

平成13年度

若手研究者奨励研究報告書

創薬等ヒューマンサイエンス研究

第2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

真核細胞の新規蛋白質リン酸化酵素の機能解明と、それを分子標的とする創薬探索への応用

所 属 国立感染症研究所 生物活性物質部
研究者 野口 耕司

要旨

ヒト由来の新規蛋白質リン酸化酵素 Nek9 の機能解析を行い、生化学的に既知の類似酵素とは異なる酵素活性を示すことや細胞周期における細胞内局在変化を明らかにした。また、カンジダ・アルビカンスの類似酵素遺伝子（仮名 CaNek）を見出した。

1. 研究目的

エイズ患者における日和見感染症をはじめ、悪性腫瘍患者等の易感染症患者に認められる深在性真菌症は、患者の予後を大きく左右する深刻な感染症であるが、繁用されるアゾール系薬剤に対する耐性出現が臨床で大きな問題になっている。そのため、主要な医真菌であるカンジダやアスペルギルス等に対して、アゾール系薬剤とは異なる作用機作を持ち、副作用の少ない新規治療薬の開発が期待されている。また、種々の異なる作用機作を持つ薬剤を開発することは、高齢化社会において感染症の増加が見込まれる近年において、治療薬、治療方法の選択肢を広げ、多剤耐性真菌の増加を抑制するとともに、高齢者の健康を維持していくことに貢献することが期待される。

ヒトと医真菌類における細胞周期制御分子は機能的には類似していても、その分子の構造は種々の違いがあると考えられるので、医真菌類の細胞周期制御分子に特異的な阻害剤の開発が可能である。従って、カンジダ等の細胞周期関連分子は魅力的な標的分子であり、これらの制御分子の機能が明らかになれば、カンジダ等に選択的に増殖抑制作用を示す薬剤の開発が可能と思われる。申請者は2000年度において、NIMAファミリーに属し細胞分裂制御に関わると考えられるヒト由来の新規蛋白質リン酸化酵素 Nek9 の遺伝子クローニングに成功しているが、本研究課題では、ヒト由来の新規蛋白質リン酸化酵素 Nek9 の機能解析とともに、カンジダ等の医真菌からこの相同遺伝子産物を同定し、その酵素活性制御機構をヒトと医真菌類で比較解析、さらには医真菌由来酵素に対する特異的阻害剤を探索し抗真菌薬の創薬に貢献することを目的としている。

2. 研究方法

A. プラスミド構築、遺伝子発現と免疫沈降

哺乳類細胞に Nek9 を発現させるため、アミノ末端に Flag タグを融合させた発現プラスミドを作製し、それをヒト胎児腎由来線維芽細胞 293T 細胞に遺伝子導入した。2日後、細胞を Nek9 緩衝液 (20 mM Hepes-NaOH pH 7.5, 420 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 0.1% NP-40, 1 mM PMSF, 2 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml pepstatin A, 2 µg/ml heparin, 1 µM okadaic acid) で可溶化し、さらに他の緩衝液を加え塩濃度を下げた後、そこに抗 Flag 抗体を加えて1時間反応させ、次に ProteinG セファロースを用いて Flag-Nek9 を沈降して回収した。このようにして回収した Nek9 を含む免疫複合体は洗浄緩衝液にて5回洗浄し、不純物を除き、リン酸化反応に使用する酵素源とした。また、ヒト HeLaS3 細胞を同様に可溶化し、抗 Nek9 抗体を用いて内在性の Nek9 を上記のように免疫沈降し、リン酸化反応に使用する酵素源とした。

B. 試験管内リン酸化反応

上記の方法で得られた Flag-Nek9 や内在性 Nek9 の免疫複合体を 20-30 µl の kinase buffer (50 mM

Hepes-NaOH pH 7.5, 10 $\mu\text{g/ml}$ heparin, 5 mM MnCl_2 , 10 μM ATP, 100 $\mu\text{Ci/ml}$ of [$\gamma^{32}\text{-P}$]-ATP, 0.2 mg/ml substrate)に懸濁し、30 $^\circ\text{C}$ で 20 min 反応させた。反応停止後、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法で分離し、BAS1800 イメージ解析装置でキナーゼ活性の定量解析を行った。

