

学位論文（要約）

ストレス応答 MAPK 経路及び p53 による PLK4 活性と中心体複製の制御機構

Maintenance of centrosome
integrity under stress conditions
by a PLK4, p53 and SAPK pathway
network

平成 23 年 12 月 博士（理学）申請

東京大学大学院理学系研究科

生物化学専攻

中村 貴紀

目次

| | |
|--|----|
| 1- 概要 | 3 |
| 2- 序論 | |
| 2-1 細胞内シグナル伝達 | 5 |
| 2-2 MAPK 経路 | 6 |
| 2-3 癌化に直接関与する driver-mutation と MKK4 の癌抑制遺伝子としての重要性 | 8 |
| 2-4 p38 及び JNK の標的分子 | 9 |
| 2-5 MAP3K の活性制御機構 | 10 |
| 2-6 中心体 | 12 |
| 2-7 中心体複製 | 14 |
| 2-8 Polo like kinase ファミリー | 15 |
| 2-9 PLK4 | 19 |
| 2-10 癌細胞における p53 の不活性化 | 20 |
| 2-11 p53 による PLK ファミリーの転写制御に関して | 21 |
| 2-12 p53 によるアポトーシス制御に関して | 21 |
| 3- 結果 | |
| 3-1 ストレス応答 MAP3K (MTK1, TAK1) は PLK4 と結合する | 24 |
| 3-2 PLK4 分子内の MTK1 結合領域の特定 | 27 |
| 3-3 ストレス応答 MAP3K (MTK1, TAK1) と PLK4 の結合は細胞質で起こる | 27 |
| 3-4 ストレス応答 MAP3K は PLK4 のキナーゼ活性を亢進させる | 32 |
| 3-5 PLK4 はストレス刺激依存的にストレス応答 MAP3K によって活性化される | 37 |
| 3-6 高浸透圧及び $TNF\alpha$ 刺激では PLK4 のリン酸化は主に TAK1 によって誘導される | 39 |
| 3-7 MAP3K による PLK4 のリン酸化に MAPKK 及び MAPK は関与しない | 41 |
| 3-8 p38 及び JNK 経路は中心体の過剰複製を抑制する | 42 |
| 3-9 p38 は S 期において過剰な中心体複製を抑制する | 45 |
| 3-10 $\Delta MKK3/6/4/7$ MEF では中心体数の異常が亢進する | 46 |
| 3-11 PLK4 の蛋白質発現量は p53 によって負に制御される | 50 |
| 3-12 PLK4 ノックダウン細胞ではエトポシド刺激によるアポトーシスが亢進する | 52 |
| 3-13 p53 と SAPK 経路は協調的に作用して中心体数の保全性を維持している | 56 |

目次

| | |
|--|----|
| 4- 考察 | 61 |
| 4-1 MAP3K と PLK4 が細胞質で結合する意味に関して | 63 |
| 4-2 p38/JNK が中心体数の異常を抑制するメカニズムに関して | 63 |
| 4-3 PLK4 のストレス刺激によって活性化される意義に関して | 64 |
| 4-4 癌抑制遺伝子 MKK4 の中心体制御に関して | 66 |
| 5- 材料及び実験方法 | 68 |
| 5-1 Buffer | 68 |
| 5-2 Plasmids | 68 |
| 5-3 細胞培養 | 69 |
| 5-4 Transient transfection | 69 |
| 5-5 レトロウィルスを用いた安定発現細胞株の樹立 | 69 |
| 5-6 GST-PLK4 (K41M) 精製蛋白質の作製 | 69 |
| 5-7 細胞画分 | 70 |
| 5-8 標的蛋白質のノックダウン | 70 |
| 5-9 ウェスタンブロッティング | 71 |
| 5-10 Co-immunoprecipitation assay | 72 |
| 5-11 <i>In vitro</i> kinase assay | 72 |
| 5-12 Phosphatase assay | 72 |
| 5-13 免疫染色 | 72 |
| 5-14 Proximity ligation assay (PLA) | 73 |
| 5-15 蛍光顕微鏡観察法 | 73 |
| 5-16 フローサイトメトリー | 73 |
| 5-17 統計解析 | 74 |
| 6- 謝辞 | 75 |
| 7- 参考文献 | 76 |

1-概要

中心体は分裂期において紡錘体極を形成し、染色体の均等分配に重要な役割を果たしている。この為、中心体複製は細胞周期 1 回につき一度だけ起こる様に厳密に制御されている。しかし、多くの癌細胞では中心体の複製制御が破綻しており、中心体数の異常な増幅が認められる。中心体の過剰複製は染色体の不均等分配を惹起し、発癌と癌の悪性化に関与すると考えられている。この様に中心体複製の制御は極めて重要な生命機能であるが、その分子機構には不明な点が多い。Polo-like kinase ファミリーの一つである PLK4 は、ショウジョウバエからヒトに至る広汎な生物種で保存されており、中心体複製制御に中心的な役割を果たしている。PLK4 の過剰発現は中心体の異常増幅を惹起することから、PLK4 の制御異常が発癌に寄与すると考えられている。

今回私は、ストレス応答 MAPKKK が PLK4 を直接リン酸化して活性化することを見出した。更にストレス刺激によって活性化された PLK4 は、中心体複製異常を惹起せず、むしろアポトーシスを抑制することを見出した。また、ストレス応答 MAPK (SAPK) が PLK4 による中心体の過剰複製を阻害すること、さらに p53 は PLK4 の発現抑制を介して PLK4 に依存した中心体の過剰複製を阻害することを明らかにした。従って SAPK および p53 が協調的に作用して細胞運命を決定すると共に、中心体安定性の維持に重要な役割を担っていると考えられる。興味深いことに癌細胞では p53 及び SAPK 経路（特に MKK4）の不活性化型変異が高頻度に見出される。そこで、p53 及び SAPK を同時に不活性化させた 2 種類の細胞株（Large-T 抗原を発現する MKK3/6/4/7 欠損 MEF、及び HPV16-E6 と不活性化型 MKK4 変異体を発現する U2OS 細胞）に DNA 損傷刺激を加えたところ、いずれの細胞株においても中心体の過剰複製と染色体の倍数体異常が観察された。従って、p53 及び SAPK はストレス状況下での中心体安定性を制御しており、両分子が同時に不活性化されると中心体数の異常と染色体不安定性が惹起され、最終的に発癌を招くと考えられる。

Abstract

Properly regulated centrosome duplication is a prerequisite for assembly of the bipolar mitotic spindle and accurate chromosome segregation, whose failure may lead to carcinogenesis. Indeed, centrosome amplification is a common feature of various cancers, but its molecular mechanisms remain obscure. Polo-like kinase 4 (PLK4), a divergent member of the PLK family, is an essential regulator of centrosome duplication. Hyperactivation of PLK4 by its overexpression causes supernumerary (three or more per cell) centrosomes. Here we report that, in response to various stress conditions including DNA-damage, stress-responsive MAPKKKs (such as MTK1/MEKK4 and TAK1) phosphorylate and activate PLK4, which then provides a pro-survival signal as well as promotes centrosome duplication. At the same time, however, activated stress-responsive p38 and JNK MAPKs (SAPKs) negatively regulate centrosome duplication. By the balance between these opposing effects, short-lasting stresses do not cause centrosome overduplication but only provide a pro-survival signal to protect cells from apoptosis. Under long-lasting stress conditions, activated p53 downregulates PLK4 expression to ablate its sustained activity. Thus, the SAPK pathways and p53 collaborate to prevent stress-induced centrosome amplification and chromosomal instability, but in different time frames. Failure of one or the other can be tolerated. If, however, both p53 and SAPKs/SAPKKs are simultaneously inactivated, continuous activation of PLK4 by MAPKKKs, lack of PLK4 downregulation by p53, and lack of inhibition of centrosome duplication by SAPKs, conspire to induce centrosomal instability in cells exposed to stress. It is notable that tumor cells are frequently defective both in p53 and the SAPKK MKK4. Indeed, tumor-derived catalytically inactive and dominantly negative MKK4 mutants induced centrosome amplification in response to genotoxic stress only in p53-negative cells. Thus, our results provided a mechanism that preserves the numeral integrity of centrosome under stress conditions, and revealed an unexplored tumor-suppressive function of MKK4 in preventing chromosomal instability.

2-序論

2-1 細胞内シグナル伝達

多細胞生物を構成する細胞は、増殖シグナルまたはストレスシグナルを受容し、細胞増殖または細胞死などの細胞応答することにより環境の変化に適応する。こうした増殖またはストレスシグナル伝達物質を核内に伝え必要な遺伝子の転写を誘導する一連の応答をシグナル伝達と呼ぶ。このシグナル伝達を大別すると細胞間シグナル伝達及び細胞内シグナル伝達が存在する。

細胞間シグナル伝達とは、2細胞以上の間で行われる情報の受容であり、ホルモンなどのシグナル分子を血中に放出して全身の細胞に伝達する内分泌型やシナプスなどの局所的に起こる傍分泌型などが挙げられる。

細胞内シグナル伝達とは、細胞外の増殖因子、サイトカイン、ホルモンなどのシグナル伝達分子を細胞膜受容体で認識し、細胞内シグナルに変換した上で細胞内へと情報を的確に伝達することを指す。この細胞内シグナルの例として G 蛋白質やリン酸化修飾などが挙げられる (Fig. 1)。

G 蛋白質は、GTP と結合すると活性型となり、逆に GAP によって GTP が GDP に変換されると不活性型となることにより活性が制御されている。その例として 7 回膜貫通型受容体と共役する三量体 G 蛋白質や Ras, Rho, Rab, Arf, Ran などの低分子量 G 蛋白質などが知られている。

リン酸化酵素蛋白質として、セリン/スレオニンリン酸化型とチロシンリン酸化型などがあり、リン酸化反応が段階的かつ連続的に行われることにより細胞内に情報が正確に伝達されていく。チロシン型として EGFR, ErbB2, JAK, FAK などが知られており、セリン/スレオニン型として MAPK, CDK,

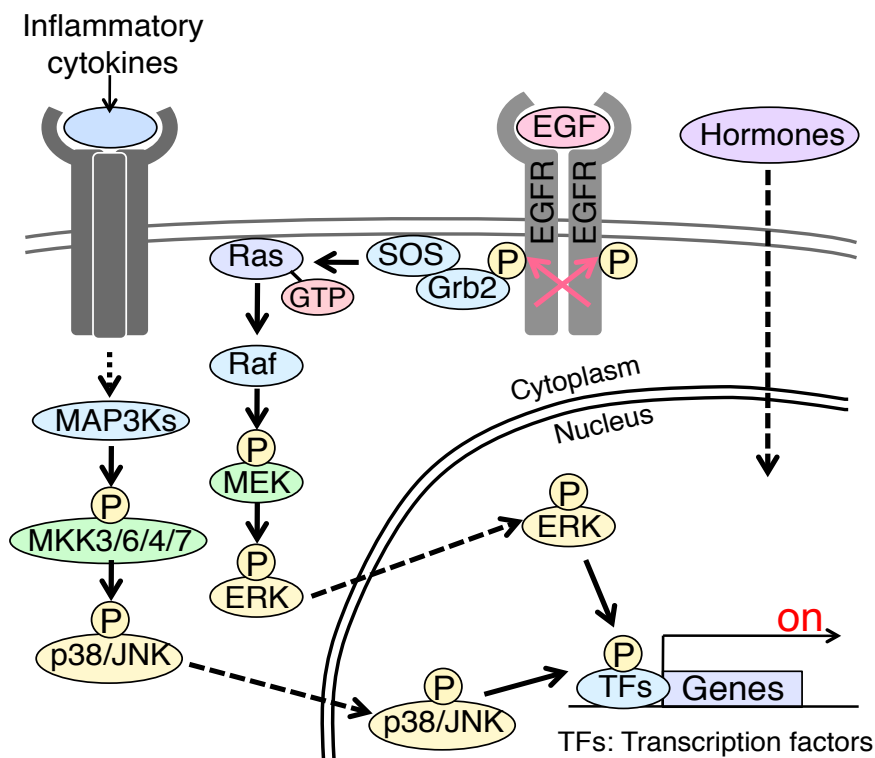


Fig.1 細胞内シグナル伝達

PKA, ATM, AurK などが報告されている。

2-2 MAPK 経路

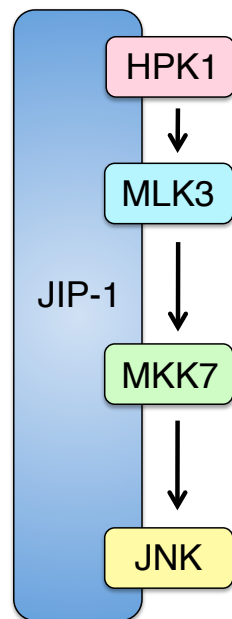
細胞外からの刺激を細胞核へ的確に伝え、遺伝子発現を制御することで、様々な細胞応答を誘導する細胞内シグナル伝達の 1 つに MAP キナーゼシグナル伝達経路 (MAPKKK-MAPKK-MAPK) がある^{1,2}。MAP キナーゼ経路では、まず活性化因子などにより MAPKKK が活性化される。この MAPKKK は MAPKK の活性化ループ内の Thr 又は Ser 残基をリン酸化することによって MAPKK を活性化し、MAPKK は更に MAP キナーゼの活性化ループ内の Thr 及び Tyr 残基をリン酸化することによって MAP キナーゼを活性化する。このように MAP キナーゼ経路は MAPKKK-MAPKK-MAPK の順に、連続的かつ段階的なリン酸化反応を介して活性化し、シグナルを下流に伝達する (Fig. 0-2&0-3)。

哺乳類においては、細胞増殖及び分化に作用する ERK 経路とストレス応答 (細胞死、細胞周期停止、炎症反応など) に関与する p38 / JNK 経路という 3 つの MAP キナーゼ経路が主に知られている (Fig. 0-3)。これら複数の MAP キナーゼ経路間でシグナルの誤った混線は起こらないように調節されている。こうした MAP キナーゼ経路の正確なシグナル伝達を可能にする機構として、足場蛋白質及び各キナーゼ分子の選択的相互結合 (docking interaction) が知られている (Fig. 2)。

哺乳類の足場蛋白質として JIP1 / 2 / 3, β -arrestin2, MP1, POSH などが知られて

いる。足場蛋白質は、MAP キナーゼカスケードを構成する各キナーゼ分子を足場蛋白質上

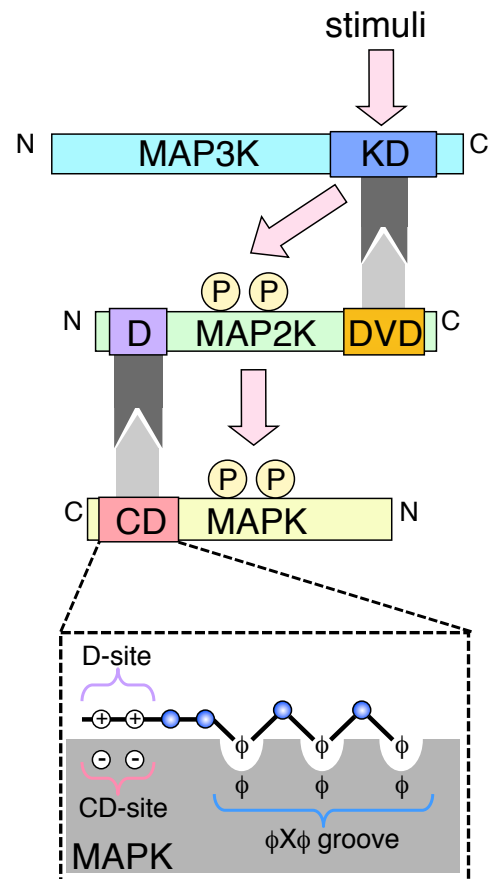
足場蛋白質による制御



足場蛋白質

- ・MP-1
- ・MEKK1
- ・KSR
- ・ β -arrestin
- ・JIP2/3/4 etc

ドッキング相互作用による制御



ϕ : hydrophobic amino acids

Fig.2 MAPK経路のクロストーク防止機構

に同時に結合させることによって、各 MAP キナーゼ経路間の混線を防止し、正確かつ効率的なシグナル伝達を可能にしている。JIP-1 を例に挙げると、HPK1 (Ste20-related kinase)、MLK3 (MAPKKK)、MKK7 (MAPKK) 及び JNK (MAPK) が JIP-1 上に同時に結合することにより、円滑な連続的なリン酸化反応を起し JNK 経路のみが効率良く活性化される³。しかしながら足場蛋白質の発現は組織特異的であり、また結合するキナーゼ分子の種類も限られるため、限定された MAPK 経路の活性調節機構であることが知られている。そこで、より普遍的なメカニズムとして認知されているのがキナーゼ分子同士のドッキング相互作用 (docking interaction) である。MAP キナーゼや MAPKK などの分子は、同じカスケード内に属する上流のキナーゼ分子又は下流の基質分子を認識して選択的に結合するドッキングサイトを持っているので、必要な経路だけを活性化してシグナルを下流に効率的に伝達している。

このキナーゼ分子間のドッキング相互作用 (docking interaction) の一つとして、MAP キナーゼ内に存在する CD ドメインを介する分子結合が挙げられる⁴。転写因子、MAPKK、脱リン酸化酵素内の D ドメインがこの MAP キナーゼ内の CD ドメインと選択的に結合す

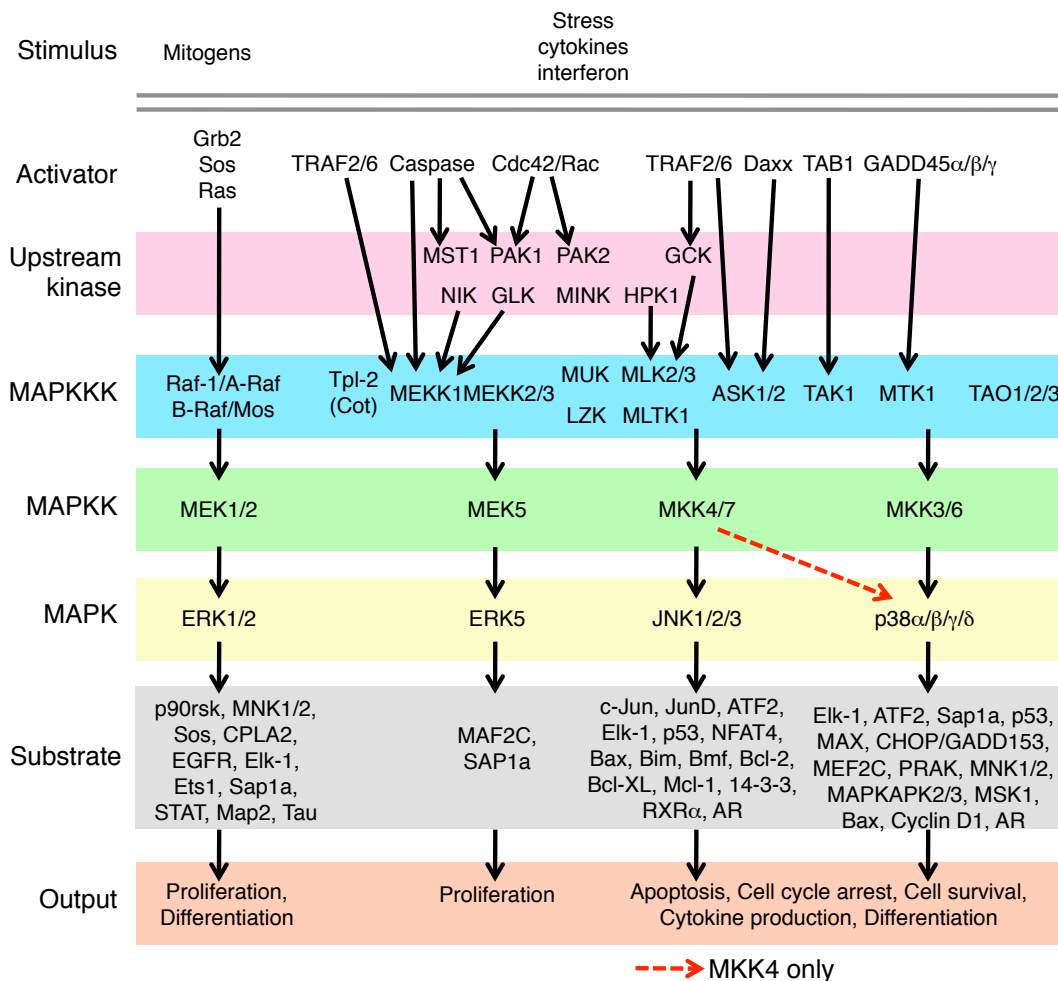


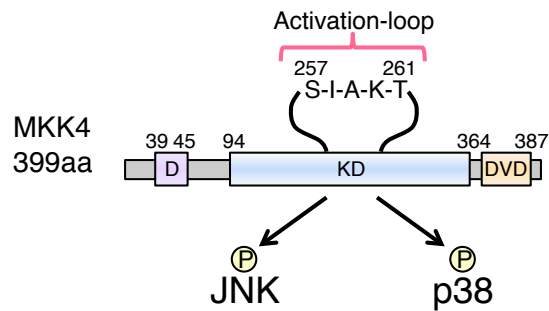
Fig.3 MAPK経路のまとめ

る。この時 CD ドメイン内の Asp/Glu といったマイナスの電荷を帯びたアミノ酸と D ドメイン側の Lys/Arg/His のプラス電荷のアミノ酸が結合する。また、CD ドメイン内の疎水性アミノ酸によって形成された凹みに D ドメイン側の疎水性アミノ酸が疎水結合する。このように電荷による結合と疎水結合により CD ドメインと D ドメインが確実に結合することにより、正確かつ効率的なシグナル伝達の制御を可能にしている。

当研究室では、これまで MAPKKK・MAPKK 分子間の特異的結合を規定するメカニズムの解析を行い、ほぼ全ての MAPKK 分子 (MEK1/2, MKK3/6, MKK4/7) の C 末端非酵素領域に、対応する上流の MAPKKK 分子との選択的結合に必要な新規ドッキングサイト (DVD サイト) が存在することを明らかにした⁵。さらに、この DVD サイトがシグナル特異性維持のみならず、MAPKKK から MAPKK への効率的なシグナル伝達にも必須であることを報告してきた。

