

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 Nek11 の同定、機能解析を行った。並びにカンジダ・アルビカンスの類似酵素遺伝子（仮名 CaNek/KIN3）を含む細胞周期関連遺伝子を単離、同定した。さらに、それらの遺伝子産物の組み替え蛋白質を作製し、生化学的解析を行った。

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め、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、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 Nek11（旧名 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 Nek11 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で、細胞周期に関連すると考えられる蛋白質リン酸化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. ヒト新規蛋白質リン酸化酵素 Nek11 の機能解析

哺乳類細胞に Nek11 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 Nek11 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-Nek11 を沈降して回収した。このようにして回収した Nek11 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 Nek11 抗体を用いて内在性の Nek11 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。

In vitro のキナーゼアッセイとして、上記の方法で得られた Flag-Nek11 や内在性 Nek11 の免

疫複合体を 20-30 μ l の kinase buffer (50 mM Hepes-NaOH pH 7.5, 10 μ g/ml heparin, 5 mM $MnCl_2$, 10 μ M ATP, 100 μ Ci/ml of [γ^{32} -P]-ATP, 0.2 mg/ml substrate) に懸濁し、30 °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。

細胞局在の解析のための蛍光免疫染色のため、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-Nek11 (1 μ 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 μ 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。

B. カンジダ・アルビカンスの類似酵素 CaNek/KIN3 と他の細胞周期関連遺伝子の単離と同定

ヒト Nek11 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 Nek11 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。さらに、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より、出芽酵母の細胞分裂期関連遺伝子、CDC5、Ipl と遺伝子構造上相同性の高い 2 種 (CaCDC5 と CaIPL) の遺伝子を上述のような手法で同定し、それぞれを PCR 法でクローニングした。

C. カンジダ・アルビカンス由来細胞周期関連遺伝子産物の組み替え蛋白質の生化学的解析

上記 B のようにして得られたカンジダ・アルビカンス遺伝子 CaNEK/KIN3、CaCDC5、CaIPL を GST 融合発現ベクター (CaNEK/KIN3 は pET42c に、CaCDC5 と CaIPL は pGEX-6p) にサブクローニングし、IPTG を用いて大腸菌にて誘導発現させた。発現してきた GST-融合蛋白質、GST-CaNek/Kin3p、GST-CaCdc5p、GST-CaIplp はグルタチオンセファロースにて回収、溶出して精製を行った。

In vitro のキナーゼアッセイ系を確立するため、上述で得られた GST-融合蛋白質 (2-5 μ g) を 20-30 μ l の kinase buffer (20 mM Hepes-NaOH pH 7.5, 5 mM $MgCl_2$, 2.5 mM $MnCl_2$, 20 μ M ATP, 1 mM DTT, 100 μ Ci/ml of [γ^{32} -P]-ATP) に懸濁し、種々の外来基質 (0.5 mg/ml substrate) の存在下で通常 30 °C で 30 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うことにより好ましい外来基質を同定した。さらに、既知キナーゼ阻害剤の感受性を検討するため、上記の反応液中に、種々の阻害剤 (Staurosporine, K252a, W-7, KN62, AG490, Genistein, U0126, CKI-7, H-7) 1 μ M 混合させ、反応させた。これらとは別に、キナーゼ反応の至適化として、反応温度を 0-45 度まで変えて 10 分反応させたり、反応液の pH を至適化するために、Hepes 緩衝液を Tris 緩衝液に変えて、pH5.5-11.2 まで異なる反応液を調整しこれらの反応液で 15 分反応させた実験も行った。

3. 研究成果

(1) 新規蛋白質リン酸化酵素 Nek11 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った。また、申請者が作製した抗 Nek11 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 Nek11 が移動する事

が示され、Nek11 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。

(2) 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。そこで、カンジダ・アルビカンスの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、Nek11 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/KIN3) 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%)を示した。また出芽酵母で、細胞分裂期に機能するとされている CDC5, IPL についても同様にカンジダ・アルビカンスの相同遺伝子 (CaCDC5, CaIPL) を特定することが出来た。これらの 3 種類のカンジダ相同遺伝子は、複雑な M 期チェックポイントに関わると推測されるので、組み替え蛋白質の作製を行い、生化学的な特徴付けを行ったところ、外来基質としては、CaNek/kin3p と CaIPLp はミエリンベースック蛋白質を好むのに対して、CaCdc5p はカゼインが好ましいことが判明した。さらに、既知阻害剤の感受性を比較検討した結果から、CaNek/Kin3p と CaIplp がスタウロスポリンや K252a といった選択性の弱い ATP 結合阻害物質に感受性を示した。また、CaIplp はスタウロスポリンと K252a に対し同程度に感受性であったが、CaNek/Kin3p はスタウロスポリンよりも K252a に対して 10 倍程度感受性が高く、CaNek/Kin3p に対する K252a の IC50 値は 100 nM 程度であった。この 2 種のキナーゼの感受性に対し、CaCdc5p はこれらの物質に非感受性であった。さらに、CaNek/Kin3p のキナーゼ活性の条件検討において、反応至適温度は 37 度付近で一般的であったが、反応至適 pH は 5.5-6.5 であることが判明し、中性よりも弱酸性側の方が活性が強くなることが明らかになった。

