

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590396

研究課題名(和文) 中心体キナーゼを介したシグナル伝達機構と疾患

研究課題名(英文) Signal transduction by centrosome-associated protein kinases

研究代表者

後藤 英仁 (Goto, Hidemasa)

愛知県がんセンター(研究所)・腫瘍医化学部・室長

研究者番号：20393126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：Polo-like kinase 1 (Plk1)は、分裂期の様々な現象を制御するタンパク質リン酸化酵素(キナーゼ)である。本研究で、新たに、Plk1のセリン99が分裂特異的にリン酸化されること、このリン酸化修飾依存性に14-3-3ガンマが結合すること、この結合によりPlk1活性が上昇すること、この活性化経路は分裂中期から後期への円滑な移行を制御していることを明らかにした。この分裂期特異的なPlk1のセリン99のリン酸化修飾は、PI3キナーゼ-Akt経路によって制御していることも示した。この新規のシグナル伝達経路の解明は、癌の病態の一端を解明するうえで示唆に富む知見といえる。

研究成果の概要(英文)：Polo-like kinase 1 (Plk1) controls multiple aspects of mitosis. Here, we identified Ser99 on Plk1 as a novel mitosis-specific phosphorylation site. Plk1-Ser99 phosphorylation creates a docking site for 14-3-3gamma and this interaction stimulates the catalytic activity of Plk1. 14-3-3gamma knockdown or replacement of wild-type Plk1 by a Ser99-phospho-blocking mutant leads to a prometaphase/metaphase-like arrest due to the activation of the spindle assembly checkpoint. Inhibition of PI3K and Akt significantly reduces the level of Plk1-Ser99 phosphorylation and delays metaphase to anaphase transition. Mitotic Plk1 activity is regulated by Plk1 binding to 14-3-3gamma following Plk1-Ser99 phosphorylation downstream of the PI3K-Akt signalling pathway. This novel Plk1 activation pathway controls proper progression from metaphase to anaphase. Our study paves the way for future studies elucidating the relationship between PI3K-Akt pathway and Plk1 in carcinogenesis.

研究分野：分子病態学、生化学、細胞生物学

キーワード：分裂期 キナーゼ Plk1 14-3-3 PI3キナーゼ Akt

### 1. 研究開始当初の背景

Aurora-A、Plk1 (Polo-like kinase 1) は、分裂期に中心体で活性化される分裂期キナーゼとして、位置づけられており、これまでに G2 期から分裂期への (G2/M) 移行、中心体の成熟、分裂期紡錘体の形成、染色体の分配などの分裂期における種々の細胞現象を制御している。これら 2 つの中心体に局在する分裂期キナーゼは、G2/M 移行期において Aurora-A が Plk1 の活性化因子であること、互いの基質のリン酸化反応が時空間的に同期して引き起こされることが上記の分裂期現象の制御に重要であることなどから、機能的に互いに協調しながら働いていると考えられている。

これまでの研究で、これら 2 つのキナーゼは、癌を中心とする種々の疾患にも深く関与していることが知られている。しかし、その制御異常と病態との関係については、まだ、未解明な点が多いのが現状といえる。

### 2. 研究の目的

本研究では、Aurora-A および Plk1 の新規結合蛋白質を同定し、その結合の機能解析を通じて、新規のシグナル伝達経路を明らかにすることを目的とする。また、上記の研究を通じて、癌における病態の一端を解明していく。

### 3. 研究の方法

#### (1) Aurora-A および Plk1 に結合する蛋白質の同定

GST pull-down 法を用いた質量分析にて、Aurora-A および Plk1 と結合しうる候補蛋白質を複数同定した。そのなかで、Plk1 結合蛋白質と同定した 14-3-3 ガンマに注目し、以下の解析を行った。

#### (2) 14-3-3 ガンマノックダウンによる表現型の検討

14-3-3 ガンマに特異的な small interfering RNA (siRNA) を用いて、14-3-3 ガンマノックダウンの表現型を検討した。この際、Plk1 ノックダウンの表現型の差異についても検討するとともに、14-3-3 ガンマノックダウンが Plk1 活性に与える影響について検討した。