2-3 癌化に直接関与する driver-mutation と MKK4 の癌抑制遺伝子としての重要性

癌細胞を調べると多くの蛋白質に変異が入っていることが知られている。しかし、変異にも 2 種類存在し、driver-mutation と呼ばれる直接癌化を進行させる変異と、passenger-mutation と呼ばれる癌化とは無関係な変異がある。哺乳類細胞内には数百種類のキナーゼが存在し、多くの癌細胞でキナーゼ遺伝子への driver-mutation が見つかった⁶。その中には DNA 損傷に応答する ATM、細胞周期の進行を司る Aurora kinase A (AurK A) への変異などが報告されている。また、MAPK 経路に関与するキナーゼ分子にも多くの driver-mutation が存在することが明らかになりつつある。その 1 つとして B-Raf が知られており、B-Raf V600E 変異体は ERK 経路の恒常的



MKK4 driver-mutations

| Tissue | Type | cDNA annotation | Protein annotation |
|------------|-------------------------|-----------------|---------------------|
| Colorectal | adenocarcinoma | C460→T | R154W |
| Colorectal | adenocarcinoma | G929→A | W310 stop(Δ311-399) |
| Colorectal | adenocarcinoma | G835→A | A279T |
| Colorectal | adenocarcinoma | C910→T | R304 stop(Δ305-399) |
| Lung | large cell carcinoma | G882 deletion | I295 frame shift 23 |
| Lung | squamous cell carcinoma | A425→T | Q142L |
| Melanoma | | G725→A | S251N |
| Ovarian | serous carcinoma | A701→T | N234I |

Fig.4 MKK4のdriver mutation

活性化を誘導すると共に悪性形質転換を促進させる。また、興味深いことに MAPKK の中で MKK4 に多くの driver-mutation が存在することが最近の研究で明らかになってきた (Fig. 4) ^{6,7}。その変異の多くがキナーゼドメイン (94-364aa) 内に集中しており、これらの変異の結果として MKK4 のキナーゼ活性 (下流の JNK へのリン酸化) が低下または消失することが報告されている。

MKK4 は JNK 経路の活性化を仲介するキナーゼとして広く認識されている。しかし、MKK4 は UV 刺激時においては JNK 経路のみならず p38 経路も併せて活性化できることが明らかになっており ⁸、細胞がストレス刺激に曝された場合には、MKK4 が効率良く JNK 及び p38 両経路を活性化させ、細胞死、炎症反応などのストレス応答を示すと考えられる ⁹。多くの癌細胞で発見された MKK4 の driver-mutation の多くが不活性化型変異であり ⁷、こうした変異を含む細胞では MKK4 がドミナントネガティブに作用するため JNK/p38 経路の両方が活性化されず、本来細胞死が誘導される様な悪性転換効率の高い細胞が生存し最終的に癌細胞になると考えられる。

2-4 抗腫瘍作用における p38 及び JNK の標的分子

JNK はアポトーシス促進因子 Bax, Bim, Bmf をリン酸化することにより、ミトコンドリアからの Cyto C の放出を増加させることによりアポトーシスを誘導する ^{10,11} (Fig. 5)。また、アポトーシス抑制因子である Bcl2, Bcl-xL, Mcl-1 などをリン酸化することにより不活性化させ、アポトーシスが促進される ^{12,13}。Bax は通常 14-3-3 によって細胞質に留まっている。しかし、JNK により 14-3-3 がリン酸化されると、14-3-3 が Bax から解離する ¹⁴。この結果、Bax がミトコンドリア膜に局在できるようになりアポトーシスが誘導される。また、JNK によって c-Jun がリン酸化されると、c-Jun は TGF- β 1 遺伝子のプロモーター領域に結合できるようになり、HDAC3 の同領域への移行を促進する。この結果、TGF- β 1 の転写が阻害されるため、TGF- β 1 に依存した癌化の進行が抑制される ¹⁵。

p38 は G1/S 期の進行を制御している。p38 は cyclin D1 の T286 をリン酸化することによりユビキチン分解を促進し、G1/S 期の進行を停止することが知られている ¹⁶ (Fig. 5)。また、p38 は転写抑制因子 HBP1 をリン酸化することにより cyclin D1 の転写を阻害する。さらに、p38 は CDK 阻害剤 p16/p19 などの発現を促進することにより、cyclin D1/CDK4 活性を抑制する ¹⁷。以上 3 つの機序により p38 は cyclin D1/CDK4 の活性を低下させ、G1/S 期の進行が阻害される。また、p38 は G2/M 期の進行も制御している。p38 によって MAPKAPK2 をリン酸化すると、活性化した MAPKAPK2 は Cdc25B1 の S309, Cdc25B2

の S323 及び Cdc25C の S216 をリン酸化する。リン酸化された Cdc25B/C は 14-3-3 によって積極的に核内から細胞質に輸送される¹⁸。この結果、Cdc25B/C による cyclin B1/CDK1 の活性化が起こらないため、G2/M 期の進行が阻害される。更に p38 は p53 の活性制御も担っている。p38 が p53 の S33 及び S46 をリン酸化する¹⁹。こうしてリン酸化された p53 を異性化酵素 Pin1 が結合する^{20,21}。これにより Pin1 が p53 の異性化を誘導し、p53 の安定性及び転写活性を調節する。この結果、p53 による細胞周期停止やアポトーシスを促進する。

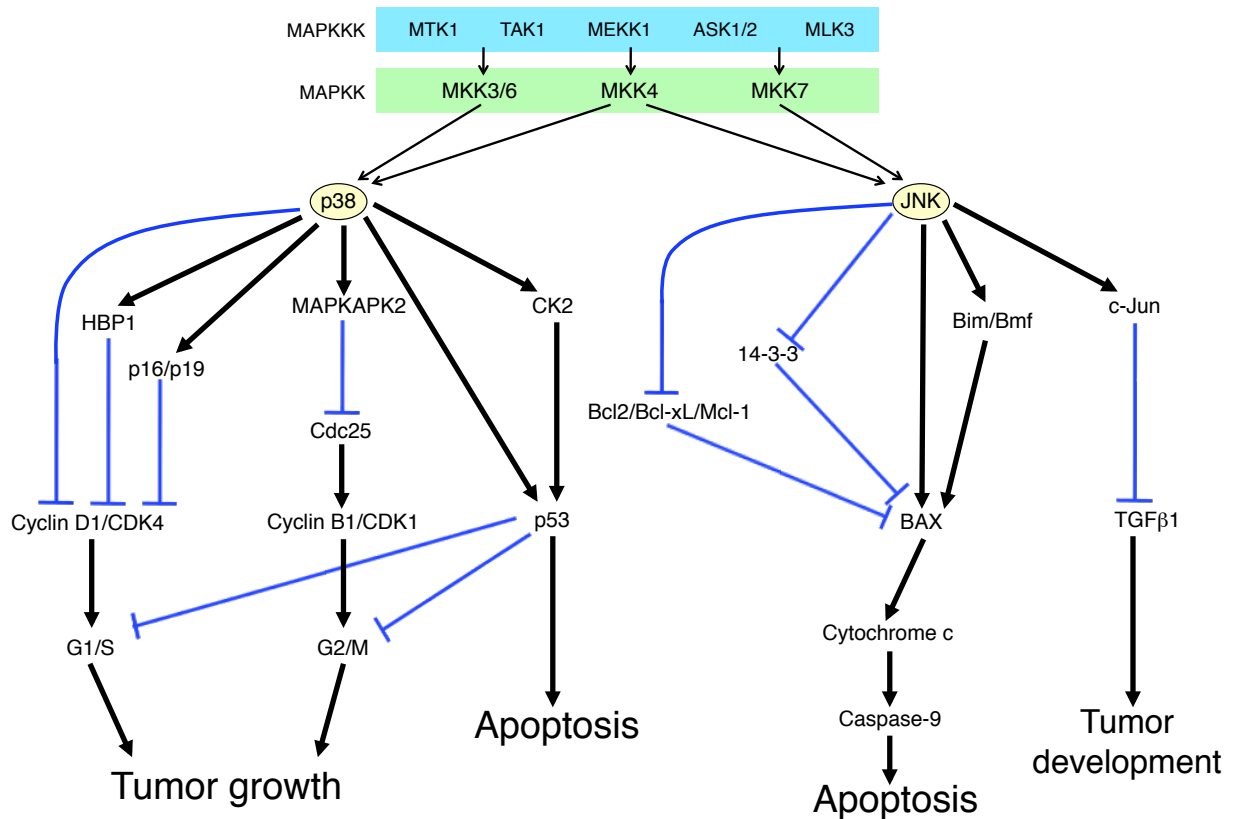


Fig.5 p38及びJNKの標的分子

2-5 MAP3K の活性制御機構

MAPK 経路（カスケード）では、MAP3K→MAPKK→MAPK の順番に連続的かつ段階的なリン酸化反応が誘導されることは上記した通りである。ここでは、この連続反応の第一段階に当たる MAP3K の活性調節機構に関していくつかの MAP3K を例に挙げて解説したいと思う。

・ MTK1^{22,23}

MTK1 分子内には auto-inhibitory domain (AID) と呼ばれる活性抑制領域、coiled-coil 構造によって構成される 2 量体化領域、キナーゼドメイン及び活性化因子 GADD45 の結合領域が存在する (Fig. 6)。

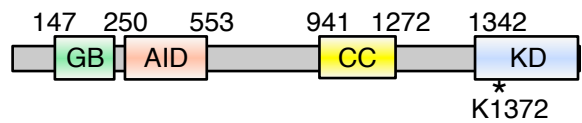
MTK1 は通常は AID がキナーゼドメインを覆い隠す様に結合することによって不活性化状態になっている。しかし細胞がストレス刺激に曝されると GADD45 の発現が誘導され、GADD45 が MTK1 の N 末端領域に位置する GADD45 結合領域に結合する。GADD45 の結合によりキナーゼドメインに結合していた AID が外れ、MTK1 の自己抑制が解除される。その後、coiled-coil ドメ

インを介して MTK1 の 2 量体が形成される。そして 2 量体化した MTK1 は分子間の自己リン酸化(トランスのリン酸化)を誘導することにより MTK1 の活性化が起こる²⁴(Fig. 7)。

・ ASK1

ASK1 分子内には N 末端及び C 末端領域にそれぞれ coiled-coil ドメインが存在する。通常 ASK1 は C 末端領域の coiled-coil ドメインを介して 2 量体化を形成している (Fig. 8)。しかし、N 末端側の coiled-coil ドメインは ASK1 の活性阻害因子である Thioredoxin が結合するため、普段は N 末端を介する分子間結合は阻害されている²⁵。ストレス刺激により活性酸素 ROS が産生されると、ROS により

MTK1 1607aa



GB: GADD45-binding domain

AID: Auto-inhibitory domain

CC: Coiled-coil domain

KD: Kinase domain

Fig.6 MTK1の1次構造

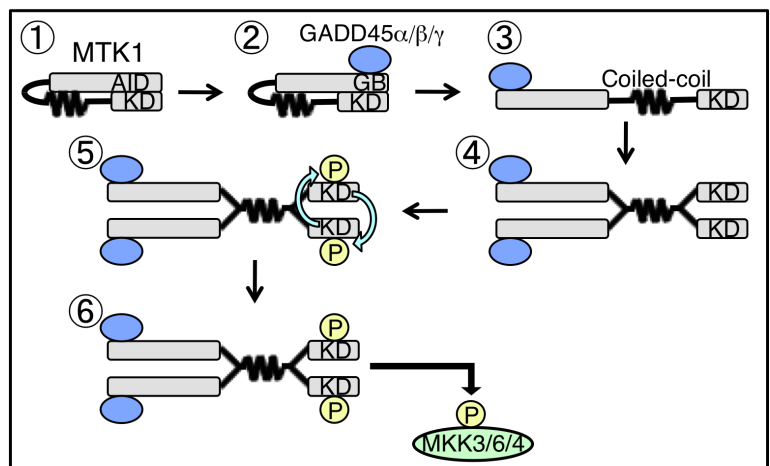


Fig.7 MTK1の活性化機構

ASK1 1374aa

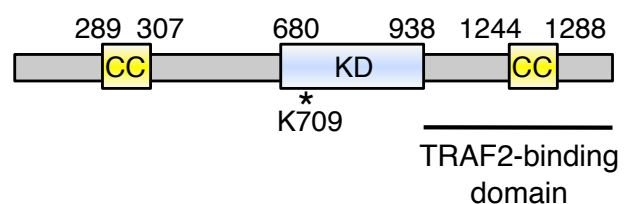


Fig.8 ASK1の1次構造

Thioredoxin が ASK1 から解離し、活性化因子である TRAF2/6 が ASK1 と結合できるようになる。TRAF2/6 の結合によって ASK1 の N 末端領域を介した 2 量体化が促進され、その結果 ASK1 の自己リン酸化が誘導されることで ASK1 は活性化される。

・ TAK1

Ste11 欠損酵母において、その機能を補うことができる遺伝子として TAK1 が同定された²⁶ (Fig. 9)。TAK1 は TGF β , TNF α , IL-1 によって活性化され細胞死、サイトカイン産生などのストレス応答を示す。

TAK1 分子内の N 末端の約 20 アミノ酸からなる領域により不活性状態に保たれている。活性化因子 TAB1/2/3 が TAK1 と結合すると、TAK1 の自己リン酸化が誘導され活性化される²⁷。

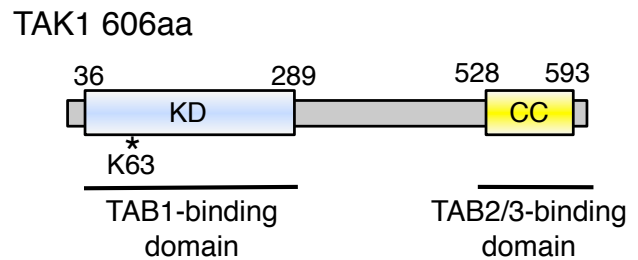


Fig.9 TAK1の1次構造

2-6 中心体

細胞小器官の一つである中心体は、2つの円筒形をした中心小体と呼ばれる微小管構造とその周囲に局在する Pericentriolar matrix (PCM) から構成されている (Fig. 0-10)。中心体は細胞周期の S 期において複製が行われ倍加した後、G2 期に中心小体内の微小管の伸張が起こり、成熟した中心小体が形成される (Fig. 0-11)。細胞分裂期 (M 期) に進行すると中心体は核膜に沿って移動して核膜の両極 (紡錘体極) に局在する。核膜が消失すると、中心体は微小管構造中心 Microtubule organizing center (MTOC) として多くの微小管の伸張に関与する。伸張した微小管が染色体の動原体部分に結合することで紡錘体を形成する。その後スピンドルチェックポイントが解除されると、紡錘体極 (星状体) へと微小管の収縮が起こる。個々の染色分体は動原体の部分で微小管と結合しているため、微小管の収縮に連動して染色体の均等分配が誘導される。このように中心体は染色体安定性 (染色体の均等分配) と密接に関与しており、中心体数は通常 1 または 2 個に維持されている。中心体複製の破綻により中心体数に異常 (≥ 3) をきたすと染色体が均等に 2 等分されないため^{28,29}、子孫に正確な遺伝情報が伝達できなくなる。また、こうした染色体の異数性は多くの癌細胞に見られる特徴であり、細胞の癌化を進行させる大きな要因となる。このように中心体複製調節機構は、細胞分裂を繰り返す多細胞生物にとって重要であることは言うまでもないが、その分子メカニズムに関しては未だに不明な点が多く、その解明は急務である。

近年の研究により中心体を構成する蛋白質に関して大規模なスクリーニングが行われた結果、中心体に局在する多くの蛋白質が同定され中心体の全容が明らかになりつつある³⁰。また、電子顕微鏡の解像度の進歩により中心体の構造がより鮮明に解析できるようになり、今後中心体の構造及び複製に関わる分子機序の解明が進展することが期待されている³¹。

中心小体を更に細分化すると、cartwheel 構造（central hub+9本の spoke+pinhead）とその周囲に9組の微小管（3本/1組）から構成されている（Fig. 10）。また、微小管が伸張する先端側には微小管の長さを制御する cap 構造が存在しており、中心体の微小管部分

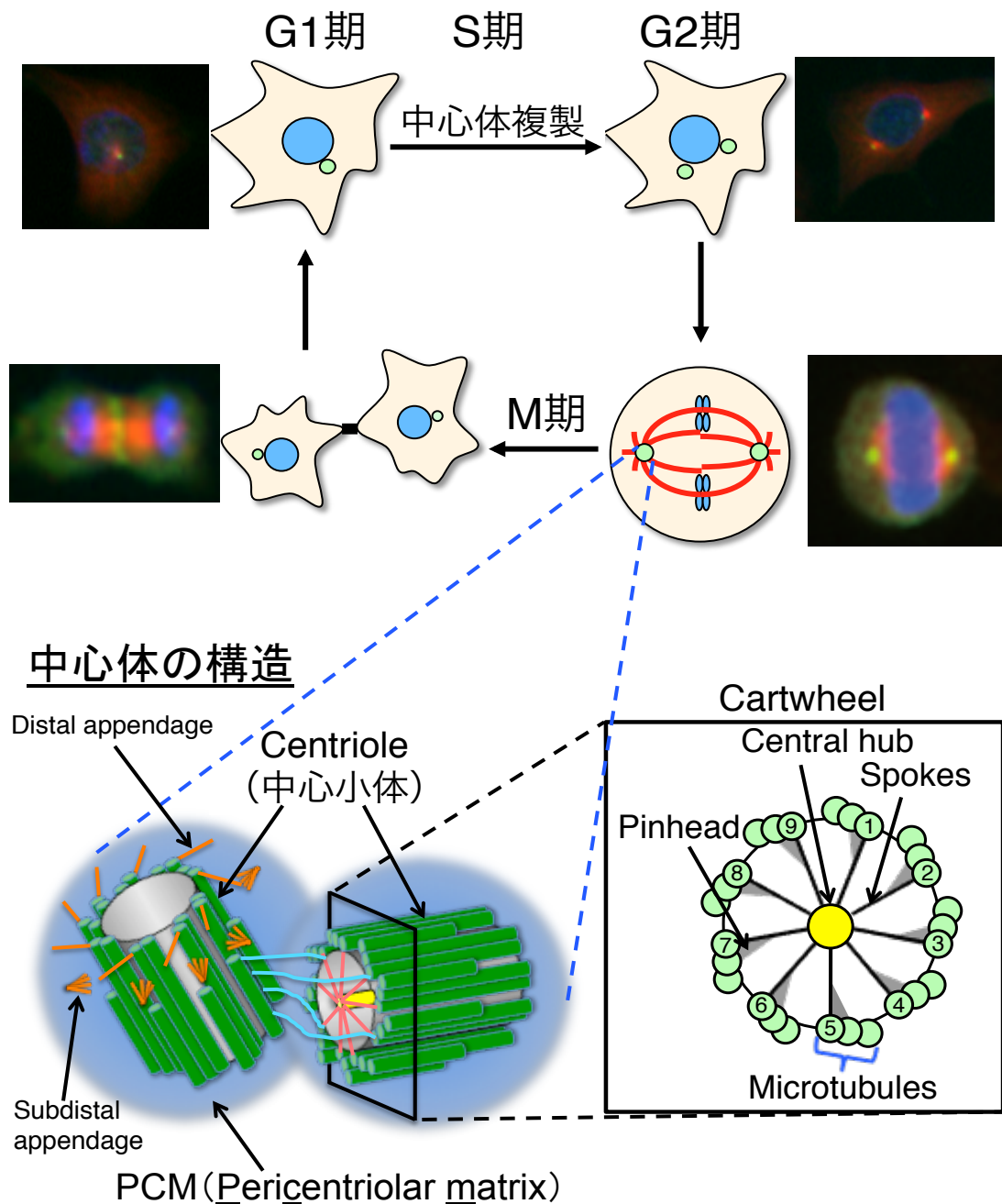


Fig.10 中心体の構造と機能

がおよそ 500nm の長さになるように保たれている。

中心小体には mother centriole と daughter centriole が存在し、daughter centriole は S 期の中心小体複製によってできた新たな中心小体である。一方は mother centriole は distal appendage または subdistal appendage などの付属物を有すると共に、微小管がアセチル化などの修飾を受けており安定した構造をとっている。mother centriole は S 期に入ると中心体複製における構築基盤（platform）として働くことが知られており、この構築基盤を起点として新たな daughter centriole の複製が開始される。

また、中心体の構成蛋白質を遺伝子欠損させた場合、中心体複製が起こらなくなり、中心体数の異常が惹起されることが報告されている^{32,33}。更に、遺伝子解析により中心体複製に関与する蛋白質 CEP152, CPAP の点変異が発見されており、これらの点変異が先天性小頭症を誘発することがこれまでの臨床知見により明らかになっている³⁴⁻³⁶。