C. 蛍光免疫染色法

マルチチャンバースライド上で培養した HeLaS3 細胞を 4%ホルマリンで 10 分固定後、続いて 70%エタノールで 30 分処理して標本とした。PBS で希釈した一次抗体 (rabbit anti-Nek9 (1 $\mu\text{g/ml}$), mouse anti- β -tubulin ($\times 200$ 希釈))を室温 2 時間反応させ、続いて洗浄後 (5 分 \times 3 回)に PBS で希釈した蛍光色素標識二次抗体 (goat anti-rabbit-IgG AlexaFluor594 conjugated ($\times 300$), goat anti-mouse IgG AlexaFluor488 conjugated ($\times 300$))を室温 1 時間反応させた。洗浄後 (5 分 \times 3 回)に核を染色するため DAPI (1 $\mu\text{g/ml}$)を含んだ抗退色剤で封入し、Carl Zeiss LSM 510 system の共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察した。

D. カンジダ・アルビカンスの NIMA、Nek9 類似遺伝子産物の同定

ヒト Nek9 に類似の遺伝子を単離するため、カンジダ・アルビカンスのゲノムシーケンスデータベースの BLAST プログラム (<http://sequence-www.stanford.edu/group/candida/search.html>)を用いて相同性の高い遺伝子産物のスクリーニングを行った。スクリーニングのプロープとして、アスペルギルス NIMA キナーゼの触媒部位 11-295 番目のアミノ酸配列、ヒト Nek9 の触媒部位 29-287 番目のアミノ酸配列を使用した。マルチプルアライメントと系統樹は、Clustal W (v1.8) プログラム (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/E-mail/clustalw-j.html>) と TreeView プログラム (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>) を用いた。

3. 研究成果

新規蛋白質リン酸化酵素 Nek9 の活性至適条件を検討したところ、カチオンとしてマグネシウムよりもマンガンを好むこと、また基質特異性を探索したところ、ヒストン H1、H2A や H3 を好むことが明らかになった。また、申請者が作製した抗 Nek9 抗体を用いて細胞内局在を蛍光免疫染色法で検討したところ、主に核が陽性に染色され、核内蛋白質であることが示された。興味深いことに、細胞周期の分裂期においては、polar microtubule 近辺に Nek9 が移動する事が示され、Nek9 は細胞周期を通じて間期では核に、分裂期ではチューブリンファイバー上に移動する性質が明らかになった (図 1)。

