラギン酸・グルタミン酸に置換した変異体を細胞内に発現させた場合の表現型を観察する。これら(1)–(3)の解析を通じて、これら結合タンパク質のリン酸化反応が Plk1 のどのような機能 (例えば、染色体の均等分配機構やチェックポイントからの離脱機構)に重要であるかについて解明していく。

(4) 上記に加えて、Plk1 の活性を間接的に負に制御していると考えられている Chk1 との関連についても、上記の手技を応用しながら、解析する。

## 4. 研究成果

### (1) Plk1 とチェックポイント機構の新規関連のメカニズム

Plk1 は、分裂期開始に必須な Cdk1 の活性化などに重要な役割を担っていることが知られている。近年、DNA 障害チェックポイントの際には Plk1 の機能が抑えられているが、逆にチェックポイントからの離脱の際には Plk1 の再活性化が重要な役割を担っていることが知られている。しかし、Plk1、Cdk1 を含めた分裂期キナーゼ群と Chk1 を含めたチェックポイントキナーゼ群の詳細な関連はまだ不明な点が多い。我々は、これまでに Cdk1 が分裂期において、Chk1 のセリン 286・セリン 301 をリン酸化することを明らかにしてきた。本研究では、このリン酸化反応が Plk1 を含めた分裂期キナーゼの活性化およ

び分裂期の進行にどのような役割を果たしているかについて検討を加えた。その結果、1) Cdk1 が Chk1 のセリン 286・セリン 301 をリン酸化することで Chk1 を核から細胞質に移行させていること、2) この Chk1 の核外排出により Cdk1、Plk1 などの分裂期キナーゼの活性化が促進されること、および、3) これら分裂期キナーゼ群の活性化により、分裂期への進行が円滑に遂行されることが明らかになった。つまり、これらの結果は、分裂期キナーゼ群と Chk1 の間にはポジティブフィードバック機構が存在し、この機構の活性化が分裂期への円滑な移行に重要な役割を担っていることを示唆するものといえる。このシグナル伝達機構は、がんにおけるチェックポイント寛容の際にも働いているものと考えられるが、その詳細の解明は今後の研究課題ともいえる（文献4、8）。

#### (2) 新規 Plk1 結合蛋白質の同定およびその蛋白質の機能解析

我々は、GST pull-down 法を用いた質量分析にて、Plk1 の結合蛋白質として、新たに 14-3-3 ガンマを同定した（未発表）。14-3-3 蛋白質は DNA 障害チェックポイントの際にも重要なメディエーターとして機能することが報告されているため、14-3-3 ガンマの DNA 障害チェックポイントにおける機能を検索した。その結果、14-3-3 ガンマが、DNA 障害チェックポイントの際に、Chk1 のセリン 296 の自己リン酸化反応依存的に Chk1 と結合することが判明した。この結合により、Chk1 と（14-3-3 ガンマのもう一つの結合パートナーである）Cdc25A が、14-3-3 ガンマを介して結合することが判明した。この 3 者複合体の形成により Chk1 は Cdc25A の分解に必要なセリン 76 をリン酸化できるようになること、および、このリン酸化反応によって Cdc25A が分解に導かれ細胞周期停止を引き起こしていることを見出した。以上の結果は、14-3-3 ガンマが、DNA 障害チェックポイントにおける Chk1 から Cdc25A に至るシグナルを制御していることを示している（文献6）。

#### (3) 新規結合蛋白質 14-3-3 ガンマによる Plk1 の活性制御機構

次に、Plk1 と 14-3-3 ガンマの結合の生理的意義の解析を行った。14-3-3 ガンマをノックダウンすると、Plk1 ノックダウンで認められるような分裂前中期から中期で停止する細胞が多く認められた。スピンドルチェックポイントに必要な BubR1 や Mad2 と同時にノックダウンすると、この停止が解除されることから、14-3-3 ガンマのノックダウンによって、（Plk1 ノックダウンで認められるような）スピンドルチェックポイントが活性化していることが判明した。14-3-3 ガンマのノックダウンによって、BubR1 や Wee1 などの Plk1 基質のリン酸化レベルが低下すること、免疫沈

降産物を *in vitro* でアッセイしても Plk1 活性が低下していることから、14-3-3 ガンマは Plk1 と分裂期特異的に結合することで Plk1 の活性を制御していることが判明した（未発表）。