2-7 中心体複製

中心体の複製は S 期を中心に G1 期の終わりと G2 期に渡って行われる³⁷。G1 期の終

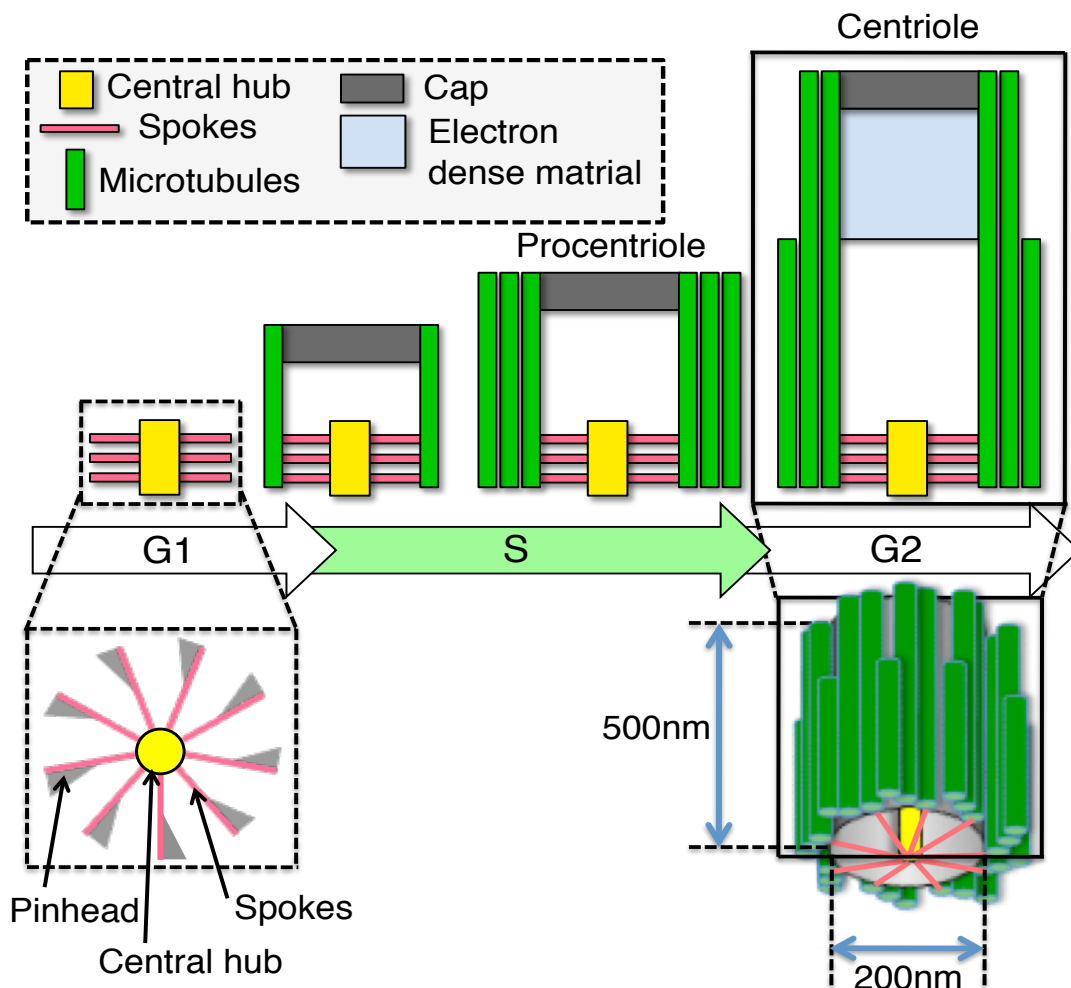


Fig.11 中心小体複製

わりから S 期の始まり頃に cartwheel 構造が形成される (Fig. 11)。cartwheel 構造は SAS-6 によって構成された central hub と呼ばれる中心部分^{38,39}とそこから放射状に伸びる 9 本の spoke、spoke の先端部分に Cep135 などによって構成された pinhead から成っている。その後、S 期に pinhead の先端に 1 組 3 本の微小管が結合し、微小管が伸長する先端側 (distal end) に微小管の長さを制御する CP110 などによって構成された cap 構造^{40,41}が形成される。この段階 (S 期の終わり) の中心小体 (centriole) は procentriole と呼ばれ、中心小体を構成する微小管の長さなどが未成熟な状態である。その後、S 期の終わりから G2 期において微小管の伸長が起こり成熟した中心小体構造となる。

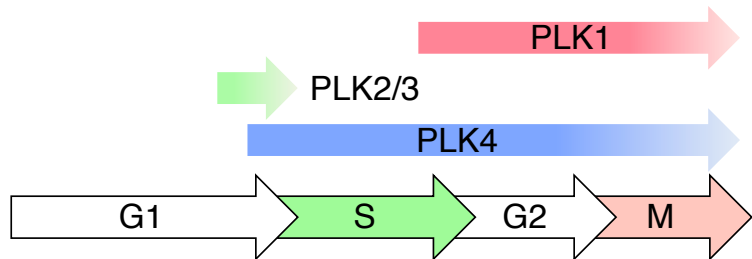
これまでの先行研究から、G1/S 期に cartwheel 構造が形成される過程において PLK4 の活性が必要であることが明らかになっているが、PLK4 の標的分子などその詳細な分子メカニズムは不明のままである。

2-8 Polo-like kinase

Polo とは、キイロショウジョウバエの紡錘体形成異常を示す変異体名であり⁴²、その後 Polo がリン酸化酵素であることが解明された⁴³。Polo-like kinase (PLK) は、この Polo と類似した配列を持つヒトの (セリン/スレオニン) リン酸化酵素のことを指す。PLK の基本構造として、キナーゼドメインと基質との結合に関与する polo-box ドメインから構成されている (Fig. 12)。

哺乳類の PLK は、PLK1, PLK2 (SNK), PLK3 (FNK/PRK), PLK4 (SAK) の 4 種類存在する (Fig. 12)。PLK は細胞周期の進行に合わせて発現が制御されており、PLK1 は S~M 期、PLK2/3 は G1/S 期、PLK4 は G1/S~M 期において発現する様に制御を受けている⁴⁴。また、蛋白質の 1 次構造で比較すると PLK1~3 は非常に似ており、キナーゼドメインと 2 つの polo-box ドメインが保存

PLKの細胞周期における発現量の変化



PLKファミリーの基本構造

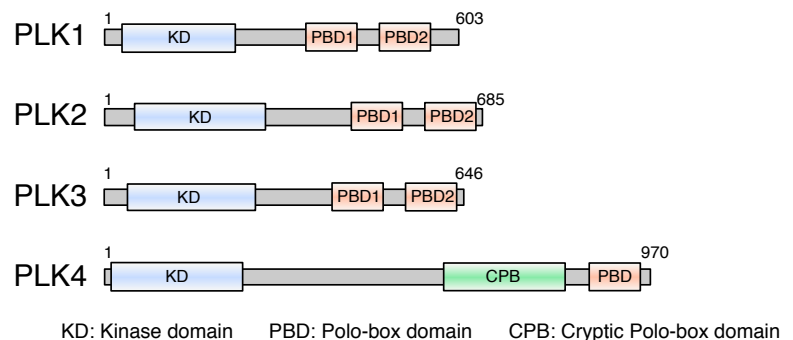


Fig.12 Polo like kinase (PLK) ファミリー

されている⁴⁵。一方、PLK4 はキナーゼドメインを持つが、polo-box ドメインは 1 つしか保存されていない。代わりに cryptic polo-box ドメインと呼ばれる PLK4 独自のドメインが保存されている⁴⁶。

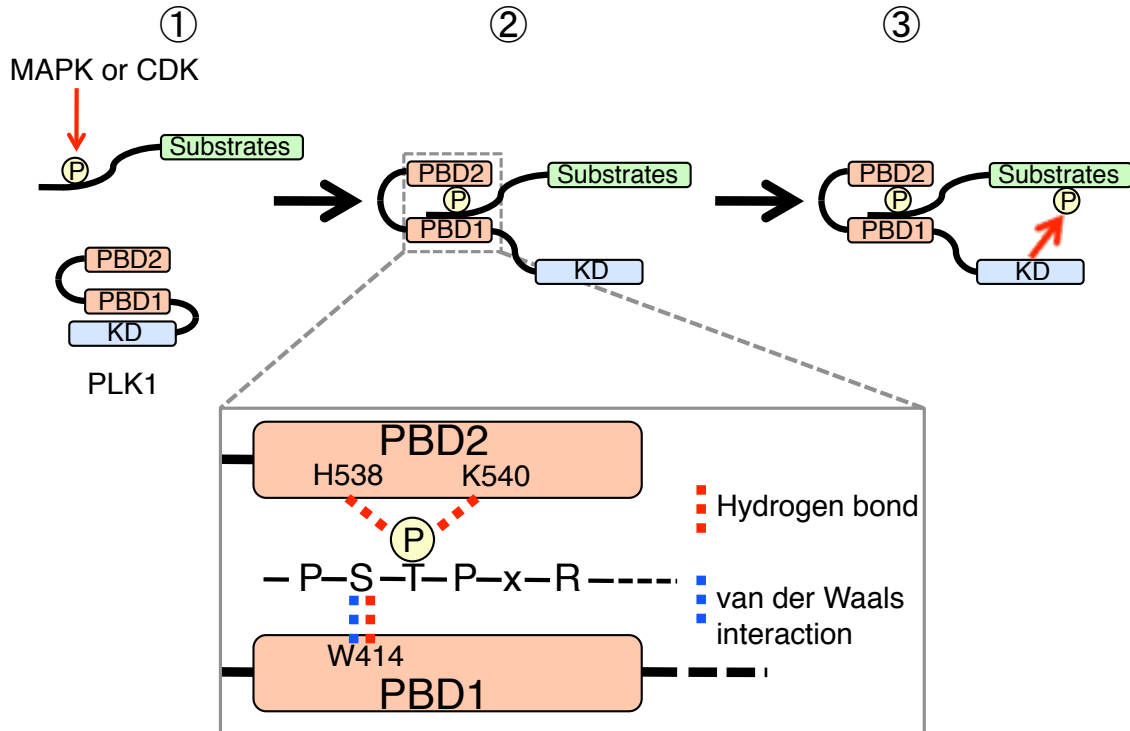


Fig.13 PLK1~3の基質の認識及びリン酸化機構

polo-box ドメインは基質を認識する上で重要であることが明らかになっており、PLK1~3の基質認識機序は次のようである (Fig. 13)。PLK1 を例に説明すると、まず、primary kinase として MAPK (モチーフ : P-X-S/T-P) または CDK (モチーフ : S/T-P-X-K/R) などが PLK の基質をリン酸化する ($S\text{-}S/T\text{-}P \rightarrow S\text{-}pS/T\text{-}P$)。次に、リン酸化された pSer/Thr 残基に対して polo-box ドメイン 2 の H538 及び K540 が水素結合し、更にリン酸化残基の 1 つ手前の Ser 残基に対して polo-box ドメイン 1 の W414 が van der Waals 力及び水素結合によって結合する^{47,48}。また、polo-box ドメインは基質が存在しない場合には polo-box ドメインがキナーゼドメインを覆う様な 3 次元構造をとるため PLK のキナーゼ活性が抑制されている。しかし、基質が polo-box ドメインを介して PLK と結合すると不活性状態に保たれていたキナーゼドメインが露出する共にそのキナーゼ活性が亢進する。その結果、MAPK や CDK などによるリン酸化サイトとは異なる基質分子内の Ser/Thr 残基をリン酸化する。リン酸化されることで基質の (もつ細胞周期における) 機能が調節されるため細胞周期の進行は厳密に制御されている。また、基質との結合に重要であった PLK1 の W414, H538, K540 に相当するアミノ酸残基は PLK2 及び PLK3 でも保存されており、同様の分

子メカニズムで PLK2 及び PLK3 も基質を認識すると考えられている。

これまでに報告された PLK の標的分子の多くは細胞周期進行に関与する蛋白質である。PLK1 を例に挙げると、Cdc25, Myt1/Wee1, Cyclin B1, EMI1 及び Kizuna などの基質分子が同定されている⁴⁹⁻⁵¹。細胞周期の進行においてチェックポイントと呼ばれる正常な細胞分裂を司る監視機構があり、スピンドルチェックポイントや G2/M 期チェックポイントなどが知られている。例を挙げると G2 期から M 期への進行には CDK1/Cyclin B1 の活性化が必要であるが、G2/M 期チェックポイントが解除されるまでは、CDK1 は Myt1/Wee1 と呼ばれるキナーゼによって (T14/Y15 残基を) リン酸化され ATP との結合ができなくなるため不活性化されている。この CDK 不活性化型のリン酸化は脱リン酸化酵素 Cdc25 によって脱リン酸化され、CDK1 の活性が回復することが知られている。PLK1 は Myt1/Wee1 を不活性化し⁵²、Cdc25 を活性化させることで CDK/Cyclin B1 の脱リン酸化を促進させる (Fig. 14)。この結果、活性型 CDK/Cyclin B1 が蓄積し、細胞周期が M 期へと進行する。このように PLK1 は Myt1/Wee1 及び Cdc25 のリン酸化を介して CDK/Cyclin B1 の活性制御を調節することで G2/M 期チェックポイントの一端を担っている。

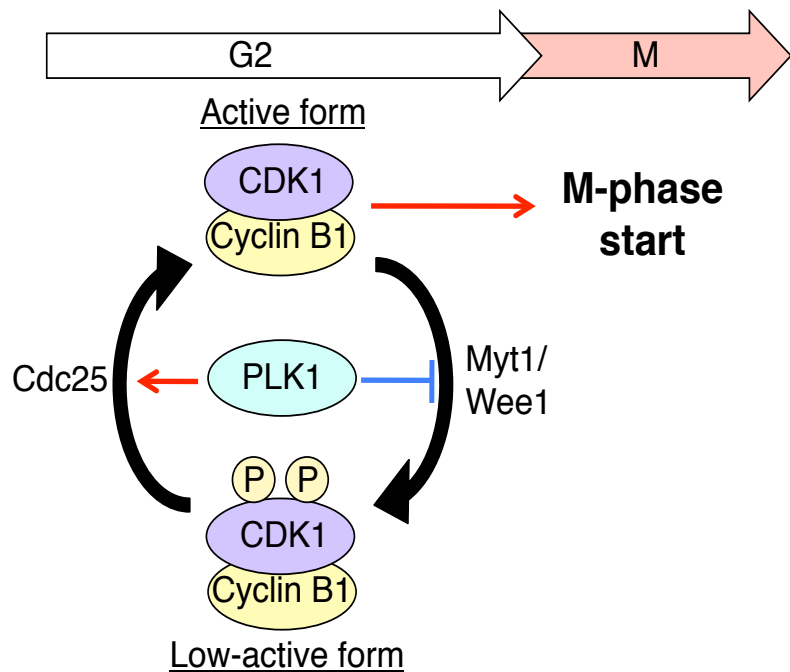


Fig.14 PLK1によるG2/M期チェックポイント

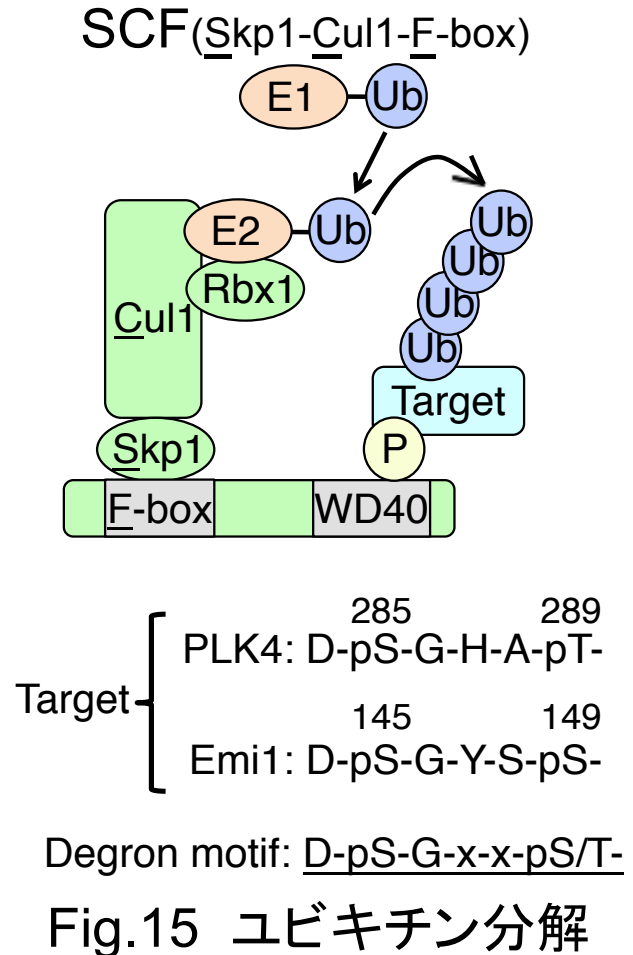
PLK ファミリーの蛋白質発現量は細胞周期の進行と共に増減する。PLK の蛋白質発現量の低下はユビキチン分解によって調節されている。ユビキチン分解には、APC/C (anaphase promoting complex/cyclosome) または SCF (Skp1-Cul1-F-box protein) と呼ばれる 2 つの E3 ユビキチンリガーが存在する。APC/C では標的蛋白質の destruction-box (D-box モチーフ: R-X-X-L (-X-X-X-X-N/D/E)) または KEN 配列をサブユニットである Cdc20/Cdh1 が認識して標的蛋白質と結合することによりユビキチン修飾が行われる。一方、SCF では degron と呼ばれる標的蛋白質内の認識配列 (D-S-G-X-X-S/T) がリン酸化される

と、SCF サブユニットである F-box protein の WD40 領域がリン酸化された degron と結合し、標的蛋白質のユビキチン分解が誘導される (Fig. 15)。

PLK1 には D-box モチーフ (R-X-X-L (-X-X-X-X-N/D/E)) が保存されているため (R337-K-P-L)、ユビキリンリガー APC/C^{Cdh1} が D-box を介して PLK1 と結合し、PLK1 のポリユビキチン修飾とプロテオソームによる分解が促進される⁵³。

PLK4 も PLK1 と同様にユビキチン化されることが知られている。PLK4 分子内には degron 配列が保存されており (D-S285-G-H-A-T289)、この S285 及び T289 残基がリン酸化されると、ユビキチンリガー SCF のサブユニット β -TrCP (ショウジョウバエでは Slimb) が同残基のリン酸化を認識して結合する⁵⁴⁻⁵⁶ (Fig. 15)。SCF ^{β -TrCP} が PLK4 に結合すると PLK4 のユビキチン化が連続して起こる。その結果ポリユビキチン鎖が形成されるためプロテオソームに運ばれ分解される。

PLK2/3 に関してもユビキチン分解によって蛋白質分解が誘導されと考えられている。しかし分解を仲介するユビキチンリガーは同定されていない。



以上の結果を含めて、PLK ファミリーのこれまでに明らかになった知見をまとめた Table1 を以下に示す^{49,57-59}。

Table1 PLKファミリーのまとめ

| | PLK1 | PLK2 | PLK3 | PLK4 |
|-----------|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------------|
| 発現 | G2/M | G1～S DNA damage | G1～S DNA damage | S～G2/M |
| 細胞内局在 | 中心体 動原体 収縮環 | 中心小体 | 核小体 | 中心小体 |
| 発癌 | 発癌促進 | 癌抑制 プロモーター メチル化 | 不明 | 癌抑制 |
| 活性化因子 | AurkA/Bora SLK STK10 | p53 | ATM ATR | 不明 |
| 基質 | Cdc25, p53 Myt1/Wee1 EMI1, Bora Kizuna Chk1 etc | CPAP | Chk2 p53 Cdc25C | Hand1 CEP152 Fbxw5 |
| ユビキチンリガーゼ | APC/C ^{Cdh1} | 不明 | 不明 | SCF ^{Slimb/β-TrCP} |

2-9 PLK4

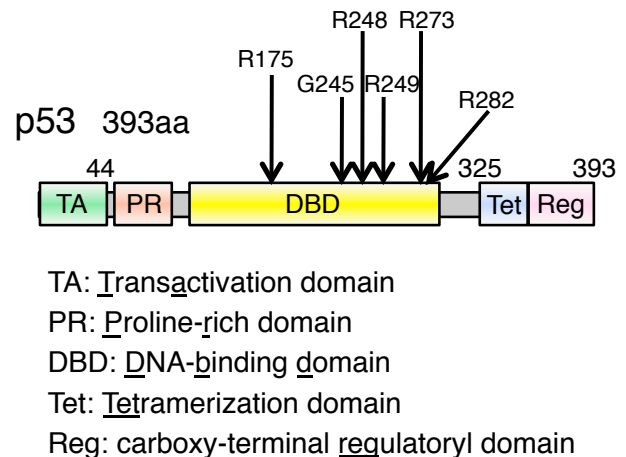
中心体の複製に関与するキナーゼ（リン酸化酵素）として、(CDK2, CDR2, PLK2 などの報告があるが) PLK4 が挙げられる。PLK4 は脊椎動物からショウジョウバエに至る広汎な細胞腫で保存されている。PLK4 は中心小体の基底部（構築基盤）に局在することが電子顕微鏡や細胞染色で観察されており³¹、PLK4 の遺伝子欠損は中心体複製の停止や発生そのものが進行せず胎生致死になることが明らかになっている⁶⁰。また、片親のみの PLK4 遺伝子を欠損させた PLK4^{+/-}細胞では中心体数の異常と染色体の不均衡分配が惹起されることが知られている⁶⁰。更に、ショウジョウバエの胚及び未受精卵内に PLK4 を導入することにより、中心体複製が誘導される。さらに構築基盤（platform）として働く mother centriole が存在しない様な未受精卵内においても PLK4 を導入することにより（新規）中心体複製が誘導されることが明らかになっている⁶¹。このように PLK4 は中心小体をゼロ

から新規複製できることから、中心体複製に関与する最も重要なリン酸化酵素（キナーゼ）であると考えられている。

G1～S 期において、中心体構成蛋白質が構築基盤となる位置に局在し複製が開始される分子メカニズムは不明である。しかし、線虫では少なくとも 5 つの蛋白質（SPD2, ZYG-1, SAS5/6/4）が中心体複製における起点となる構築基盤に局在することが必要であることが明らかになっている⁶²。まず、SPD2 が構築基盤となる位置に局在すると、線虫に特異的なキナーゼ分子 ZYG-1 がこの構築基盤へリクルートされるようになる。これは SPD2 が足場蛋白質として作用するためと考えられている。ZYG-1 の集積により、SAS-5/SAS-6 の構築基盤への局在が促進され、続いて SAS-4 の局在も促進される。SAS-4 は微小管結合領域を持っているため、SAS-4 の集積により微小管も会合が進行し、中心小体が形成されることが考えられる。しかし、ZYG-1 は線虫にのみ保存されたキナーゼ分子であり、哺乳類ではこのキナーゼに当たる分子は存在しない。最近の研究成果から、哺乳類では ZYG-1 の役割を PLK4 が担うと考えられている。その理由として、1) PLK4 が構築基盤に当たる位置に局在することが電子顕微鏡で確認されていること³¹、2) ヒトまたはキイロショウジョウバエの PLK4 (Polo) を欠損させると新たな中心小体が形成されなくなる^{33,63}、3) PLK4^{-/-}マウスは胎生致死に到り PLK4 を部分欠損させた PLK4^{+/-}マウスでは中心体数の異常と癌化を誘導することなどが挙げられる⁶⁰。