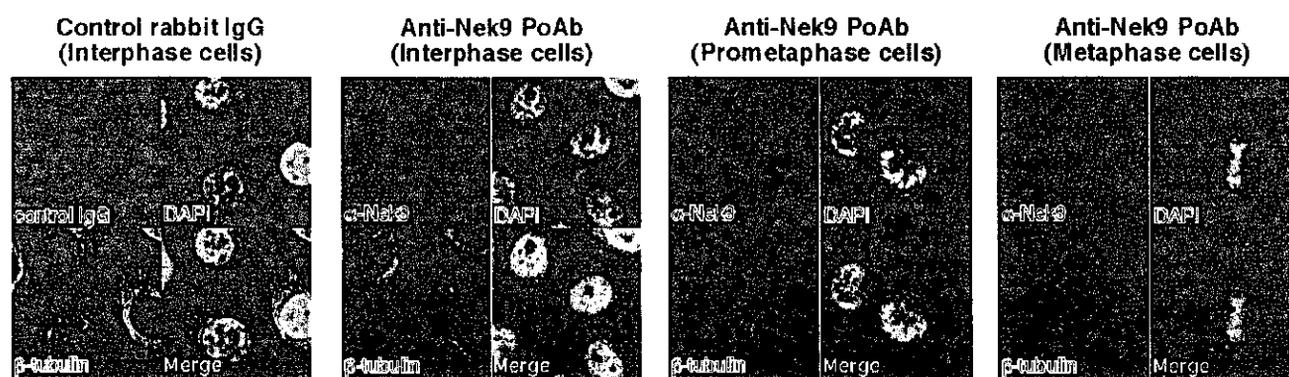


図 1 内在性 Nek9 蛋白質 (赤色) の細胞内局在

出芽酵母においても NIMA 類似キナーゼ Kin3 が機能不明ながら同定されていることから、カンジダ・アルビカンスの類似酵素の存在が強く予測され、また細胞周期における何らかの機能が類推される。そこで、ゲノムデータベースを用いた相同性スクリーニングを行い、NIMA、Nek9 や Kin3 と類似の遺伝子の全長塩基配列を見出した。この遺伝子産物 (仮名 CaNek) は 429 アミノ酸からなる蛋白質であった。BLAST を用いた相同性解析や系統樹による解析では意外なことに、CaNek は出芽酵母の Kin3 よりもアスペルギルス NIMA キナーゼにもっとも高い相同性 (identity 39%と similarity 60%)を示