#### (3) 14-3-3 ガンマの Plk1 結合部位の同定

14-3-3 蛋白質は、リン酸化修飾依存性に標的蛋白質と結合するため、その結合に必要な Plk1 のリン酸化部位を検討した。

### 4. 研究成果

GST pull-down 法で同定した Plk1 結合蛋白質の 14-3-3 ガンマについて解析を行った。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。

次に、Plk1-セリン 99 のリン酸化修飾が 14-3-3 ガンマと Plk1 の結合に必須であることを見出した。このリン酸化修飾は、分裂期特異的に引き起こされていたが、これまで Plk1 の上流制御キナーゼとして知られている Aurora-A によってはリン酸化されない部位であった。そのため、このリン酸化修飾がどのシグナル伝達経路のキナーゼによって制御されるかについて検討したところ、PI3 キナーゼ-Akt (プロテインキナーゼ B [PKB]とも呼ぶ)の経路によって制御されていることが判明した。

また、Plk1 のセリン 99 をリン酸化されないアラニンに置換した場合や PI3 キナーゼ-Akt 経路を抑制した場合においても 14-3-3 ガンマをノックダウンした場合と同様の表現型が認められることが判明した。このことから、PI3 キナーゼの下流で Akt が分裂期特異的に Plk1 のセリン 99 をリン酸化することで 14-3-3 ガンマが結合し、その結合によって、Plk1 活性が上昇することが判明した。この活性上昇は、分裂期のスピンドルチェックポイントを解除し、細胞が分裂中期から後期にうまく進行するために必須のものであるといえる。

Plk1 は、染色体分配を制御する分裂期キナーゼとして、PI3 キナーゼ-Akt 経路は、細胞の増殖、生存、運動などを司る経路として位置づけられている。癌では、PI3 キナーゼおよび Akt は変異などを引き起こすことでその活性が異常に上昇しており、その活性上昇が癌化に重要な役割を担っていると考えられている。また、Plk1 は、癌における変異などの報告は少ないものの、癌においてその活性が異常に亢進していることが知られている。我々が導きだした結果は、分裂期の Plk1 の 14-3-3 ガンマを介した活性化過程に PI3 キナーゼ-Akt 経路が深く関与していることを示すものであり、癌における PI3 キナーゼ-Akt 経路の異常活性化と染色体不安定性の関係を考えるうえでも示唆に富む知見といえる。また、PI3 キナーゼ、Akt、Plk1 はそれぞれ抗癌治療の分子標的として考えられ、それぞれ特異的な阻害剤が分子標的薬として開発されてきている。我々が導きだした知見は、こういった分子標的薬の相互作用を類推するうえでも重要な知見になりうることが想定される。

この研究を進める過程で、精製タンパク質を用いた *in vitro* の解析では Akt は Plk1 のセリン 99 を直接リン酸化しえないことを明らかにした。しかし、精製 Plk1 タンパク質

でなく、分裂期細胞から免疫沈降した Plk1 を用いた場合には、Akt が効率よく Plk1 のセリン 99 をリン酸化することも判明した。このような現象は、間期細胞から免疫沈降した Plk1 を用いた場合には全く認められなかったため、Plk1 に分裂期特異的に結合する蛋白質が Akt 依存的な Plk1-セリン 99 のリン酸化修飾を促進している可能性が高いと考えられる。今後の研究課題として、分裂期特異的な Plk1 結合蛋白質を同定し、このシグナル伝達経路をより詳細に解明していく必要があると思われる。