2-10 癌細胞における p53 の不活性化

p53 は DNA 損傷などのストレス刺激に応答し、4 量体を形成することにより活性化する。活性化した p53 は標的遺伝子の発現を調節することにより増殖／細胞周期停止、DNA 修復及びアポトーシスなどの細胞応答を制御する。この p53 に癌細胞の約半数で遺伝子変異が生じていることが知られている^{64,65}。遺伝子変異の 74%が missense 型の変異であり、大きく 2 つに分類することができる (Fig. 16)。1 つ目が



p53 hotspot mutations

① DNA-contact mutations

- R248Q
- R273H

② Conformational(denatured) mutations

- R175H • R282W
- G245S • R249S

Fig.16 癌化に寄与するp53の変異

DNA との結合が損なわれる変異体であり、R248Q や R273H などの変異が頻繁に観察される。2 つ目が 3 次元構造の変化を伴い蛋白質が変性する変異体であり、R175H, R282W, G245S, R249S などの変異が頻繁に報告されている。このような p53 の変異の大半が DNA への結合能が失われる。通常 p53 の変異は片方のアレルのみに見られることが多いが、p53 は 4 量体形成することにより機能するため変異型 p53 が野生型 p53 に対してドミナントネガティブに作用し（細胞全体として）p53 の DNA 結合能が損なわれてしまう。この結果、細胞はストレス刺激時に適切な増殖／細胞周期停止、DNA 修復及びアポトーシスなどの p53 依存的な細胞応答を示せなくなるため、細胞の癌化が進行すると考えられる。

2-11 p53 による PLK ファミリー転写制御に関して

PLK ファミリーは転写制御を受けることが知られている（Fig. 17）。forkhead transcription factors (FKH-TFs) は PLK1 の転写を促進し、蛋白質として発現した PLK1, Cdc5, Plo1 は逆に FKH-TFs の関与する転写を促進する。PLK1 と FKH-TFs は発現量を相互に補完し合っていると考えられる。

PLK1 の発現は、cell-cycle dependent element / cell cycle gene homology region (CDE/CHR) と呼ばれる領域（配列）によって抑制されている。また、p53, p21, RB などでも PLK1 の発現は抑制されることが知られているが、これらも CDE/CHR を介して発現を負に制御していると考えられている⁵⁹。

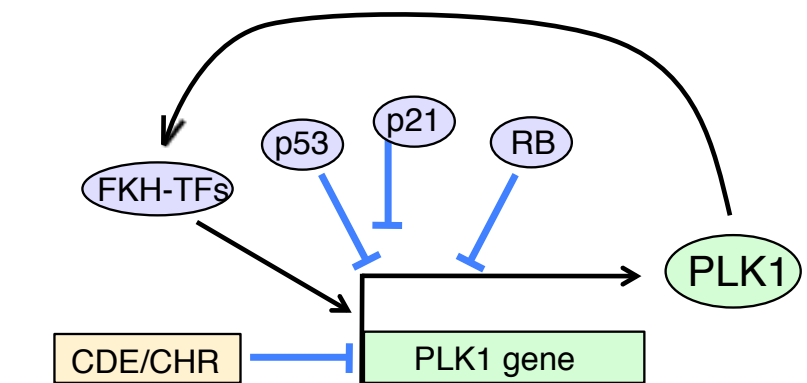


Fig.17 PLK1の発現制御

2-12 p53 によるアポトーシス制御に関して

細胞に DNA 損傷などのダメージが生じた場合、上記した様に p53 は PLK1 などの転写を抑制することで一時的に細胞周期を停止させ、細胞はこの間に細胞修復を行う。しかし、

細胞ダメージの程度が修復不能であった場合には細胞死（アポトーシス）が誘導され、その細胞は排除される。p53はこのアポトーシスの制御にも関与することが知られている (Fig. 18)。

アポトーシスの進行にエフェクターカスパーゼ Caspase-3 の切断を伴う活性化が必要である。Caspase-3 の活性化は主に2つのイニシエーターカスパーゼ Caspase-8 及び Caspase-9 により制御されている。Caspase-8 はデスレセプターである Fas, TNF α R の下流で活性化される。

Fas, TNF α R にリガンド FasL, TNF α が結合すると FADD を介して Caspase-8 がレセプター上に移行する。レセプター上の Caspase-8 は多量体形成をすることで自己分解が促進され Caspase-8 が活性化される。活性型 Caspase-8 は直接 Caspase-3 を切断し活性化させる。

Caspase-9 の活性化には Apaf-1 及びシトクローム C (Cyto C) と複合体 (アパプソーム) を形成することが必要である。Cyto C はミトコンドリアか

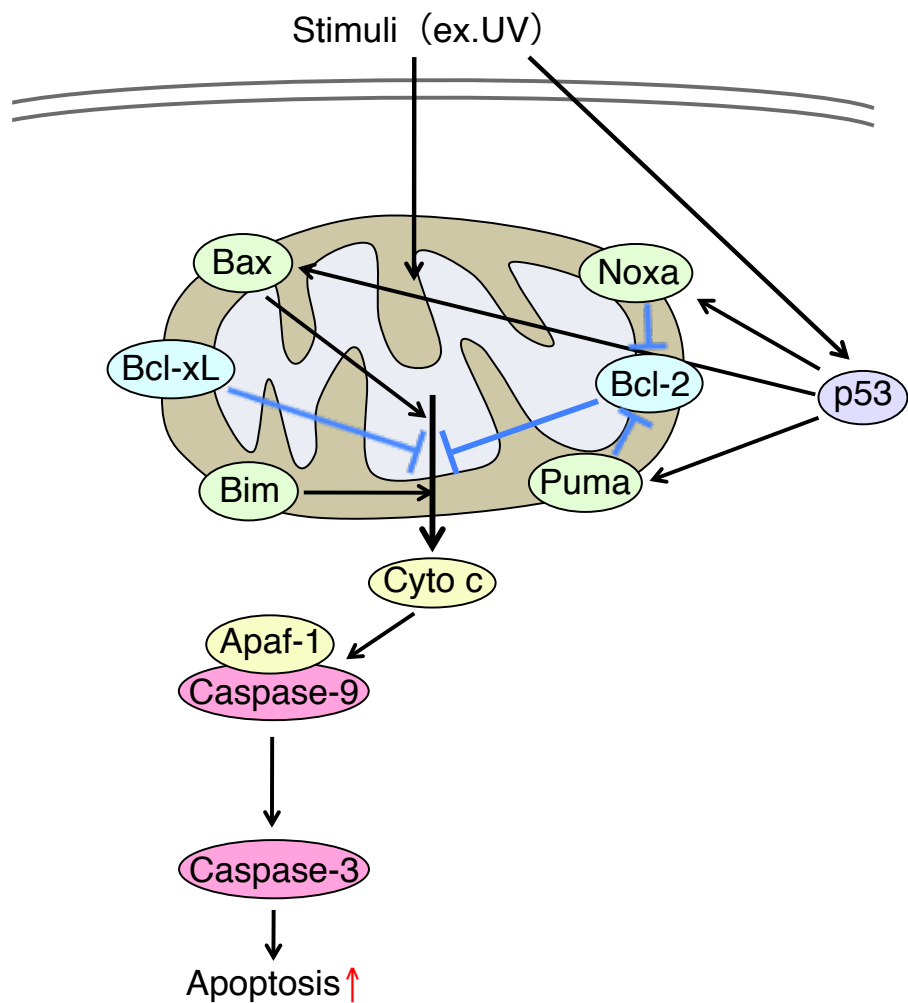


Fig.18 p53によるアポトーシス制御

ら放出されることが知られており、この放出量の制御に Bcl-2 ファミリーが関与している。Bcl-2 ファミリーには Cyto C の放出を促進させる Bax, Bim, Bid, Bad などのアポトーシス促進因子と、逆に放出を抑制する Bcl-2, Bcl-xL などのアポトーシス抑制因子が存在する。このアポトーシス促進因子 (Bax, Bim, Bid, Bad) とアポトーシス抑制因子 (Bcl-2, Bcl-xL) がミトコンドリア膜上で拮抗し合うことで Cyto C の細胞質への放出量が調節されている。

ミトコンドリアから放出された Cyto C は Caspase-9 及び Apaf-1 とのアパプソームと呼ばれる複合体を形成する。この結果、Caspase-9 は自己切断することにより活性化され、エフェクターカスパーゼである Caspase-3 を切断（活性化）する。

p53 は UV 刺激や DNA 損傷などにより活性化され、活性化された p53 は Noxa, Puma 及び Bax の転写を促進させる (Fig. 0-19)。Noxa 及び Puma は Bcl-2 を阻害することにより間接的に Cyto C の放出量を増加させる。Bax は Cyto C の放出を直接促進させる。このように p53 は Noxa, Puma 及び Bax を介して Cyto C の放出量を増加させることによりアポトーシスの進行を制御している。

3-Results

3-結果

3-1 ストレス応答 MAP3K (MTK1, TAK1) は PLK4 と結合する (Fig. 19&20)。

これまでに MTK1 の機能解析を研究する過程で、MTK1 が PLK4 と細胞内で相互作用することを示唆する知見が得られた。そこで、まず MTK1 が PLK4 と結合するか共沈実験で検証した。Flag-PLK4、Myc-MTK1 及び Myc-GADD45 β を 293FT 細胞に一過的に発現させ、40 時間後に細胞を可溶化した。この可溶化液を Myc 抗体で免疫沈降し、Flag 抗体で western blot を行った。その結果、MTK1 と PLK4 の結合は GADD45 β が存在する時だけ観察された (Fig. 19b & d)。このことから、GADD45 β によって MTK1 が活性化された場合に初めて MTK1 は PLK4 と結合できると考えられる。

一般的に MTK1 は GADD45 非存在下では、キナーゼドメインが auto-inhibitory domain (AID) と呼ばれる領域に覆われ不活性化状態になっている²⁴。GADD45 の発現が誘導されると、GADD45 は MTK1 分子内の GADD45-binding domain (GB) に結合する。この結合により、キナーゼドメインを覆っていた AID が外れるため、MTK1 の (トランス) 自己リン酸化が促進され活性化状態となる。Fig. 19b において、GADD45 β 発現下において、MTK1 と PLK4 の結合が観察されたことから、MTK1 はキナーゼドメインを介して PLK4 と結合する可能性が考えられた。そこで MTK1 の N 末端側 (MTK1-N) 及びキナーゼドメインを含む C 末端側 (MTK1-C) の欠損変異体を作製した。この Myc-MTK1-N または Myc-MTK1-C を Flag-PLK4 と共に 293FT 細胞に一過的に発現させ、上述と同様に共沈実験を行った。その結果、MTK1-C を発現させた場合のみ PLK4 との結合が観察された (Fig. 19b)。このことから、MTK1 は C 末端側に存在するキナーゼドメインを介して PLK4 と結合すると考えられる。

PLK4 と結合する MTK1 の C 末端領域 (キナーゼドメイン) は MAPKK (DVD サイト) との結合領域も兼ねている。このため、MKK4 をドミナントネガティブに発現させた場合に MTK1 と PLK4 との結合が阻害されるか検証する実験を行った。Flag-MTK1-C、Myc-PLK4 及び HA-MKK4 を 293FT 細胞に遺伝子導入した。40 時間後にこの細胞を回収し Flag 抗体で免疫沈降し、Myc 抗体で western blot を行った。その結果、HA-MKK4 の蛋白質量を増加させても MTK1 と PLK4 の結合は阻害されなかった (Fig. 19d)。以上から、MAPKK は MAP3K と PLK4 との相互作用に直接関与しないと考えられる。

次に、ストレス応答 MAP3K の一つである TAK1 についても Fig.19b と同様の共沈実験を行ってみた。その結果、TAK1 も活性制御因子である TAB1 と共に発現させた場合に、

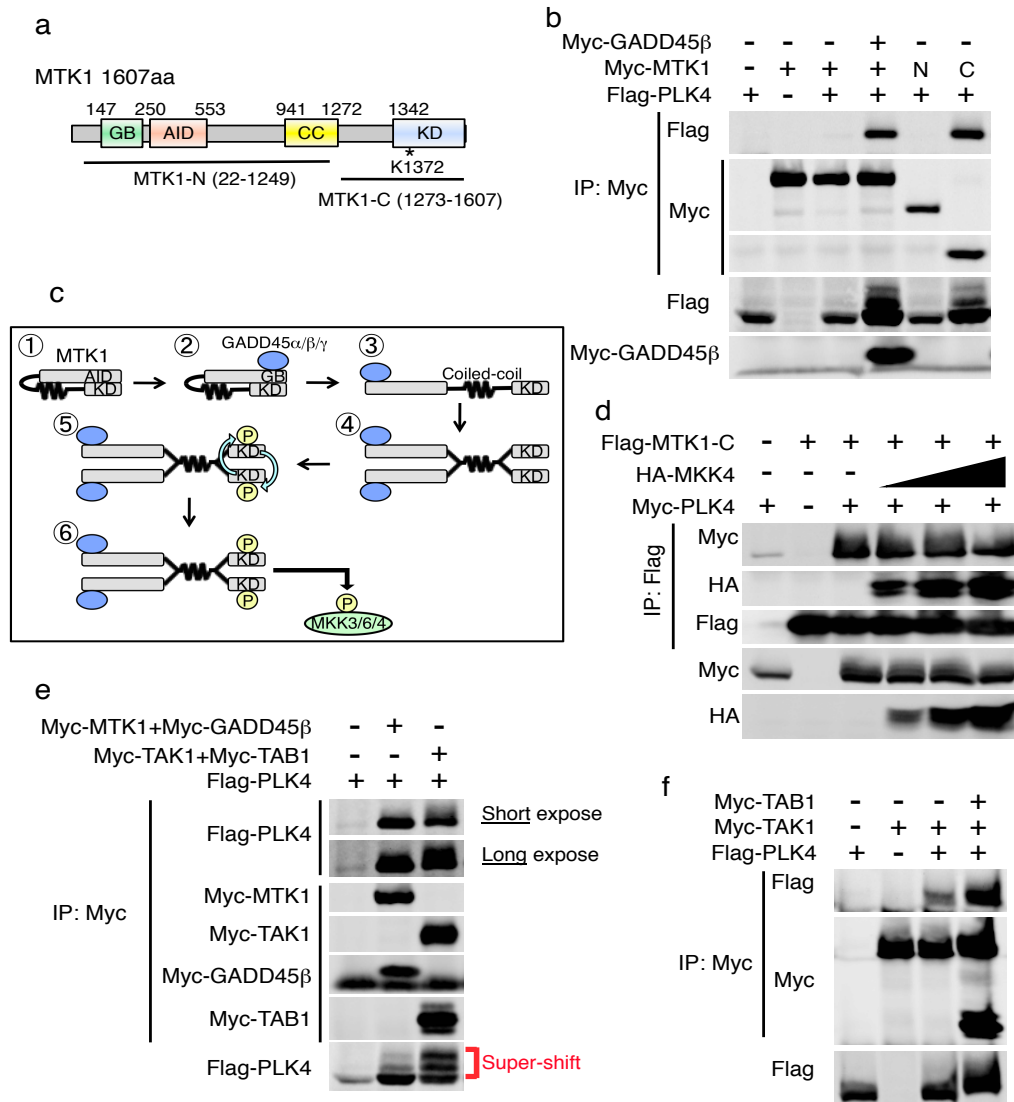


Fig. 19 PLK4はMAP3K (MTK1, TAK1) と結合する。

- a) MTK1の1次構造図。GB; GADD45 binding domain, AID; Auto-inhibitory domain, CC; Coiled-coil (dimerizing) domain, KD; Kinase domain. MTK1の欠損型変異体として22-1249aa (MTK1-Nと命名) 及び1273-1607aa (MTK1-Cと命名) を作製した。
- b) MTK1はGADD45による活性化依存的にPLK4とキナーゼドメインを介して結合する。Myc-GADD45β, Myc-MTK1及びFlag-PLK4をHEK293FT細胞に共発現させ、Myc抗体で免疫沈降後、Flag抗体でWestern blotを行った。
- c) GADD45α/β/γによるMTK1の活性化様式図
- d) MTK1とPLK4の結合はMKK4によって阻害されない。HEK293FT細胞にFlag-MTK1-C、Myc-PLK4及びHA-MKK4を遺伝子導入し、40時間後に細胞を回収した。Flag抗体で免疫沈降し、Myc抗体でWestern blotした。
- e) TAK1もMTK1同様にPLK4と結合する。Myc-GADD45β, Myc-MTK1またはMyc-TAB1, Myc-TAK1及びFlag-PLK4をHEK293FT細胞に共発現させ、Myc抗体で免疫沈降後、Flag抗体でWestern blotを行った。
- f) TAK1はTAB1共発現によりPLK4と強く結合する。Myc-TAB1, Myc-TAK1及びFlag-PLK4をHEK293FT細胞に共発現させ、Myc抗体で免疫沈降後、Flag抗体でWestern blotを行った。

PLK4 との強い結合が観察された (Fig. 19e & f)。

次に MAP3K と PLK4 の結合が内在性の MAP3K 及び PLK4 でも観察されるか共沈実験により検証した。PLK4 は細胞周期に依存して発現が制御されており G2/M 期に発現量がピークに達する (Fig. 20a)。このため、HeLa 細胞をチミジン／ノコダゾール処理すること

3-結果

により G2/M 期に同調した。続いてこの HeLa 細胞に Sorbitol 刺激を加えることにより TAK1 を活性化させた⁶⁶後、この細胞を用いて可溶化液を作製した。次に可溶化液に PLK4 抗体を添加して免疫沈降した後、TAK1 抗体で western blot を行った。その結果、PLK4 を免疫沈降させた場合に PLK4 と結合した TAK1 のバンドが検出された (Fig. 20b)。以上から TAK1 と PLK4 が内在性蛋白質レベルで結合することを確認した。

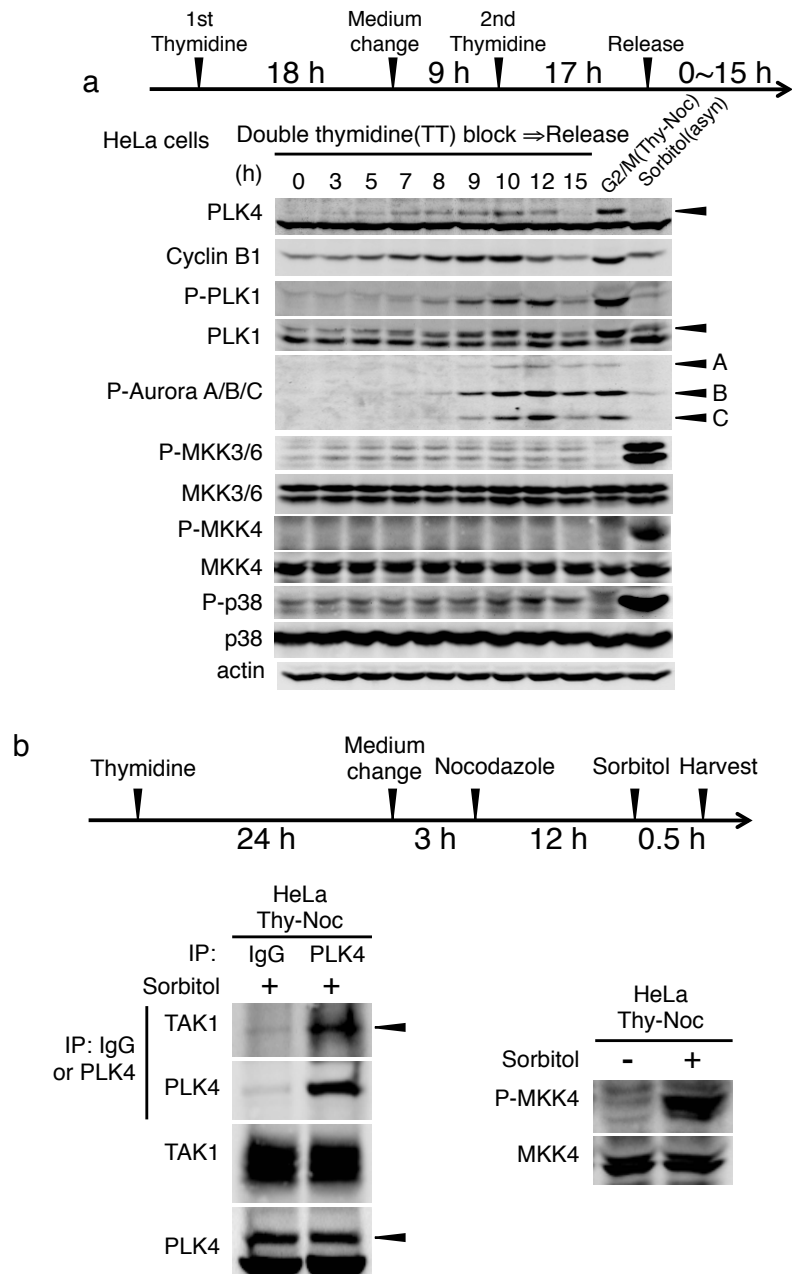


Fig. 20 内在性のPLK4とTAK1は結合する。

- a) HeLa細胞をチミジン処理 (18時間、37°C) し、細胞を無血清培地で洗浄後、9時間血清培地で培養した。再びチミジン処理 (17時間、37°C) した後、細胞を無血清培地で洗浄し、同調した細胞を経時的にサンプル回収した。これをPLK4抗体でWestern blotを行った。また、Cyclin B1抗体、PLK1抗体、リン酸化AurK抗体などでも同様の実験を行った。
- b) 内在性のTAK1及びPLK4は細胞内で結合する。チミジン、ノコダゾールの順に処理してG2/M期に同調したHeLa細胞を回収し、PLK4抗体で免疫沈降後、TAK1抗体でWestern blotを行った。

3-2 PLK4 分子内の MTK1 結合領域の特定 (Fig. 21)

次に PLK4 分子内の MTK1 結合領域の特定を試みた。そこで、Myc-PLK4 の系統的な欠損変異体を作製し、Flag-MTK1-C と共に HEK293FT 細胞に一過的に発現させた。40 時間後、これらの細胞から作製した可溶化液を Flag 抗体で免疫沈降し、Myc 抗体でウェスタンブロットを行った。その結果、PLK4 は 261-491 及び 762-970a.a. の 2 カ所の領域を介して MTK1 と結合することを見出した (Fig. 21)。