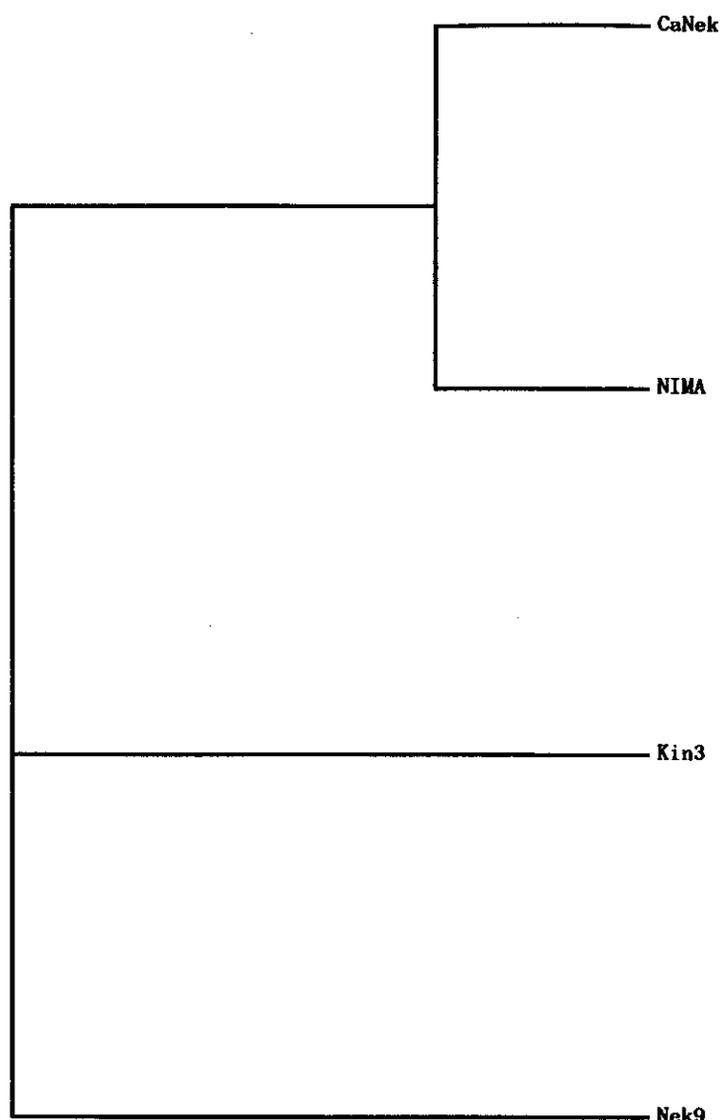


図 3 CaNek と NIMA、Kin3、Nek9 の系統樹

4. 考察

ヒト新規蛋白質リン酸化酵素 Nek9 は、細胞周期依存的な発現を示し、分裂期に高発現する蛋白質である。この Nek9 は大きく NIMA ファミリーに属すると考えられており、ヒトにおいても他の類似蛋白質 Nek2 などが報告されている。この Nek9 の生化学的な活性至適条件を検討したところ、カチオンとしてマグネシウムよりもマンガンを好むこと、また基質特異性を探索したところ、ヒストン H1、H2A や H3 を好むことが明らかになったが、この基質特異性は、他のファミリー分子、例えば哺乳類由来の Nek2 等とは異なることから生理的基質の差異が推測される。また、抗 Nek9 抗体を用いて細胞内局在を蛍光免疫染色法で検討したところ、主に核が陽性に染色され、核内蛋白質であることが示された。興味深いことに、細胞周期の分裂期においては、polar microtubule 近辺に Nek9 が移動する事が示され、Nek9 は細胞周期を通じて間期では核に、分裂期ではチューブリンファイバー上に移動する性質が明らかになったが、このような局在変化は他のファミリー分子例えば Nek2 とは異なるものであり、何らかの特有の生理的役割が示唆される。また他の細胞周期、分裂期に関与するキナーゼ、例えば Cdc5/PLK にも類似の局在の変化が報告されており、PLK が細胞周期の異なる時期では異なる役割を果たしていることが示唆されていることなどを考え合わせると、Nek9 は細胞周期の時期に応じて複数の生理的機能を持つ可能性が考えられる。真菌類である出芽酵母の類似キナーゼ Kin3 の機能はほとんど不明であるが、細胞周期の分裂期に高発現することが示されている。このことから、カ

ンジダ・アルビカンスの類似酵素の存在が強く予測され、また細胞周期における何らかの機能が類推される。本研究課題で見出された NIMA、Nek9 や Kin3 と類似の 429 アミノ酸からなる蛋白質（仮名 CaNek）も同様に細胞周期における何らかの機能が推測されるが、意外なことに、CaNek が、出芽酵母の Kin3 よりもアスペルギルス NIMA キナーゼにもっとも高い相同性 (identity 39% と similarity 60%) を示したことから、酵素活性条件や、生理的な基質特異性は NIMA と類似することが予想される。しかし、カルボキシ末端側の非触媒部位は、Kin3 や Nek2 と同様に短く、NIMA や Nek9 とは異なっているので、生理的役割については予想が難しいと推測される。カンジダ Nek9 類似遺伝子産物 CaNek の生理機能解析が今後の重要な課題と考えられる。

5. まとめ

新規蛋白質リン酸化酵素 Nek9 の特徴として、細胞周期に依存して発現が制御されること、生化学的に既知の類似酵素とは異なる酵素活性制御パターンを示すこと、細胞周期において局在が変化することなどから、Nek9 は細胞周期に関連して何らかの未知の機能をもつことが示唆された。また、カンジダ・アルビカンスの類似酵素 CaNek が同定されたが、そのアミノ酸配列の構造上、ヒトの Nek9 や Nek2 よりもアスペルギルス NIMA キナーゼにもっとも高い相同性を示すことが明らかになり、これら医真菌類の蛋白質リン酸化酵素に特異的な阻害剤の開発が可能であることが示唆された。

6. 研究発表

Fukazawa, H., Noguchi, K., Murakami, Y., Uehara, Y., MEK inhibitors restore anoikis-sensitivity in human breast cancer cell lines with constitutively activated ERK pathway. *Molecular Cancer Therapeutics*, in press, (2002).

Kitanaka, C., Kato, K., Ijiri, R., Sakurada, K., Tomiyama, A., Noguchi, K., Nagashima, Y., Nakagawara, A., Momoi, T., Shirouzu, M., Yokoyama, S., Kuchino, Y., Increased Ras expression and caspase-independent neuroblastoma cell death: possible mechanism of spontaneous neuroblastoma regression. *J Natl Cancer Inst.* 94, 358-368 (2002).

平成13年度

創業等ヒューマンサイエンス総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社