#### (4) 今後の課題

Plk1 と Chk1 が同じ 14-3-3 のサブタイプと結合し、その機能を制御されていることは、チェックポイントの解除と分裂期への進行の分子機構を考えるうえでとても興味深いことといえる。14-3-3 蛋白質は、多くの場合、リン酸化されたセリン・スレオニンを含む配列を認識して結合することが知られている。我々は、すでに、Plk1 と 14-3-3 ガンマの結合が Plk1 のリン酸化修飾依存的であることを明らかにしている。今後、このリン酸化部位を同定し、そのリン酸化修飾を遂行するキナーゼを同定することで、このシグナル伝達経路の全貌を明らかにするとともに、癌との関連を明らかにしていくことが今後の課題といえる。

#### 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8件）

総説

1. Goto H., Izawa I., Li P., and Inagaki M.: Novel regulation of checkpoint kinase 1: Is checkpoint kinase 1 a good candidate for anti-cancer therapy? **Cancer Sci.** In press. DOI. 10.1111/j.1349-7006.2012.02280.x (査読有)

原著論文

2. Inoko A., Matsuyama M., Goto H., Ohmuro-Matsuyama, Y., Hayashi Y., Enomoto M., Ibi M., Urano T., Shigenobu Y., Kiyono T., Izawa I., and Inagaki M.: Trichoplein and Aurora A block aberrant primary cilia assembly in proliferating cells. **J. Cell Biol.** 197: 391-405, 2012. DOI. 10.1083/jcb.201106101 (査読有)
3. Li P., Goto H., Kasahara K., Matsuyama M., Wang Z., Yatabe Y., Kiyono T., and Inagaki M.: P90 RSK arranges Chk1 in the nucleus for monitoring of genomic integrity during cell proliferation. **Mol. Biol. Cell.** 23: 1582-1592, 2012. DOI. 10.1091/mbc.E11-10-0883 (査読有)
4. Matsuyama M., Goto H., Kasahara K., Kawakami Y., Nakanishi M., Kiyono T., Goshima N., and Inagaki M.: Nuclear

- Chk1 prevents premature mitotic entry. *J. Cell Sci.* 124: 2113-2119, 2011. DOI. 10.1242/jcs.086488 (査読有)
5. Ibi M., Zou P., Inoko A., Shiromizu T., Matsuyama M., Hayashi Y., Enomoto M., Mori D., Hirotsune S., Kiyono T., Tsukita S., Goto H., and Inagaki M.: Trichoplein controls microtubule anchoring at the centrosome by binding to Odf2 and ninein. *J. Cell Sci.* 124: 857-864, 2011. DOI. 10.1242/jcs.075705 (査読有)
  6. Kasahara K., Goto H., Enomoto M., Tomono Y., Kiyono T., and Inagaki M.: 14-3-3 $\gamma$  mediates Cdc25A proteolysis to block premature mitotic entry after DNA damage. *EMBO J.* 29: 2802-2812, 2010. DOI. 10.1038/emboj.2010.157 (査読有)
  7. Ichijima Y., Yoshioka K.-I., Yoshioka Y., Shinohe K., Fujimori H., Unno J., Takagi M., Goto H., Inagaki M., Mizutani S., and Teraoka H.: DNA Lesions Induced by Replication Stress Trigger Mitotic Aberration and Tetraploidy Development. *PLoS ONE* 5: e8821, 2010. DOI. 10.1371/journal.pone.0008821 (査読有)
  8. Enomoto M., Goto H., Tomono Y., Kasahara K., Tsujimura K., Kiyono T., and Inagaki M.: Novel positive feedback loop between Cdk1 and Chk1 in the nucleus during G2/M transition. *J. Biol. Chem.* 284: 34223-34230, 2009. DOI. 10.1074/jbc.C109.051540 (査読有)

[学会発表] (計 12 件)

招待講演 (国際シンポジウム)

1. Matsuyama M., Kasahara K., and Goto H.: “Nuclear Chk1 prevents premature activation of cyclinB1-Cdk1.” Cell Cycle and Cell Differentiation, from A to Z (MEXT Priority Research Project “Cell Proliferation Control” International Symposium), Rubura Ohzan Hotel (Nagoya), 2010.11.06.
2. Goto H., Enomoto M., Kasahara K., and Inagaki M.: “Regulation of Chk1 by novel phosphorylations; Perspective of Chk1 as a therapeutic target for cancer.” The 15th Aichi International Cancer Symposium “New Molecular Target Therapy and Signal Transduction” Aichi Cancer Center (Nagoya), 2010.03.06.
3. Goto H. and Enomoto M.: “Chk1 phosphorylation by Cyclin-dependent

kinases (Cdks) promotes mitotic entry.” Cell Cycle and Cell Architecture (MEXT Priority Research Project “Cell Proliferation Control” International Symposium), Rubura Ohzan Hotel (Nagoya), 2009.02.26.