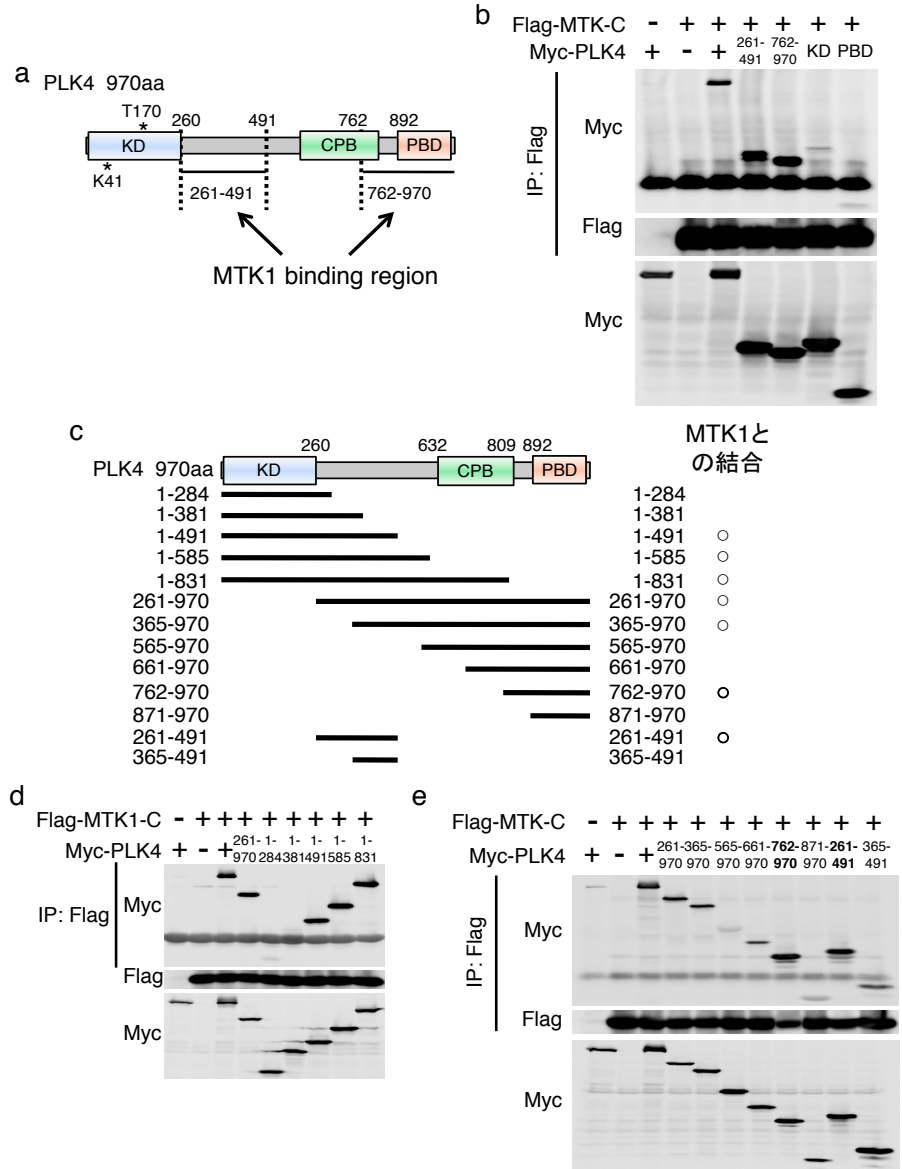


Fig. 21 PLK4は2つの領域を介してMAP3K (MTK1, TAK1) と結合する。
a) PLK4の1次構造図。KD; Kinase domain, CPB; Cryptic Polo-box domain, PBD; Polo-box domain
b) PLK4は2つの領域 (261-491及び762-970) を介してMTK1と結合する。Flag-MTK1及びMyc-PLK4をHEK293FT細胞に共発現させFlag抗体で免疫沈降後、Myc抗体でWestern blotを行った。
c) PLK4の欠損変異体とMTK1との結合領域の模式図
d) Flag-MTK1-C (1273-1607) 及び欠損変異型Myc-PLK4をHEK293FT細胞に共発現させ、Flag抗体で免疫沈降後、Myc抗体でWestern blotを行った。
e) d)と同様にFlag-MTK1-C (1273-1607) 及び欠損変異型Myc-PLK4をHEK293FT細胞に共発現させ、Flag抗体で免疫沈降後、Myc抗体でWestern blotを行った。

3-3 MAP3K と PLK4 の結合は細胞質で起こる (Fig. 22-24)。

これまでの知見では、PLK4 は中心体 (中心小体) 及び細胞質に局在することが報告されている^{31,33}。そこで次に MAP3K 及び PLK4 両分子の結合が中心体または細胞質で起こるのか検証を行った。

この目的のため、Proximity ligation assay (PLA) を利用して MAP3K と PLK4 の結合を可視化した⁶⁷。PLA とは、抗原抗体反応と oligonucleotide 伸長反応を組み合わせた手法

3-結果

である。

実験手順としては、まず GADD45 β , Myc-MTK1, Flag-PLK4（及び中心体マーカーとして GFP-CETN2）を HeLa 細胞に遺伝子導入した。36 時間後に細胞を氷冷メタノールで固定し、一次抗体として Myc 抗体（rabbit）及び Flag 抗体（mouse）を加えて抗原抗体反応を誘導した。次に（PLA プローブと呼ばれる）オリゴヌクレオチドを付加させた 2 次抗体

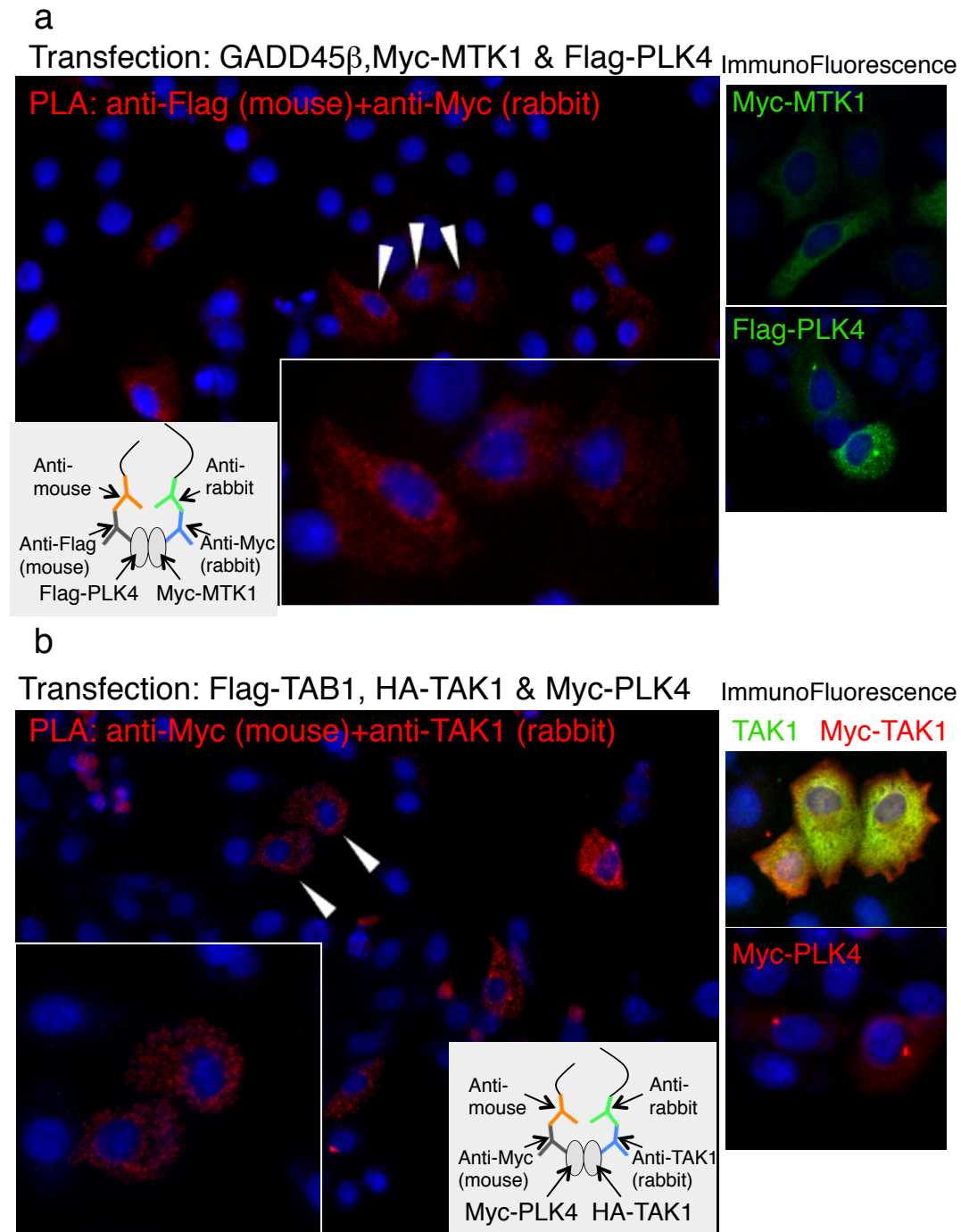


Fig. 22 MAP3K及びPLK4の結合は細胞質で起こる。

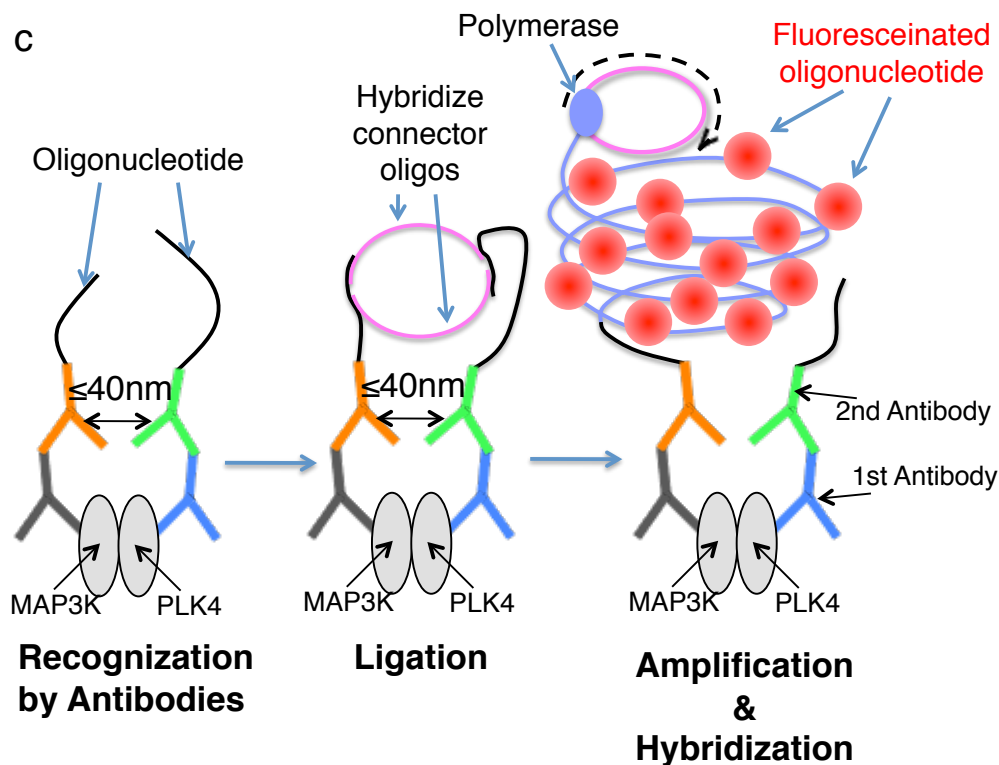


Fig. 22 MAP3K及びPLK4の結合は細胞質で起こる。

- a) MTK1及びPLK4の結合は細胞質で起こる。HeLa細胞にGADD45 β , Myc-MTK1及びFlag-PLK4を遺伝子導入した。36時間後に、細胞を氷冷MeOHで固定し、一次抗体としてMyc抗体 (rabbit) 及びFlag抗体 (mouse) を用いてProximity ligation assay (PLA)を行った。今回、PLA probe (2次抗体) としてrabbit抗体 (Plus) 及びmouse抗体 (Minus) を用いた。また、PLA signalは、蛍光標識オリゴヌクレオチド (赤) をPLA probe (2次抗体) 内のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせることにより可視化した。また、Myc-MTK1またはFlag-PLK4をそれぞれHeLa細胞に遺伝子導入し、Myc抗体 (rabbit) またはFlag抗体 (mouse) を用いて免疫染色を行った。
- b) TAK1及びPLK4の結合は細胞質で起こる。HeLa細胞にFlag-TAK1, HA-TAK1及びMyc-PLK4を遺伝子導入した。36時間後に、細胞を氷冷MeOHで固定し、一次抗体としてTAK1抗体 (rabbit) 及びMyc抗体 (mouse) を用いてa)と同様にProximity ligation assay (PLA)を行った。また、Myc-TAK1またはMyc-PLK4をそれぞれHeLa細胞に遺伝子導入し、TAK1抗体 (rabbit) またはMyc抗体 (mouse) を用いて免疫染色を行った。
- c) PLAの原理。PLA probe (2次抗体) の距離がおおよそ40 nm以下になるとPLA probeの末端にあるオリゴヌクレオチドを介して2本のHybridize connectorオリゴが環状鎖を形成する。この環状鎖にポリメラーゼが結合して伸長反応が誘導される。伸長されたオリゴヌクレオチド鎖に赤の蛍光標識したオリゴヌクレオチドをハイブリダイズすることで一連の反応が可視化される。

(anti-mouse 及び anti-rabbit) を加えてそれぞれの一次抗体を認識させた。2次抗体間の距離が 40 nm 以下になると、オリゴヌクレオチドの ligation 反応が起こり環状鎖のオリゴヌクレオチド (核酸) が形成される。さらにポリメラーゼ添加させることにより、環状鎖核酸に沿って一本鎖の核酸が伸長される。この伸長された一本鎖内にはリピート配列が含まれているため、蛍光標識ヌクレオチドを加えることによりリピート配列とハイブリダイゼーションが起こり、PLA シグナルとして 2 分子間の結合が可視化(赤色)される (Fig. 22c)。

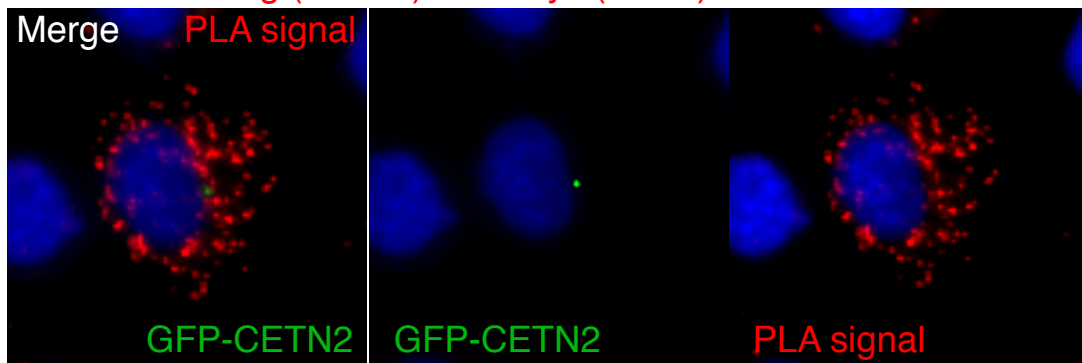
この PLA を用いて実験したところ、MTK1 と PLK4 の結合は細胞質全体で観察された。しかし、GFP-CETN2 によって可視化した中心体上では両分子の結合は観察されなかった

3-結果

(Fig. 22a & 23a)。また、Flag-TAB1, HA-TAK1, Myc-PLK4 及び GFP-CETN2 を HeLa 細胞に遺伝子導入して、TAK1 抗体 (rabbit) 及び Myc 抗体 (mouse) を一次抗体として PLA を行った。その結果、MTK1 と同様に、TAK1 と PLK4 の結合は中心体上ではなく、細胞質で起こることを確認した (Fig. 22b & 23b)。

a

Transfection: GADD45 β ,Myc-MTK1, Flag-PLK4 & GFP-CETN2
PLA: anti-Flag (mouse)+anti-Myc (rabbit)



b

Transfection: Flag-TAB1, HA-TAK1, Myc-PLK4 & GFP-CETN2
PLA: anti-Myc (mouse)+anti-TAK1 (rabbit)

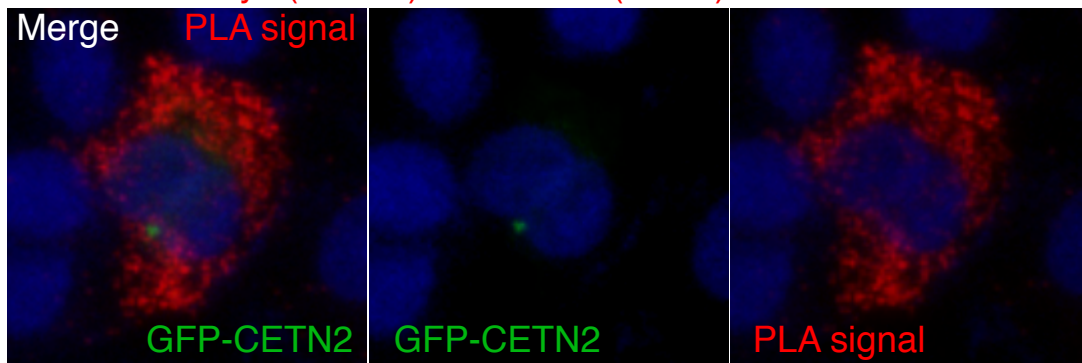


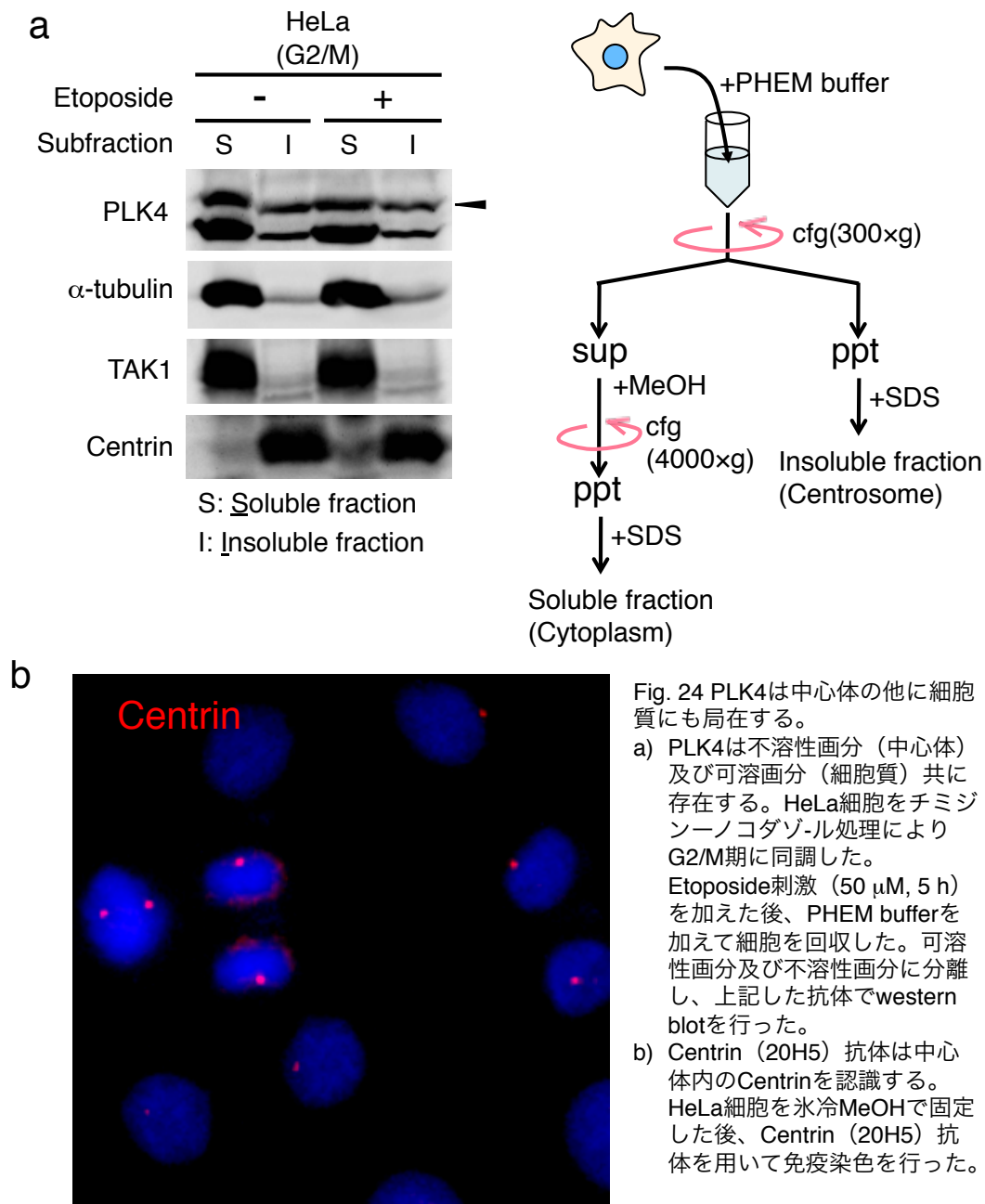
Fig. 23 ストレス応答MAP3KとPLK4の結合は中心体ではなく細胞質で起こる。

- a) MTK1及びPLK4の結合は細胞質で起こる。HeLa細胞にGADD45 β , Myc-MTK1,Flag-PLK4及びGFP-CETN2を遺伝子導入した。36時間後に、細胞を氷冷MeOHで固定し、一次抗体としてMyc抗体 (rabbit) 及びFlag抗体 (mouse) を用いてProximity ligation assay (PLA) を行った。GFP-CETN2は中心体マーカーとして用いた。
- b) TAK1及びPLK4の結合は細胞質で起こる。HeLa細胞にFlag-TAB1, HA-TAK1,Myc-PLK4及びGFP-CETN2を遺伝子導入した。36時間後に、細胞を氷冷MeOHで固定し、一次抗体としてTAK1抗体 (rabbit) 及びMyc抗体 (mouse) を用いてa)と同様にProximity ligation assay (PLA) を行った。

PLK は細胞質と中心体をシャトルすることが報告されている⁶⁸。しかしながら PLK4 は蛋白質発現量が比較的少なく、また中心体、収縮環などに集積するため^{31,33,69}、内在性の