4. 考察・まとめ

(1) ヒト新規蛋白質リン酸化酵素 Nek11 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 Nek11 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 Nek11 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 Nek11 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 Nek11 が移動する事が示され、Nek11 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 や Ipl/Aurora にも類似の局在の変化が報告されており、Cdc5 や Ipl 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、Nek11 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。

(2) 真菌類である出芽酵母の類似キナーゼ Kin3p 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、Nek11 や Kin3 と類似の 429 アミノ酸からなる蛋白質 (仮名 CaNEK/KIN3) も同様に細胞周期における何らかの機能が推測される。意外なことに、CaNek/Kin3p が、出芽酵母の Kin3p 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た。しかし、組み替え蛋白質を用いた生化学的解析から、CaNek/Kin3p は NIMA と異なり、カゼインよりもミエリンベースック蛋白質の方が基質として好ましいことが明らかになり、単純にアスペルギルス NIMA キナーゼと同一に扱うことは出来ないと考えられた。さらに興味深いことに、CaNek/Kin3p は反応条件として弱酸性が好ましいということが明らかになったが、この知見は、既存の NIMA ファミリーキナーゼには一切報告のない新知見であり、CaNek/Kin3p の弱酸性下で

の新たな生理機能が推測される。生理機能解析が今後の重要な課題と考えられる。また、既知阻害物質に対する感受性の検討から、非選択性の強いスタウロスポリンや K252a といったものが、CaNek/Kin3p と CaIplp に阻害効果を示すことから、これらの基本骨格を持った化合物が特異的阻害剤の候補になりうると考えられる。ただし、K252a の CaNek/Kin3p に対する IC50 が 100 nM というのは、文献上、他のキナーゼ等に比べて高い濃度である。従って、今後の阻害剤探索においては、CaNek/Kin3p や CaIplp に対して数 nM 程度の IC50 を示し、他のプロテインキナーゼ C 等には阻害活性の弱まったものを K252a を基本骨格に持つような化合物から検索することが望ましいと思われる。一方、CaCdc5p がスタウロスポリンや K252a に全く感受性を示さなかったことは注目すべき点である。これらの化合物は、キナーゼの ATP 結合ポケットに親和性を持って ATP の結合を阻害すると考えられ、キナーゼ阻害剤のリード化合物として良く利用されるものであるが、CaCdc5p がこのような一般的な阻害剤に感受性を示さないということは、全く別の基本骨格を持つ化合物を検索する必要があると考えられる。このため、今後の阻害剤スクリーニングに関しては、天然物ソースを対象にするのが好ましいと推測され、もし CaCdc5p に阻害効果を示す化合物を単離できれば、キナーゼ阻害作用機構の新規モデルになるかもしれない。将来的には、これらのスクリーニングから得られた化合物をさらに改良して、カンジダ等の医真菌類に対する薬効を解析していくことが必要である。

5. 研究発表

(外国語論文)

Noguchi K., Fukazawa H, Murakami Y, Uehara Y., Nek11, a new member of the NIMA family of kinases, involved in DNA replication and genotoxic stress responses.
Journal of Biological Chemistry, 277, 39655-39665 (2002).

Fukazawa H, Noguchi K., Murakami Y, Uehara Y., Mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) inhibitors restore anoikis sensitivity in human breast cancer cell lines with a constitutively activated extracellular-regulated Kinase (ERK) pathway.
Molecular Cancer Therapeutics. 1, 303-309 (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.
Journal of the National Cancer Institute. 94, 358-368 (2002).

(学会発表)

野口耕司、深澤秀輔、上原至雅：新規細胞周期関連プロテインキナーゼ Nek8 の同定と機能解析。
第24回 日本分子生物学会年会（横浜）、2001年12月。

Noguchi K., Fukazawa H, Murakami Y, Uehara Y. :Identification of Nek9, a new member of the mammalian NIMA family.
Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on The CELL CYCLE (New York). 2002, May.

野口耕司、深澤秀輔、上原至雅：分子標的候補としての新規プロテインキナーゼ Nek9 の同定と細胞周期における機能解析。
第6回がん分子標的治療研究会総会（札幌）、2002年6月。

野口耕司、深澤秀輔、上原至雅：新規プロテインキナーゼ Nek9 の同定とその機能解析。
第61回日本癌学会総会（東京）、2002年10月。

野口耕司、深澤秀輔、上原至雅 :Genotoxic stress による新規プロテインキナーゼ Nek11 の活性化.

第25回日本分子生物学会年会（横浜）、2002年12月.

6. 知的所有権の取得状況
なし