招待講演 (国内学会)

4. Inoko A., Matsuyama M., Goto H., Ohmuro-Matsuyama Y., and Inagaki M.: “Trichoplein blocks the aberrant assembly of primary cilia in proliferating cells.” 第70回日本癌学会総会、名古屋国際会議場 (名古屋)、2011.10.3.
5. 稲垣昌樹、笠原広介、李萍、後藤英仁: 「抗リン酸化ペプチド抗体とチェックポイントシグナル」第74回日本生化学会中部支部例会・シンポジウム、名古屋大学医学部 (名古屋)、2010.5.29.
6. 稲垣昌樹、笠原広介、後藤英仁: “Multi-site phosphorylations by different kinases lead to entire function of Chk1.” 第68回日本癌学会総会、パシフィコ横浜 (横浜)、2009.10.2.

その他の学会発表

7. 笠原広介、後藤英仁、井澤一郎、渡辺信元、清野透、稲垣昌樹: 「新規リン酸化反応による分裂期キナーゼ Plk1 の活性制御メカニズム」第34日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (横浜)、2011.12.15.
8. Goto H., Li P., Kiyono T., Matsuyama M., Kasahara K., Murakami Y., Yatabe Y., and Inagaki M.: “Chk1 Phosphorylation by p90 Ribosomal S6 Kinase (p90 RSK).” The 51th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, Colorado Convention Center (Denver, CO, USA). 2011.12.4.
9. Goto H., Li P., Yatabe Y., Kasahara K., Matsuyama M., Kiyono T., and Inagaki M.: “Chk1 phosphorylation at Ser280 by p90 ribosomal S6 kinase (p90 RSK).” 第70回日本癌学会総会、名古屋国際会議場 (名古屋)、2011.10.3.
10. Enomoto M., Goto H., Tomono Y., Kasahara K., Tsujimura K., Kiyono T., and Inagaki M.: “Chk1 phosphorylation by Cdk1 is required for the adequate activation of Cdk1.” The 49th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Diego Convention Center (San Diego, CA, USA).

2009. 12. 8.

11. Goto H., Kasahara K., Tomono Y., Enomoto M., Kiyono T., and Inagaki M.: “14-3-3 $\gamma$  mediates Cdc25A proteolysis to induce S and G2 arrest after DNA damage.” The 49th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Diego Convention Center (San Diego, CA, USA). 2009. 12. 7.
12. 榎本将人、後藤英仁、友野靖子、笠原広介、辻村邦夫、清野透、稲垣昌樹：「G2/M期における Cdk1 による Chk1 の制御機構の解析」第 82 回日本生化学会大会、神戸ポートアイランド(神戸)、2009. 10. 23.

[図書] (計 3 件)

1. 後藤英仁、稲垣昌樹. チェックポイントキナーゼ 1 (Chk1) の新規制御機構とがん-シグナル伝達研究最前線 2012-井上純一郎、武川睦寛、徳永文穂、今井浩三 編 実験医学増刊号 (30 巻, 5 号), 羊土社、106-110 (766-770)、2012.
2. 後藤英仁、稲垣昌樹. G2/M 移行期における CDK1 の活性化およびチェックポイント解除機構-細胞周期フロンティア-佐方功幸、稲垣昌樹、岸本健雄 編 共立出版、51-57、2010.
3. 笠原広介、後藤英仁. リン酸化による M 期制御-染色体サイクル ゲノムの恒常性維持、継承とダイナミクス- 正井久雄、升方久夫、釣本敏樹、仁木宏典、篠原彰 編, 蛋白質核酸酵素増刊号 (54 巻, 4 号), 441-446, 2009.

[その他]

ホームページ等

[http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/08hatsugan\\_seigyō/index.html](http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/08hatsugan_seigyō/index.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

後藤 英仁 (GOTO HIDEMASA)

愛知県がんセンター (研究所)・発がん制御研究部・室長

研究者番号：20393126