3-結果

PLK4 の細胞内局在を蛍光免疫染色で評価することは困難である。このため、PLK4 が細胞質にどの程度存在するか細胞画分実験により検証した。内在性の PLK4 は G2/M 期に発現量がピークに達するため、まず HeLa 細胞をチミジン・ノコダゾール処理により G2/M 期に同調した。この細胞を PHEM buffer により可溶化し、氷上に 10 分置いた後、低速遠心により可溶性画分 (soluble) と不溶性画分 (insoluble) を分離した⁷⁰⁾。また、G2/M 期に同調後、エトポシド処理した HeLa 細胞も同様の手順で可溶性画分及び不溶性画分に分離した。この時、中心体や細胞膜などは不溶性画分に、また細胞質の蛋白質は可溶性画分にそれぞれ含まれることが知られている。その結果、中心体構成蛋白質である Centrin (CETN)



は不溶性画分にのみ見られたのに対して、PLK4 は中心体を含む不溶性画分に加えて細胞質を含む可溶性画分でも観察された (Fig. 24a)。これに対して、TAK1 は細胞質を含む可溶性画分でのみ観察された。以上から PLK4 は中心体以外に細胞質でも一定量存在することが明らかになった。更に、TAK1 が細胞質でのみ観察されたことと上記した PLA の結果 (Fig. 22 & 23) を考慮すると、PLK4 と MAP3K は細胞質で相互作用すると考えられる。

3-4 ストレス応答 MAP3K は PLK4 のキナーゼ活性を亢進させる (Fig. 25-27)。

活性型の MAP3K が PLK4 と結合することから、次に MAP3K が PLK4 を直接リン酸化する可能性を検証した。そこで、まず PLK4 及び活性型 MAP3K を 293FT 細胞に共発現させたところ、PLK4 を単独発現させた場合と比べて、PLK4 のバンドがスーパーシフトすることを見出した (Fig. 25a)。また、他の MAP3K である MEKK1, TAK1, MLK3 でも同様に PLK4 のバンドシフトが観察された。しかし、ASK1 及び CRaf では顕著なバンドシフトは観察されなかった (Fig. 25a)。

次に PLK4 のバンドシフトが MTK1 によるリン酸化によって生じるのかホスファターゼアッセイを行って検証した。そこで Flag-MTK1-C 及び Myc-PLK4 を 293FT 細胞に発現させ細胞を回収し、Myc 抗体で免疫沈降することで、Myc-PLK4 のみを単離した。これにアルカリホスファターゼを添加し、脱リン酸化反応を誘導した (30℃, 30 分)。この結果、PLK4 のバンドシフトが消失した (Fig. 25b)。また、アルカリホスファターゼ及びホスファターゼ阻害剤を同時に添加した場合には、バンドシフトの消失は起こらなかった。以上から、MTK1 を共発現させると PLK4 はリン酸化修飾を受けることが明らかになった。

次に、この MTK1 依存的に PLK4 がリン酸化されることにより、PLK4 のキナーゼ活性が亢進するか *in vitro* キナーゼアッセイを行って検証した。Flag-MTK1-C 及び Myc-PLK4 を一過的に発現させた 293FT 細胞から可溶化液を作製し、Myc 抗体による免疫沈降により Myc-PLK4 を単離した。ここに人工基質 α -casein 及び γ - ^{32}P -ATP を添加してリン酸化反応を行い (30℃, 30 分)、 ^{32}P の取り込みをオートラジオグラフィーにより検出した。その結果、MTK1 を共発現させた場合に PLK4 のキナーゼ活性 (自己リン酸化及び基質リン酸化) が亢進した (Fig. 7c)。更に詳細な解析を行うため、PLK4 及び MTK1 の点変異体を作製し、同様の実験を行った。その結果、PLK4 のスーパーシフトが起こるためには、1) MTK1 のキナーゼ活性が必須であること、2) PLK4 分子のリン酸化 (T170 を含む) が必須であること、3) PLK4 のキナーゼ活性が必要であることが明らかになった (Fig. 25c)。以上をまとめると、MTK1 は PLK4 をリン酸化することで PLK4 を活性化し、PLK4 の自己リン酸化

3-結果

も起こってバンドシフトが観察されたのだと考えられる。

PLK4 の活性化にはキナーゼドメイン T-loop 内の T170 のリン酸化が必須であることが知られている。そこで PLK4 分子の T170 残基が MTK1 によって直接リン酸化されるか *in*

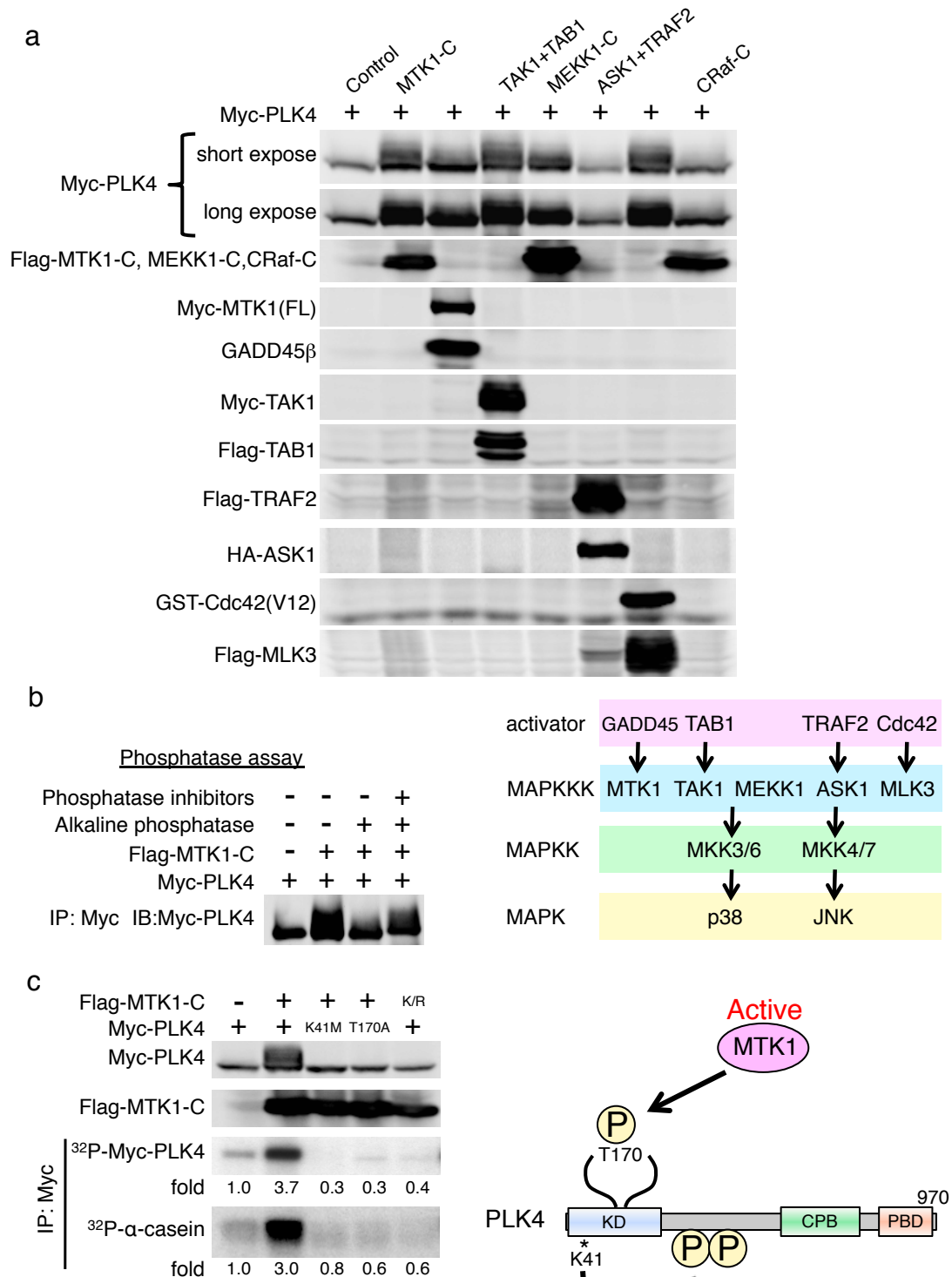


Fig. 25

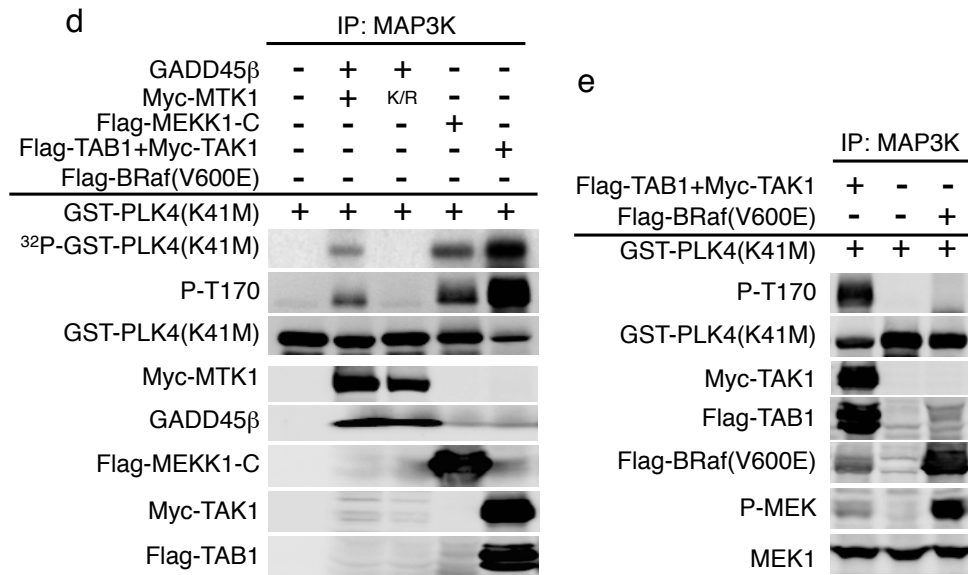


Fig. 25 様々なストレス応答MAP3K (MTK1, TAK1, MEKK1など) によって活性化され、自己リン酸化活性が亢進する。

- ストレス応答MAP3KによってPLK4のバンドシフトが誘導される。MTK1及びその活性化因子GADD45βをMyc-PLK4と共に発現させ、Myc抗体を用いてWestern blotを行いPLK4がバンドシフトするか検証した。またTAK1 (+TAB1)、MEKK1、ASK1 (+TRAF2)、MLK3 (+Cdc42V12)、C-Rafについても同様の実験を行った。
- MTK1依存的なPLK4のバンドシフトはリン酸化修飾によるものである。Flag-MTK1-C (1273-1607) 及びMyc-PLK4をHEK293FT細胞に共発現させた。Myc抗体で免疫沈降後、アルカリホスファターゼまたはホスファターゼ阻害剤を加えて30°C、30分間脱リン酸化反応を誘導し、Myc抗体でWestern blotを行った。
- MTK1依存的にPLK4の自己リン酸化活性が誘導される。Flag-MTK1-C (1273-1607) 及びMyc-PLK4をHEK293FT細胞に共発現させ、Myc抗体で免疫沈降後、α-casein及びγ-³²P-ATPを加えて*in vitro*キナーゼアッセイを行った。³²Pの取り込みをオートラジオグラフィーによって検出した。
- ストレス応答MAP3KはPLK4のT170残基を直接リン酸化する。Myc-MTK1及びGADD45βをHEK293FT細胞に共発現させ、Myc抗体を用いて免疫沈降した。ここに大腸菌精製蛋白質GST-PLK4 (K41M) 及びγ-³²P-ATPを加えて*in vitro*キナーゼアッセイを行い、³²Pの取り込みをオートラジオグラフィーによって検出した。また、γ-³²P-ATPの代わりにATPを加えてリン酸化反応を誘導し、PLK4のT170残基に対するリン酸化特異抗体を用いてWestern blotを行った。またTAK1についても同様の実験を行った。
- B-RafではPLK4のT170残基をリン酸化することができない。恒常的活性型変異体Flag-B-Raf (V600E) をHEK293FT細胞に共発現させ、Flag抗体を用いて免疫沈降した。ここに大腸菌精製蛋白質GST-PLK4 (K41M) 及びATPを加えて*in vitro*キナーゼアッセイを行い、PLK4のT170残基に対するリン酸化特異抗体を用いたWestern blotによりリン酸化されるか検証した。

in vitro キナーゼアッセイによって検証した。Myc-MTK1 及び GADD45β を 293FT 細胞に一過的に発現させ、細胞を回収後 Myc 抗体により Myc-MTK1 を免疫沈降した。この Myc-MTK1 に精製蛋白質 GST-PLK4(K41M)及びγ-³²P-ATP を加えてリン酸化反応を行い、オートラジオグラフィーにより ³²P の取り込みを観察した。その結果、MTK1 によって PLK4 (K41M) がリン酸化されたが、不活性化型変異体 MTK1(K/R)ではこうしたリン酸化は観察されなかった (Fig. 25d)。また、リン酸化された T170 残基を認識する特異抗体を新たに樹立し (Fig. 26a)、同抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところオートラジオグラフィーの結果と相関して MTK1 による T170 残基のリン酸化が観察された (Fig.

25d & 26b)。また、MEKK1 及び TAK1 でも同様に PLK4 分子内の T170 残基へのリン酸化が見られた。一方、恒常的活性化型変異体 B Raf(V600E) でも同様の実験を行ったが、T170 残基へのリン酸化は見られなかった (Fig. 25e)。

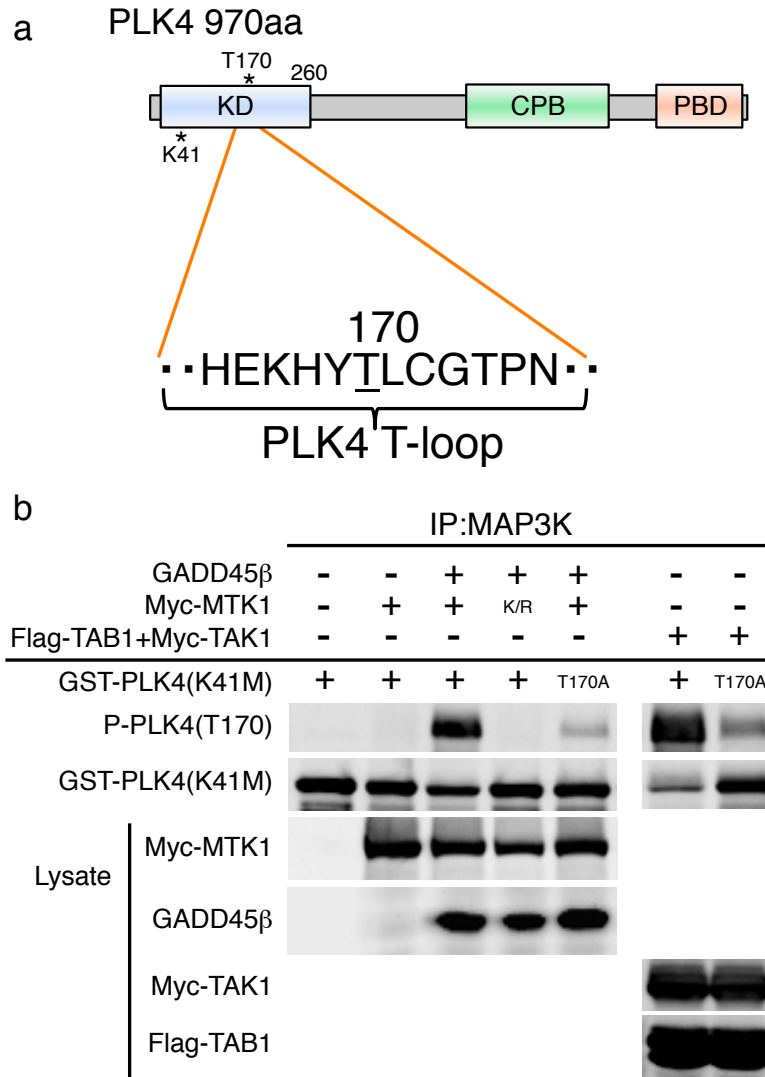


Fig. 26 リン酸化PLK4特異抗体の樹立と*in vitro*キナーゼアッセイ

- a) Thr170に対するリン酸化特異抗体の樹立。リン酸化Thr170を含む領域の合成ペプチドを作製し、ウサギの体内に注入してリン酸化特異抗体を作製した。
- b) Myc-MTK1及びGADD45 β をHEK293FT細胞に共発現させ、Myc抗体でMyc-MTK1を免疫沈降した。ここに大腸菌から作製した精製蛋白質GST-PLK4 (K41M) 及びATPを加えて30°C、30分リン酸化反応を誘導し、リン酸化特異抗体でWestern blotを行った。また、TAK1でも同様の実験を行った。

PLK4 は、PLK ファミリー蛋白質の一つであり他に PLK1, 2, 3 が存在する。そこで、ストレス応答 MAP3K によって PLK4 のキナーゼ活性が亢進した現象が PLK1, 2, 3 に関しても見られるか検証を行った。Myc-PLK1 及び恒常的活性化型変異体 Flag-MTK1-C を 293FT 細胞に一過的に発現させ、可溶化液を作製した。Myc 抗体で Myc-PLK1 を免疫沈降し、

3-結果

α -casein と γ - ^{32}P -ATP を添加して *in vitro* キナーゼアッセイを行った (30°C, 30 分)。その結果、PLK4 で見られた MTK1 依存的なキナーゼ活性の亢進は PLK1 では観察されなかった (Fig. 27)。また、PLK2,3 でも同様の実験を行ったが、PLK1 と同様に MTK1 の発現による顕著な差は見られなかった (data not shown)。以上の結果から、PLK1,2,3 では活性制御にストレス応答 MAP3K が関与しないことが確認され、ストレス応答 MAP3K によるキナーゼ活性の亢進は PLK4 でのみ見られる現象であることが明らかとなった。

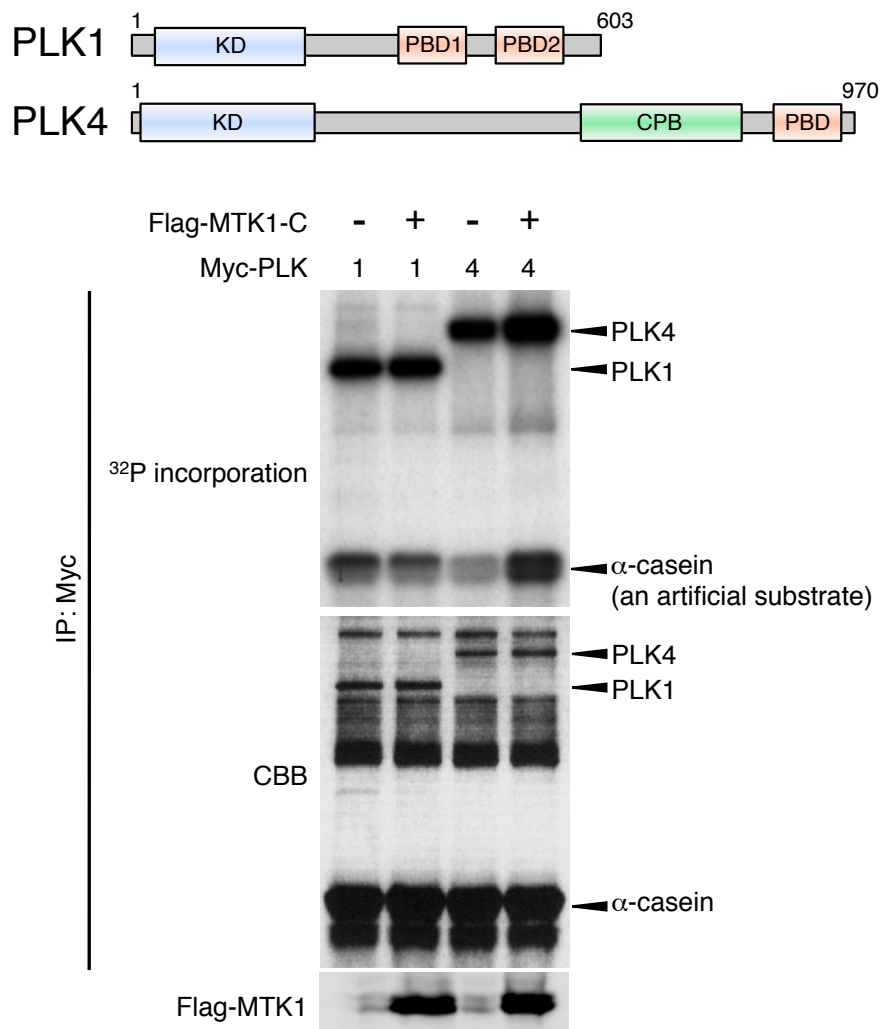


Fig. 27 ストレス応答MAP3K (MTK1) によってPLK1は活性化されないが、PLK4は活性化される。

Flag-MTK1及びMycPLK1またはMyc-PLK4をHEK293FT細胞に共発現させ、Myc抗体によりMycPLK1またはMyc-PLK4を免疫沈降する。これらに α -casein及び γ - ^{32}P -ATPを加えて30°C、30分リン酸化反応を誘導し、 ^{32}P の取り込みをオートラジオグラフィーにより検出した。

3-5 PLK4 はストレス刺激時にストレス応答 MAP3K によって活性化される (Fig. 28)。

これまでの実験から PLK4 がストレス応答 MAP3K によって直接活性化されることが明らかになったので、次に PLK4 がストレス刺激時に活性化されるか検証を行った。Myc-PLK4 を 293FT 細胞に一過的に発現させた。24 時間後、細胞に高浸透圧刺激を加えて経時的に細胞を回収し、PLK4 分子内の T170 残基のリン酸化をモニターした。この結果、刺激 5 分後から微かな同残基へのリン酸化とバンドシフトが観察され、1 時間後にリン酸化がピークに達した (Fig. 28a)。また、高浸透圧刺激 1 時間処理した細胞から Myc 抗体を用いた免疫沈降により Myc-PLK4 を単離し、キナーゼ活性の変化をオートラジオグラフィーによって観察した。この結果、T170 残基へのリン酸化と相関して PLK4 のキナーゼ活性も亢進した (Fig. 28b)。