#### 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 12 件)

1. Tanaka H., Goto H., Inoko A., Makihara H., Enomoto A., Horimoto K., Matsuyama M., Kurita K., Izawa I., and Inagaki M.: Cytokinetic failure-induced tetraploidy develops into aneuploidy, triggering skin aging in phospho-vimentin deficient mice. *J. Biol. Chem.* In press. doi: 10.1074/jbc.M114.633891 (査読有).
2. Goto H., Kasahara K., and Inagaki M.: Novel insights into Chk1 regulation by phosphorylation. *Cell Struct. Funct.* 40 (1): 43-50, 2015 doi: 10.1247/csf.14017(査読有).
3. Oakes V., Wang W., Harrington B., Lee, W.J., Beamish H., Chia, K.M., Pinder A., Goto H., Inagaki M., Pavey S., and Gabrielli B.: Cyclin A/Cdk2 regulates Cdh1 and claspin during late S/G2 phase of the cell cycle. *Cell Cycle.* 13 (20): 3302-3311, 2014 doi: 10.4161/15384101.2014.949111(査読有).
4. Ohta M., Ashikawa T., Nozaki Y., Kozuka-Hata H., Goto H., Inagaki M., Oyama M., and Kitagawa D.: Direct interaction of Plk4 with STIL ensures formation of a single procentriole per parental centriole. *Nat. Commun.* 5: 5267, 2014 doi: 10.1038/ncomms6267(査読有).
5. Goto H. and Inagaki M.: New Insights into Roles of Intermediate Filament (IF) Phosphorylation and Progeria Pathogenesis. *IUBMB Life* 66 (3): 195-200, 2014 doi: 10.1002/iub.1260 (査読有).
6. Kitagawa M., Fung S.Y.S., Hameed U.F.S., Goto H., Inagaki M., and Lee S.H.: Cdk1 Coordinates Timely Activation of MKlp2 Kinesin with Relocation of the Chromosome Passenger Complex for Cytokinesis. *Cell Rep.* 7 (1): 166-179, 2014 doi: 10.1016/j.celrep.2014.02.034 (査読有).
7. Kaneko M., Matsuzawa K., Matsui T., Akita H., Sugiyama I., Ishidate F., Nakano A., Takashima S., Goto H., Inagaki M., Kaibuchi K., and Watanabe T.: Plk1 phosphorylates CLIP-170 and regulates its binding to microtubules for chromosome alignment. *Cell Struct. Funct.* 39 (1): 45-59, 2014 doi: 10.1247/csf.14001 (査読有).
8. Ikawa K., Satou A., Fukuhara M., Matsumura S., Sugiyama N., Goto H., Fukuda M., Inagaki M., Ishihama Y., and Toyoshima F.: Inhibition of endocytic vesicle fusion by Plk1-mediated phosphorylation of vimentin during mitosis. *Cell Cycle.* 13 (1): 126-137, 2014 doi: 10.4161/cc.26866 (査読有).
9. Matsuyama M., Tanaka H., Inoko A., Goto H., Yonemura S., Kobori K., Hayashi Y., Kondo E., Itohara S., Izawa I., and Inagaki M.: Defect of mitotic vimentin phosphorylation causes microphthalmia and cataract via aneuploidy and senescence in lens epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 288 (50): 35626-35635, 2013 doi: 10.1074/jbc.M113.514737 (査読有).

10. Neise D., Sohn D., Stefanski A., Goto H., Inagaki M., Wesselborg S., Budach W., Stühler K., and Jänicke R.U.: The p90 ribosomal S6 kinase (RSK) inhibitor BI-D1870 prevents gamma irradiation-induced apoptosis and mediates senescence via RSK- and p53-independent accumulation of p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. *Cell Death Dis.* 4: e859, 2013 10.1038/cddis.2013.386 (査読有).
11. Kasahara K., Goto H., Izawa I., Kiyono T., Watanabe N., Elowe S., Nigg E.A., and Inagaki M.: PI 3-kinase-dependent phosphorylation of Plk1-Ser99 promotes association with 14-3-3 $\gamma$  and is required for metaphase-anaphase transition. *Nat. Commun.* 4: 1882, 2013 doi: 10.1038/ncomms2879 (査読有).
12. Goto H., Inoko A., and Inagaki M.: Cell cycle progression by the repression of primary cilia formation in proliferating cells. *Cell. Mol. life Sci.* 70 (20): 3893-3905, 2013 doi: 10.1007/s00018-013-1302-8 (査読有).

[学会発表](計13件)

1. Tanaka H., Goto H., Inoko A., Izawa I., and Inagaki M.: Defect of Vimentin Phosphorylation Cause Aging via Aneuploidy and Cellular Senescence. 第73回日本癌学会総会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2014年9月27日
2. 稲葉弘哲、後藤英仁、猪子誠人、何東偉、五島直樹、山野壮太郎、鰐淵英樹、熊本香奈子、広常真治、清野透、稲垣昌樹: Ndel1の欠損は一次線毛形成を引き起こし、細胞増殖を阻害する 第66回日本細胞生物学会大会、奈良県新公会堂(奈良県奈良市) 2014年6月12日
3. 後藤英仁、渡辺信元、猪子誠人、稲垣昌

樹: がんの分子標的としての Aurora A キナーゼ 第87回日本薬理学会年会、仙台国際センター(宮城県仙台市)、2014年3月21日

4. Goto H. and Inagaki M.: Screening of novel Aurora-A-associated proteins to prevent primary cilia assembly at the centrosome in proliferating cells. 第65回日本細胞生物学会大会、ウインク愛知(愛知県名古屋市) 2013年6月20日
5. Goto H., Era S., Li P., Kasahara K., Inoko A., Izawa I., Mochizuki H., Togashi T., Kawamura Y., Kawakami Y., Goshima N., Kiyono T., and Inagaki M.: Screening of novel Aurora-A-associated proteins. 第72回日本癌学会総会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市) 2013年10月4日
6. Goto H. and Inagaki M.: Screening of novel Aurora-A-associated proteins to prevent primary cilia assembly at the centrosome in proliferating cells 第65回日本細胞生物学会、ウインク愛知(愛知県名古屋市) 2013年6月20日(招待講演)
7. Goto H.: Novel mitotic signaling crosstalk between PI3K-Akt pathway and Plk1. 1st International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling, 東京大学医科学研究所(東京都港区), 2013年2月2日(招待講演)
8. Goto H., Kasahara K., Izawa I., Kiyono T., Watanabe N., Elowe S., Nigg E.A., and Inagaki M.: Novel mitotic signalling crosstalk between PI3K-Akt pathway and Plk1. The 52nd Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Francisco (USA). 2012年12月17日
9. Inagaki M and Goto H.: Novel regulation of checkpoint kinase 1 (Chk1): Is Chk1 a good candidate for anti-cancer therapy? Mini-Symposium on "Stress Signals &

Responses”, Abo Akademi University Center of Excellence “Cell stress and Molecular Aging”. Turku (Finland), 2012 年 9 月 2 7 日 (招待講演)

10. Kasahara K., Goto H., Izawa I., Watanabe N., Kiyono T., and Inagaki M.: PI3K-Akt pathway controls mitotic progression through Plk1 activation. 第 71 回日本癌学会総会、ロイトン札幌 (北海道札幌市) 2012 年 9 月 19 日
11. Goto H., Li P., 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. 第 45 回日本発生生物学会 / 第 64 回日本細胞生物学会合同大会、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市) 2012 年 5 月 31 日
12. 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. 第 45 回日本発生生物学会 / 第 64 回日本細胞生物学会合同大会、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市) 2012 年 5 月 30 日
13. Kasahara K., Goto H., Izawa I., Watanabe N., Kiyono T., and Inagaki M.: PI3K-Akt pathway controls Polo-like kinase 1 (Plk1). 第 45 回日本発生生物学会 / 第 64 回日本細胞生物学会合同大会、神戸国際会議場 (兵庫県神戸市) 2012 年 5 月 29 日

[図書] (計 4 件)

1. Goto H. and Inagaki M. (2014) Method for the generation of antibodies specific for site and posttranslational modifications. Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols, Second Edition, “Methods in

molecular biology” series, eds. Ossipow V. and Fischer N. Humana Press. 1131: 21-31  
doi: 10.1007/978-1-62703-992-5\_2

2. 後藤英仁.: チェックポイントキナーゼ 1 (Chk1) による細胞周期の制御 生体の科学, 公益財団法人金原一郎記念医学医療振興財団 / 医学書院, 第 65 巻 第 4 号, 364-369, 2014
3. 後藤英仁, 稲垣昌樹.: DNA 損傷チェックポイントとがん-Chk1 阻害剤の展望と問題点-(特集-ストレス応答分子の解明: 分子メカニズムと病態理解) 生化学 (日本生化学会機関誌), 第 85 巻 第 3 号, 145-151, 2013
4. 後藤英仁, 稲垣昌樹.: 抗リン酸化抗体による新たな細胞周期研究「ヒトと医学のステージへ拡大する細胞周期 (中山敬一 編), 実験医学増刊号 (31 巻, 2 号), 羊土社, 186-193 (316-323), 2013

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

[http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/08hatsugan\\_seigyoy/index.html](http://www.pref.aichi.jp/cancer-center/ri/01bumon/08hatsugan_seigyoy/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)・腫瘍医化学部・室長

研究者番号: 20393126