更にストレス刺激依存的な T170 残基に対するリン酸化を詳細に解析するために、Myc-PLK4(K41M) 及び Myc-PLK4(K41M/T170A) を安定して発現する細胞株 {HEK293A-Myc-PLK4(K41M)及び HEK293A-Myc-PLK4(K41M/T170A)} を樹立した。PLK4 は自己リン酸化活性を持っている。そこで自己リン酸化により T170 残基をリン酸化する可能性を排除するため、活性中心を失活させる変異 (K41M) を導入した。この安定発現株 HEK293A-Myc-PLK4(K41M)に先述と同様に高浸透圧刺激を加え、経時的に細胞を回収し T170 残基へのリン酸化をモニターした。この結果、高浸透圧刺激に依存して T170 残基へのリン酸化が観察された (Fig. 28c)。また、高浸透圧刺激に依存した T170 残基へのリン酸化は安定発現株 HEK293A-Myc-PLK4(K41M/T170A)では観察されなかった (Fig. 28d)。このことから高浸透圧刺激によって T170 残基が特異的にリン酸化されることが明らかになった。さらに他のストレス刺激でも同様に同残基へのリン酸化が見られるか検証を行った。その結果、高浸透圧刺激に加え、エトポシド、UV、TNF α などの刺激でも T170 残基がリン酸化されることが明らかになった (Fig. 28e)。

また内在性の PLK4 でもストレス刺激に依存して PLK4 のキナーゼ活性が亢進するか検証した。HeLa 細胞をチミジン、ノコダゾールの順に処理し G2/M 期に同調させた後、高浸透圧刺激 (0.5M, 30 分) を加えた。この細胞を回収して PLK4 抗体で免疫沈降した後、 α -casein 及び γ - ^{32}P -ATP を添加してリン酸化反応を誘導した (30°C, 30 分)。 ^{32}P の取り込みをオートラジオグラフィーにより検出した結果、高浸透圧刺激に依存して MAP3K の活性化 (MKK3/6 及び MKK4 のリン酸化) が観察され、これと相関して PLK4 のキナーゼ活性 (α -casein のリン酸化) も亢進した (Fig. 28f)。高浸透圧における SAPK 経路の活性化は主に TAK1 によって媒介されることが知られている。このため、高浸透圧刺激 1 時間前に TAK1 阻害剤で前処理しておいたところ、MAP3K の基質である MKK3/6 及び MKK4

3-結果

のリン酸化は見られず、また PLK4 の活性化も減弱した。以上から高浸透圧刺激によってみられる PLK4 のリン酸化及び活性化は TAK1 (MAP3K) に依存して起こることが明らか

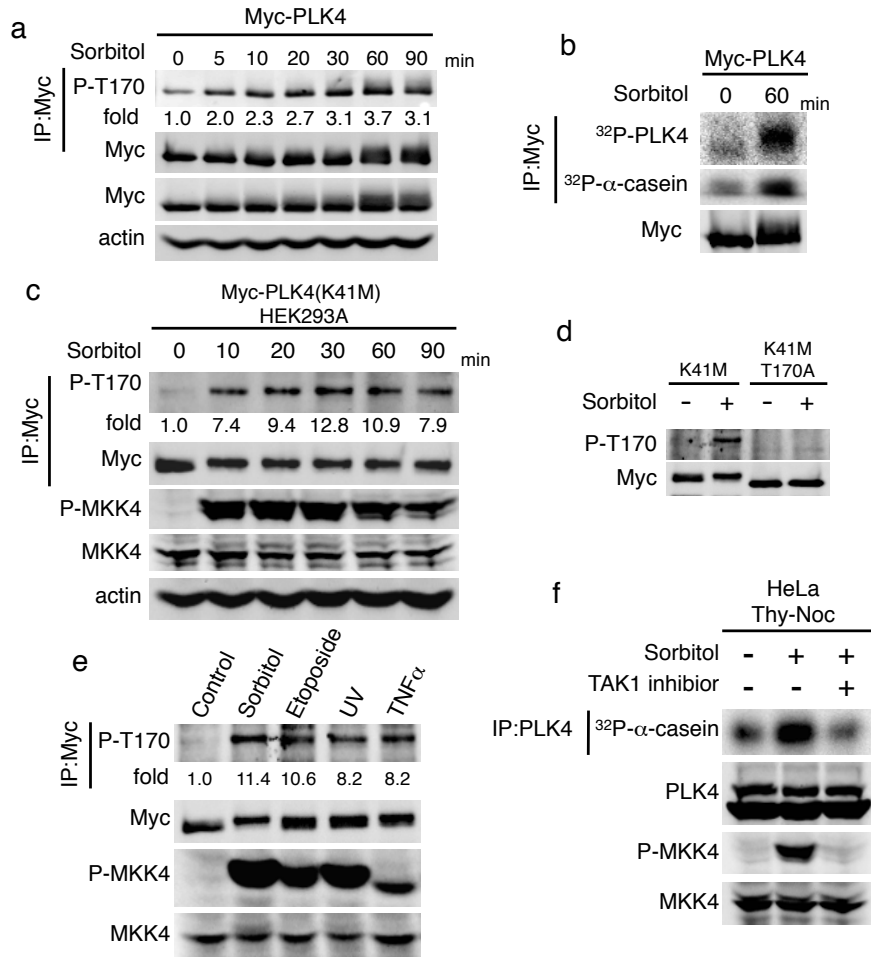


Fig. 28 PLK4はストレス依存的に活性化される。

- PLK4は高浸透圧刺激に依存してバンドシフトが誘導される。Myc-PLK4をHEK293FT細胞に一過的に発現させ、0.5 Mソルビトールを用いて高浸透圧刺激を加えた。Myc抗体で免疫沈降後、リン酸化特異抗体を用いたWestern blotを行いPLK4がリン酸化されるか検証した。
- PLK4は高浸透圧刺激に依存してキナーゼ活性が亢進する。Myc-PLK4をHEK293FT細胞に一過的に発現させ、0.5 Mソルビトール処理を1時間行った後細胞を回収した。Myc抗体で免疫沈降後、α-casein及び³²P-γ-ATPを加えて30°C、30分リン酸化反応を誘導し、³²Pの取り込みをオートラジオグラフィーにより検出した。
- PLK4安定発現細胞でも高浸透圧刺激に依存してT170残基のリン酸化が誘導される。Myc-PLK4 (K41M) を遺伝子導入したレトロウィルスを用いてHEK293A細胞に感染させ、Myc-PLK4 (K41M) 安定発現細胞株を樹立した。この細胞に高浸透圧刺激を加えMyc抗体で免疫沈降後、リン酸化特異抗体を用いたWestern blotを行った。
- 高浸透圧刺激に依存してPLK4のT170残基がリン酸化される。レトロウィルスを用いてMyc-PLK4 (K41M) およびMyc-PLK4 (K41M/T170A) の安定発現細胞株を樹立した。これらの細胞に高浸透圧処理した後、細胞を回収した。Myc抗体で免疫沈降後、リン酸化特異抗体を用いたWestern blotを行った。
- エトポシド、UV及びTNFα刺激によってもT170残基のリン酸化が誘導される。Myc-PLK4 (K41M) 安定発現細胞にエトポシド刺激 (50 μM、37°C、3時間) し細胞を回収した。Myc抗体で免疫沈降後、リン酸化特異抗体を用いたWestern blotを行った。また、UV (80 J/m²、30分) 及びTNFα (50 ng/L、20分) でも同様の実験を行った。
- 内在性PLK4も高浸透圧刺激依存してキナーゼ活性が誘導される。HeLa細胞をチミジン処理 (37°C、24時間) した後、無血清培地で洗浄し3時間血清培地で培養した。その後、ノコダゾール処理してG2/M期に同調した細胞に高浸透圧刺激を加えた。細胞を回収後、PLK4抗体で免疫沈降し、α-casein及び³²P-γ-ATPを加えて30°C、30分リン酸化反応を誘導し、³²Pの取り込みをオートラジオグラフィーにより検出した。

になった。

3-6 高浸透圧刺激及び TNF α 刺激では PLK4 (T170 残基) のリン酸化は主に TAK1 によって誘導される (Fig. 29)。

ストレス刺激に依存した T170 残基のリン酸化が *in vivo* においてもストレス応答 MAP3K によって直接誘導されるか検証する実験を行った。まず、ドミナントネガティブ変異体 Flag-MTK1-C(K/R)または Myc-TAK1(K/W)をそれぞれ 293FT 細胞に過剰発現させた場合に、高浸透圧刺激による T170 残基へのリン酸化が抑制されるか検証した。その結果、これらの不活性型変異体の量に依存して同残基のリン酸化は抑制された (Fig. 29a & b)。

これまでの先行研究から高浸透圧刺激及び TNF α 刺激により TAK1 が特異的に活性化されることが知られている^{66,71}。そこで TAK1 阻害剤 5Z-7-oxo-zeaenol⁷² で処理した場合に高浸透圧刺激時に見られる T170 残基へのリン酸化が抑制されるか検証した。安定発現株 HEK293A-Myc-PLK4(K41M)に TAK1 阻害剤 5Z-7-oxo-zeaenol を加えて 1 時間前処理した後、高浸透圧刺激を加え T170 残基のリン酸化が抑制されるか検証した。その結果、TAK1 阻害剤の量に依存して同残基へのリン酸化は抑制された (Fig. 29c)。また、MAP3K のキナーゼ活性を測定するため MAP3K の標的分子である MKK4 のリン酸化をモニターした。その結果、T170 残基のリン酸化の場合と同様にして MKK4 のリン酸化も TAK1 阻害剤の量が増加すると阻害効果が大きくなった。

さらに、TAK1 をノックダウンした場合にも、TAK1 阻害剤と同様に T170 残基へのリン酸化が抑制されるか検証した。安定発現株 HEK293A-Myc-PLK4(K41M)に TAK1 siRNA を導入し、4 日間培養した。この細胞に TNF α 刺激を加えて T170 残基へのリン酸化が抑制されるか観察した。off-target の可能性も考慮して 3 種類のヒト由来 TAK1 に対する siRNA を用いて別々に TAK1 をノックダウンさせたところ、いずれの場合も T170 残基へのリン酸化が消失した (Fig. 29e)。また、siRNA の標的になり得ないマウス由来の TAK1 を用いて、レスキュー実験を行った。安定発現株 HEK293A-Myc-PLK4(K41M)に TAK1 siRNA を導入し、24 時間後に TAK1 (マウス由来) を遺伝子導入した。3 日後に TNF α 刺激を加えて T170 残基に対するリン酸化が回復するか検証した。その結果、(マウス由来) TAK1 の発現によって同残基へのリン酸化が再び観察された (Fig. 29f)。

以上から、PLK4 はストレス依存的に MAP3K (MTK1, TAK1, MEKK1, MLK3) によって活性化されており、少なくとも高浸透圧及び TNF α 刺激では TAK1 を介して PLK4 分子内の T170 残基がリン酸化されることが明らかになった。

3-結果

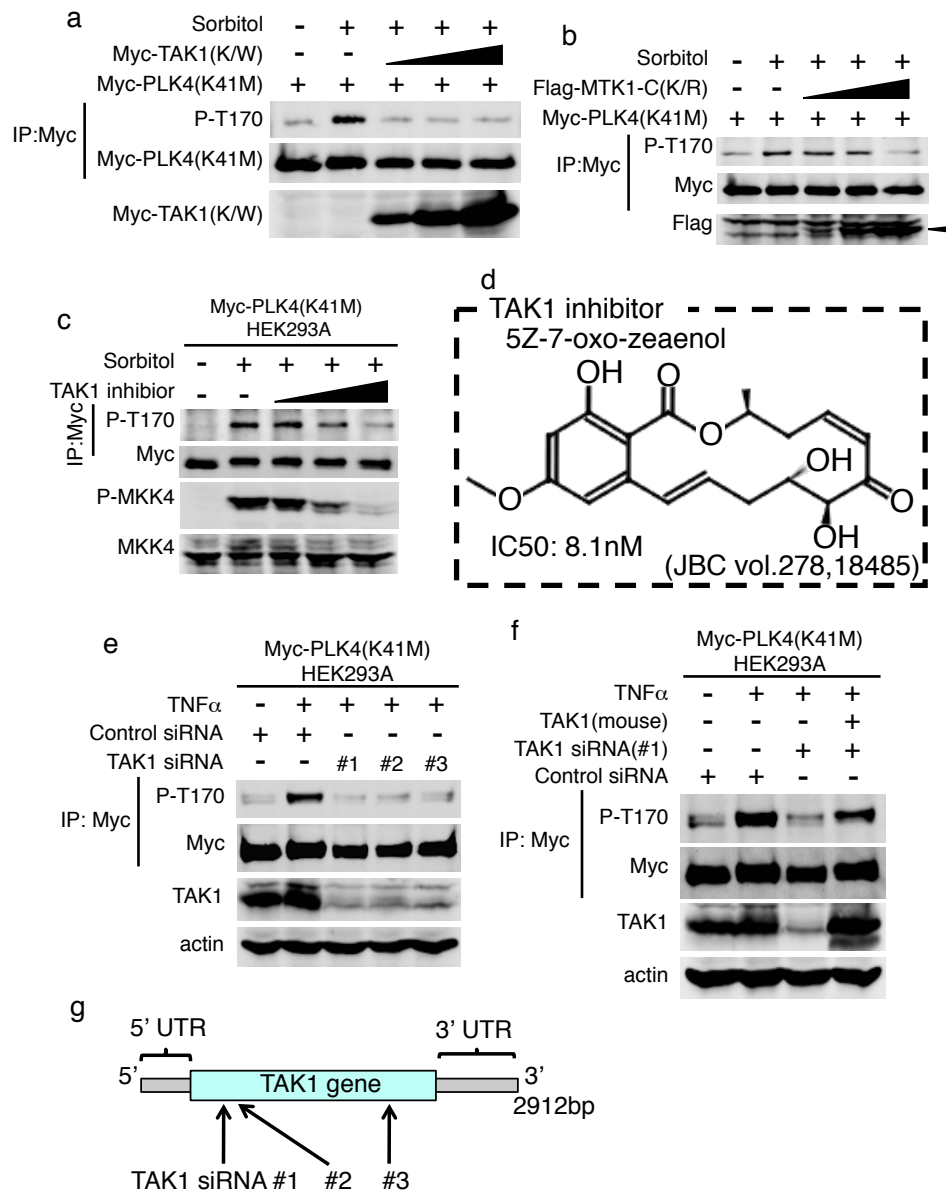


Fig. 29 高浸透圧及びTNFα刺激依存的なPLK4のリン酸化は主にTAK1を介して誘導される。

- a) 高浸透圧刺激時におけるPLK4 (T170) のリン酸化はドミナントネガティブ変異体Myc-TAK1 (K63W) によって阻害される。Myc-PLK4 (K41M) 及びMyc-TAK1 (K63W) をHEK293FT細胞に遺伝子導入し、40時間後に高浸透圧刺激を20分間加えた。その細胞を回収し、Myc抗体で免疫沈降後、PLK4のリン酸化特異抗体でWestern blotした。
- b) 高浸透圧刺激時におけるPLK4 (T170) のリン酸化はドミナントネガティブ変異体Flag-MTK1 (K1372R) によって阻害される。Myc-PLK4 (K41M) 及びFlag-MTK1-C(K1372R)をHEK293FT細胞に遺伝子導入し、40時間後に高浸透圧刺激を20分間加えた。その細胞を回収し、Myc抗体で免疫沈降後、PLK4のリン酸化特異抗体でWestern blotした。
- c) 高浸透圧刺激時におけるPLK4 (T170) のリン酸化はTAK1阻害剤によって阻害される。Myc-PLK4 (K41M) 安定発現HEK293A細胞にTAK1阻害剤 (5Z-7-oxo-zeaenol) を1時間処理した後、高浸透圧刺激を20分間加えた。その細胞を回収し、Myc抗体で免疫沈降後、PLK4のリン酸化特異抗体でWestern blotした。
- d) TAK1阻害剤 (5Z-7-oxo-zeaenol) の化学構造式
- e) TNFα刺激におけるPLK4 (T170) のリン酸化はTAK1ノックダウンによって抑制される。Myc-PLK4 (K41M) 安定発現HEK293A細胞にTAK1 siRNA #1~3 (QIAGEN) をそれぞれ遺伝子導入し、96時間後にTNFα刺激を20分間処理した。その細胞を回収し、Myc抗体で免疫沈降後、PLK4のリン酸化特異抗体でWestern blotした。
- f) TAK1ノックダウンによって抑制されたTNFα刺激におけるPLK4 (T170) のリン酸化はマウス由来TAK1を遺伝子導入することにより回復する。Myc-PLK4 (K41M) 安定発現HEK293A細胞にTAK1 siRNA #1 (QIAGEN) を遺伝子導入し、96時間後にTNFα刺激を20分間処理した。その細胞を回収し、Myc抗体で免疫沈降後、PLK4のリン酸化特異抗体でWestern blotした。また、TAK1 siRNAを遺伝子導入24時間後にこのsiRNAに認識されないマウス由来TAK1を遺伝子導入した。72時間後にTNFα刺激を20分間処理し同様の実験を行った。
- g) TAK1 siRNAの標的配列の位置。

3-7 MAP3K による PLK4 のリン酸化に、MAPKK 及び MAPK は関与しない (Fig. 30)。

Fig.1~5 でストレス応答 MAP3K と PLK4 が結合することが明らかになった。また、Fig.1b, e, f の結果から、ストレス応答 MAP3K のキナーゼ活性に依存して PLK4 のバンドシフトが観察されたため、ストレス応答 MAP3K または MAPKK/MAPK によって PLK4 がリン酸化されることが示唆された。そこで、MAPKK 及び MAPK が MAP3K と PLK4 の結合及びリン酸化に関与するか検証する実験を行った。

PLK4 の活性化にはキナーゼドメイン T-loop 内の T170 のリン酸化が必須であることが知られている。そこで、リン酸化された T170 残基を含む合成ペプチドを作製し、これを免疫源としてウサギに導入し、同残基に対するリン酸化抗体を樹立した (Fig.26)。PLK4 分子の自己リン酸化を防ぐため活性中心 (K41) を失活させた安定発現株 HEK293A-Myc-PLK4(K41M) に MAPK 阻害剤 (ERK, U0126; p38, SB203580; JNK, SP600125) (終濃度 30 μ M) を加えて 1 時間培養した。続いて高浸透圧刺激を加えた後、細胞を回収した。この細胞からの可溶化液に Myc 抗体を加えて免疫沈降した後、PLK4 のリン酸化特異抗体で western blot を行った。その結果、いずれの MAPK 阻害剤を用いた場合でも PLK4 のリン酸化に影響はなかった (Fig. 30a)。このことから MAPK は PLK4 の

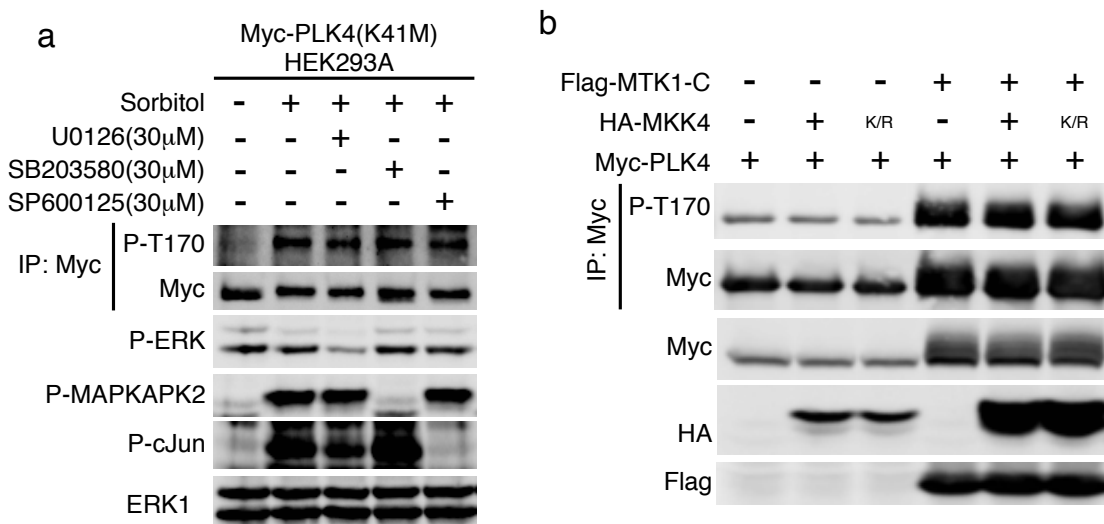


Fig. 30 PLK4のリン酸化にMAPKK及びMAPKは関与しない。

- a) 高浸透圧刺激におけるPLK4 (T170) のリン酸化はMAPK阻害剤によって阻害されない。Myc-PLK4 (K41M) 安定発現HEK293A細胞にMAPK阻害剤 (U0126, MEK/ERK阻害剤; SB203580, p38阻害剤; SP600125, JNK阻害剤) を1時間処理した後、高浸透圧刺激を20分加えた。その細胞を回収し、Myc抗体で免疫沈降後、PLK4のリン酸化特異抗体でWestern blotした。
- b) 恒常的活性型変異体Flag-MTK1-CによるPLK4のリン酸化はMKK4のドミナントネガティブ変異体によって阻害されない。HEK293FT細胞にFlag-MTK1-C、HA-MKK4及びMyc-PLK4を遺伝子導入し、40時間後に細胞を回収した。Myc抗体で免疫沈降し、PLK4のリン酸化特異抗体でWestern blotした。

リン酸化に直接関与しないと考えられる。

次に MAPKK が PLK4 のリン酸化に関与するか検証した。ドミナントネガティブ変異体 HA-MKK4(K/R)を Flag-MTK1-C 及び Myc-PLK4 と共に 293FT 細胞に遺伝子導入した。この細胞を回収し Myc 抗体で western blot を行った。その結果 MTK1 によって PLK4 のバンドシフトが誘導されたが、不活性型変異体 HA-MKK4(K/R)を発現させても PLK4 のバンドシフトに影響はなかった (Fig. 30b)。また回収した細胞から作製した可溶化液を Myc 抗体で免疫沈降し、PLK4 のリン酸化特異抗体を用いて western blot を行った。PLK4 のバンドシフトと同様に不活性型変異体 HA-MKK4(K/R)を発現させても PLK4 のリン酸化に影響はなかった。

3-8 p38 及び JNK 経路は中心体の過剰複製を抑制する (Fig. 31 & 32)。

ストレス応答 MAP3K によって PLK4 がリン酸化されることが明らかになったので、そのリン酸化の意義を検証した。

PLK4 は、これまでの先行研究成果から中心体複製を担うことが知られている。例えば、PLK4 のノックアウトは(初期発生の原腸陥入の停止により)胎生致死(E7.5)に到るため、PLK4 遺伝子を片親のみ欠損させた場合には個体発生は起こるが、中心体数の異常を示す細胞が増加することにより肝癌及び肺癌の発生率が亢進する⁶⁰。また、PLK4 を過剰発現させると、中心体数が過剰 (≥ 3) になることが知られている。

そこで、PLK4 と共に MTK1 を共発現させた場合に、PLK4 の中心体複製に与える影響を検証した。恒常的活性型変異体 Flag-MTK1-C を Myc-PLK4 と HeLa 細胞に一過的に発現させた。遺伝子導入した PLK4 による中心体複製に与える影響を観察するため、細胞を 48 時間培養した。細胞を冷却したメタノールで固定し、0.1% Triton X-100 で透過処理後、 γ -tubulin 抗体 IgG1 (centrosome marker) (緑) 及び Myc 抗体 IgG2a (赤) でそれぞれ染め分けし、蛍光顕微鏡により中心体数の変化をモニターした。その結果、Myc-PLK4 及びユビキチン分解不全型変異体 Myc-PLK4(S285A/T289A)^{54,55} の単独発現では、中心体数が過剰になったのに対して、MTK1 及び PLK4 を共発現させて PLK4 の活性化を誘導した場合には中心体数の異常はほとんど観察されなかった (Fig. 31a & b)。MTK1 及び PLK4 に加えて更に p38 あるいは JNK を共発現させた場合に中心体数の異常を抑制する効果は亢進した。このことから、MTK1 は p38 及び JNK 経路を活性化することによって、過剰な中心体複製が起こらない様に制御していると考えられる。

次に、p38 経路を活性化することにより PLK4 依存的な中心体の過剰複製が抑制されるか検証を行った。恒常的活性型 GFP-PLK4 (Fig. 32a & b) 及び恒常的活性型変異体

3-結果

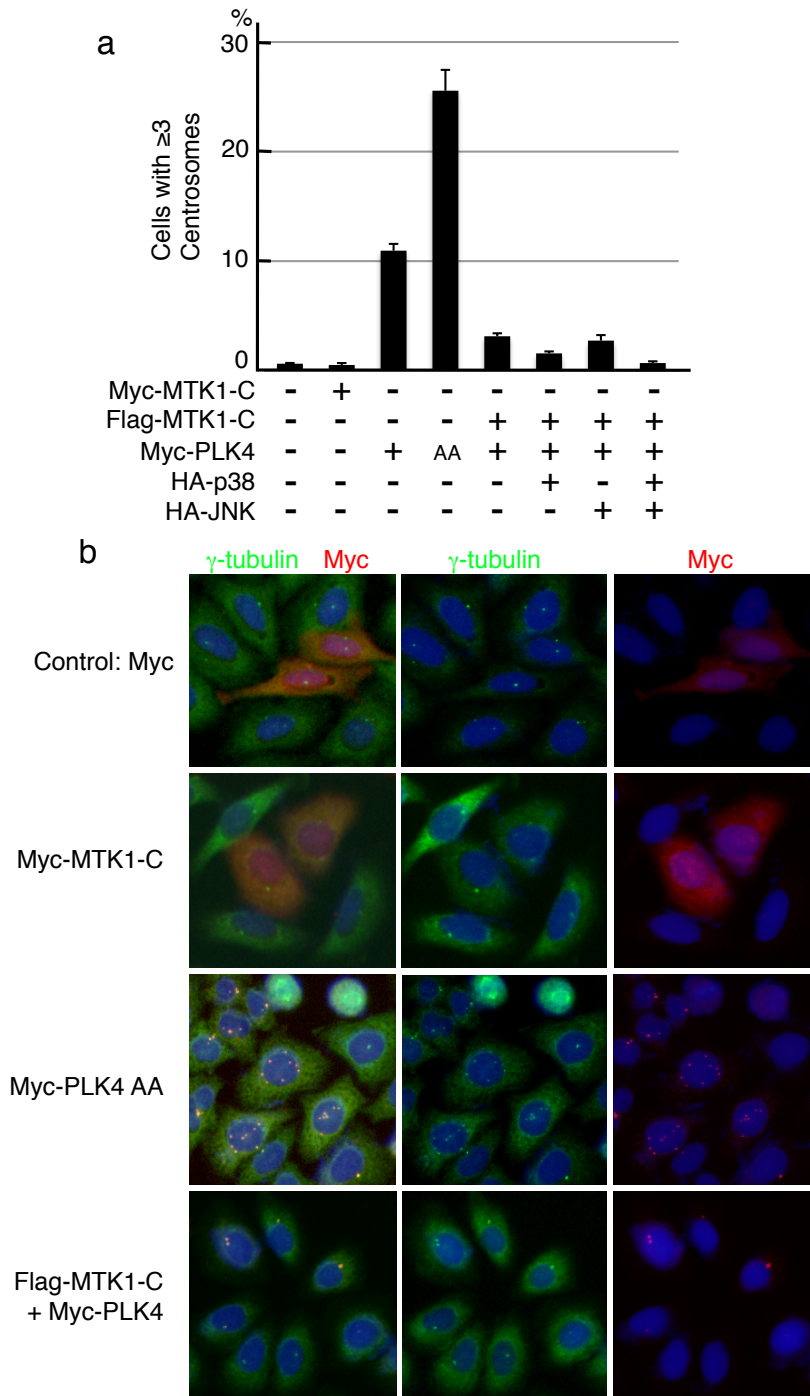


Fig. 31 PLK4の過剰発現による中心体数の異常 (≥ 3) はMTK1の共発現により抑制される。
a) PLK4の過剰発現による中心体数の異常 (≥ 3) はMTK1、p38/JNKの共発現により抑制される。HeLa細胞にFlag-MTK1-C、Myc-MTK1-C、Myc-PLK4、HA-p38、HA-JNKを遺伝子導入し、Myc抗体 (赤)、 γ -tubulin抗体 (緑) で免疫染色し、核はDAPI染色 (青) した。また、Myc-PLK4 (S285A/T289A) はユビキチン分解を受けない変異体であり、中心体数の異常を示す (≥ 3) ポジティブコントロールとして用いた。Error barは標準誤差を表す。
b) a)の典型図。Myc (赤)、中心体マーカー γ -tubulin (緑) 及び核 (青)。

Myc-p38AS(D176A/F327S)⁷³をHeLa細胞に一過的に発現させ、PLK4及びp38のみを活性化させた。この時、恒常的活性化型PLK4による中心体過剰複製がp38によって抑制さ

3-結果

れるか、中心体を GFP-PLK4 で蛍光発光させることにより検証した。その結果、GFP-PLK4 の単独発現では中心体数の異常亢進 (≥ 3) が観察されたが、p38AS を共発現させることにより中心体数の異常が抑制された (Fig. 32c & d)。また、不活性型 p38(K/N) を共発現させた場合にはこのような抑制効果は観察されなかった。

p38 による中心体過剰複製の抑制機序に関していくつか検証を行った。まず p38 が PLK4 のキナーゼ活性を直接抑制する可能性を考えてみた。そこで、この GFP-PLK4 と Myc-p38AS を 293FT 細胞に一過的に発現させた。40 時間後にこの細胞から可溶化液を作製した後 GFP 抗体を用いて GFP-PLK4 のみを免疫沈降させた。この GFP-PLK4 を用いて T170 残基に対するリン酸化特異抗体でウェスタンブロットを行い PLK4 のリン酸化 (活性化) 状態をモニターした。その結果、恒常的活性型 p38AS の共発現により PLK4 分子内の T170 残基へのリン酸化には影響がなかった (Fig. 32e)。また、同様の手順で精製した GFP-PLK4 を用いて *in vitro* キナーゼアッセイを行ってみたが、恒常的活性型 p38AS を強発現させても PLK4 のキナーゼ活性に顕著な影響が見られなかった。以上の結果から、p38

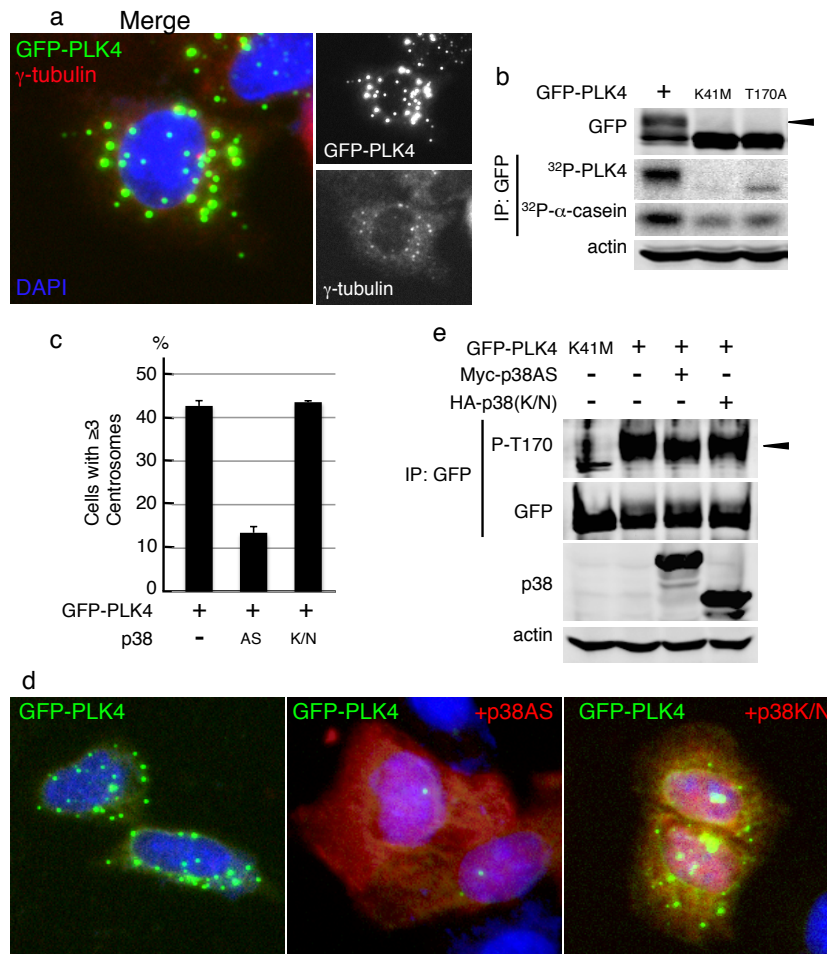


Fig. 32 PLK4の過剰発現による中心体数の異常 (≥ 3) はp38の共発現により抑制される。

- a) GFP-PLK4過剰発現による中心体数の異常 (≥ 3)。GFP-PLK4をHeLa細胞に過剰発現し、 γ -tubulin抗体 (赤) で免疫染色した。
- b) GFP-PLK4は恒常的に活性化されている。GFP-PLK4, GFP-PLK4 (K41M), GFP-PLK4 (T170A) をそれぞれ HEK293FT細胞に遺伝子導入した。細胞を回収し、GFP抗体で免疫沈降後、 α -casein及び 32 P- γ -ATPを加えて30°C、30分リン酸化反応を誘導し、 32 Pの取り込みをオートラジオグラフィーにより検出した。矢印はPLK4のバンドシフトを表した。
- c) 恒常的活性型GFP-PLK4による中心体の過剰複製はp38により抑制される。GFP-PLK4及び恒常的活性型変異体 Myc-p38(D176A/F327S)をHeLa細胞に共発現し、Myc抗体 (赤) で免疫染色を行った。Myc抗体で染色された細胞 (≥ 200) における中心体数の異常 (≥ 3) な細胞の比率を算出した。以上の独立した実験を3回行い標準誤差を算出した。なお、中心体数はGFP-PLK4のドット数を数え、核はDAPI染色 (青) した。また、不活性型変異体としてHA-p38(K/N)を用いた。
- d) c)の典型図。GFP-PLK4 (緑) は中心体数を表し、Myc抗体 (赤) またはHA抗体 (赤) はp38が遺伝子導入された細胞を表す。核はDAPI染色により青で表した。
- e) p38はGFP-PLK4のT170残基のリン酸化を抑制するわけではない。GFP-PLK4及び恒常的活性型変異体Myc-p38(D176A/F327S)をHEK293FT細胞に共発現し、GFP抗体で免疫沈降後、PLK4のリン酸化特異抗体でWestern blotを行った。また、不活性型変異体としてHA-p38(K/N)でも同様の実験を行った。

3-結果

による中心体過剰複製抑制メカニズムにおいて、p38 の標的分子は PLK4 ではなくその下流分子であると考えられる。

3-9 p38 は S 期において過剰な中心体複製を抑制する (Fig. 33)。

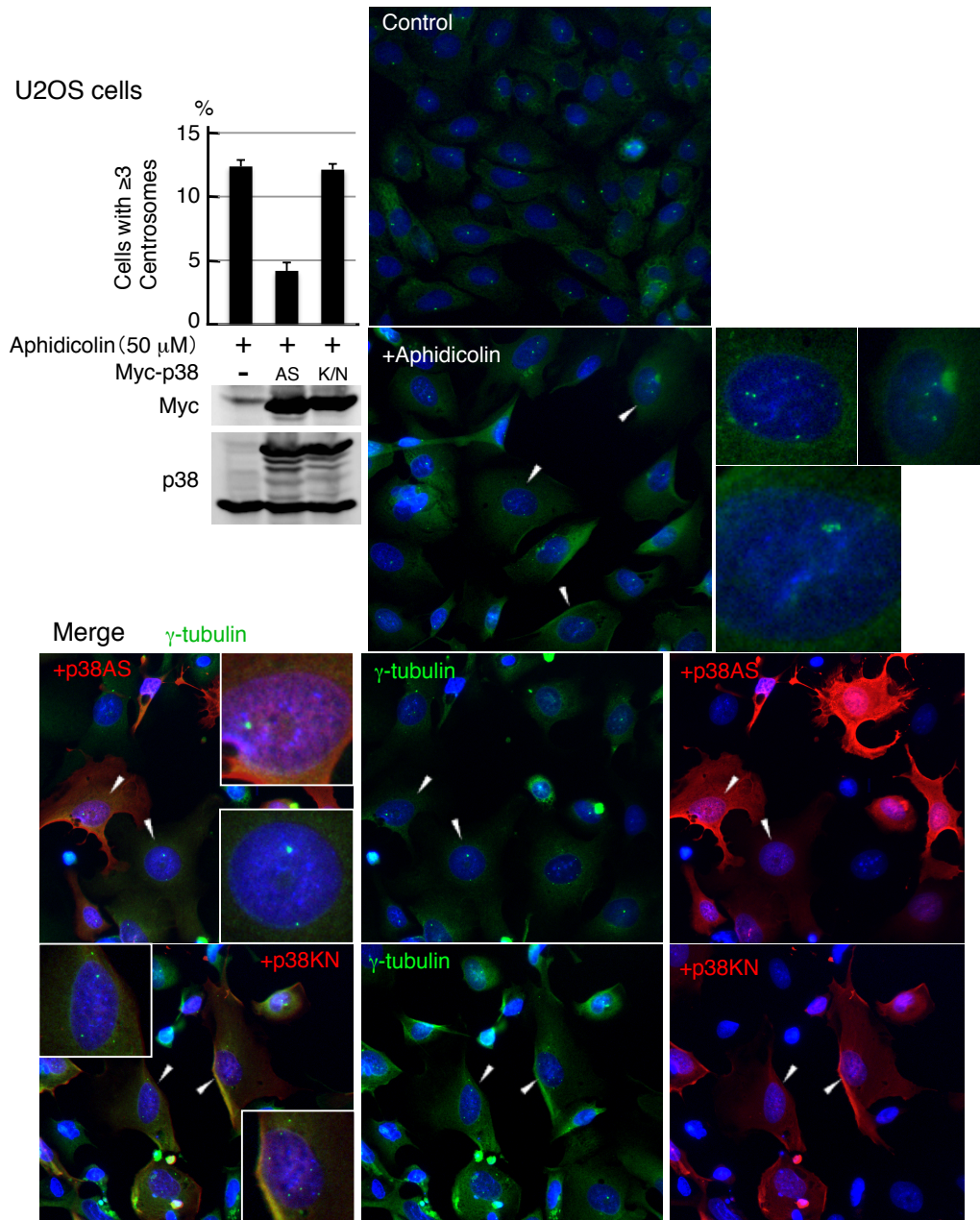


Fig. 33 p38はS期における中心体複製の異常亢進を抑制する。

a) U2OS細胞に恒常的の活性型変異体Myc-p38(D176A/F327S)を遺伝子導入した。24時間後に培養液交換し3時間ほど細胞培養した。続いてDNA複製阻害剤アフィジコリン (5 μ M)を加えて48時間細胞培養した。アフィジコリンを含む培養液で培養液交換し更に48時間細胞培養した。冰冷メタノールで固定後、Myc抗体(赤)及び γ -tubulin抗体(緑)で免疫染色を行った。Myc抗体で赤く染色された細胞200個以上を対象に中心体数の異常(≥ 3)を示す割合を算出した。独立した実験を3回行い標準誤差を求めた。また、不活性型変異体Myc-p38(K/N)でも同様の実験を行った。

これまでの先行研究から、p38 は下流の標的分子 MAPKAPK2などを活性化することにより細胞周期のチェックポイントを制御することが知られている¹⁸。このため、今回の研究結果から、PLK4 依存的な中心体複製を活性化型 p38 が抑制することが明らかになったが、この抑制機序としてチェックポイントが働いて細胞周期が停止した可能性と p38 が直接中心体複製を抑制した可能性が考えられた。

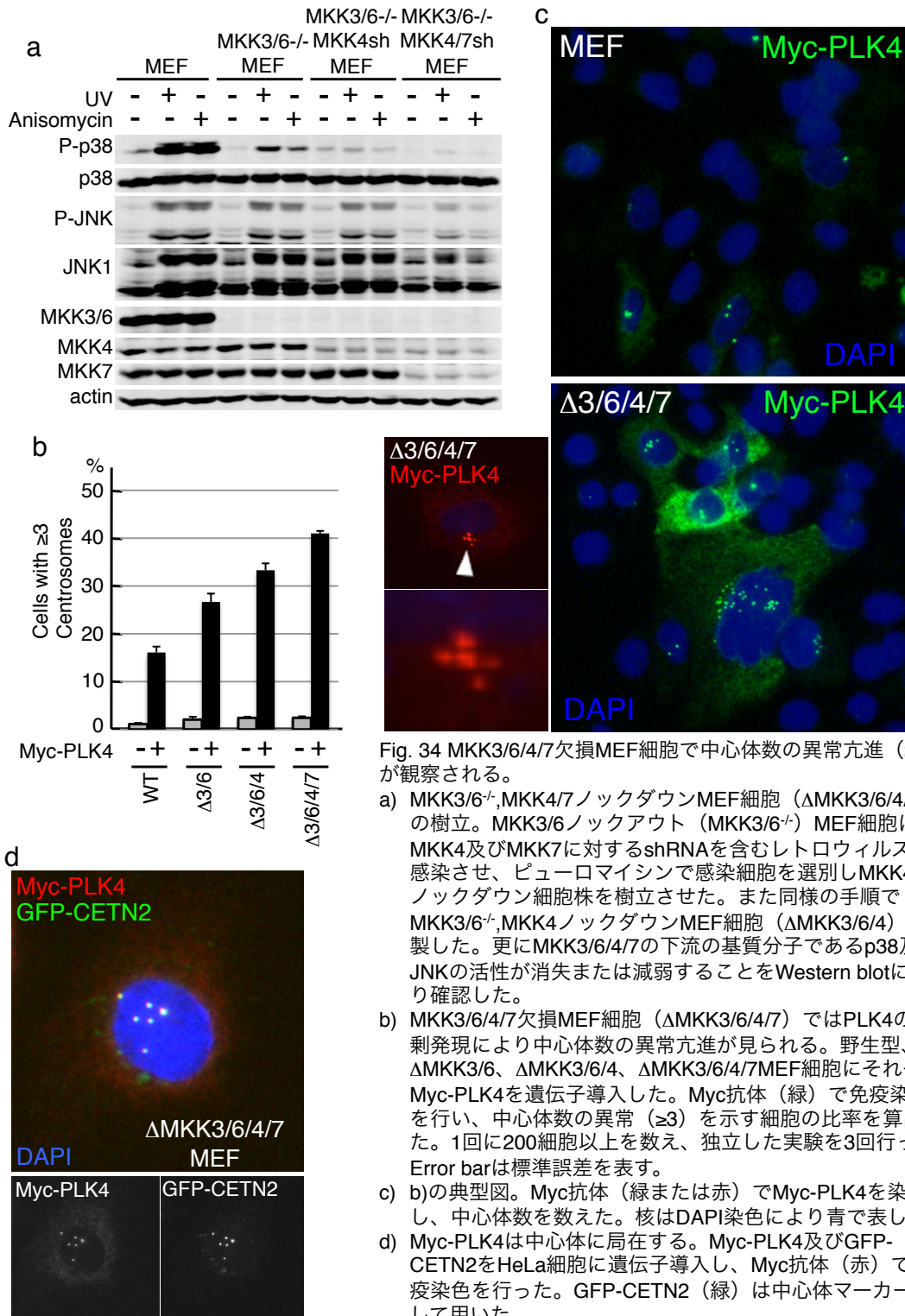
そこで、p38 が S 期において中心体複製を抑制するか検証する実験を行った。一般的に DNA ポリメラーゼ α 阻害剤アフィジコリンを U2OS 細胞に投与すると、S 期における DNA 複製が抑制されるため細胞周期が S 期で停止する。この時中心体複製そのものは阻害されず過剰複製し、中心体数が増加した細胞が見られるようになる³³。以上を踏まえて、活性型 Myc-p38AS を U2OS 細胞に遺伝子導入した後、上記したアフィジコリン処理を行い p38 によって中心体（中心小体）の複製が抑制されるか検証した。その結果、p38AS の発現した細胞では中心体数の増加（ ≥ 3 ）がコントロール細胞に比べて抑制された。一方、不活性型 Myc-p38(K/N)を発現した細胞ではこのような抑制効果は見られなかった（Fig. 33）。以上から、p38 は従来知られているチェックポイント機構に加えて、S 期において過剰な中心体複製を直接抑制する作用を合わせ持つと考えられる。

3-10 Δ MKK3/6/4/7MEF では中心体数の異常が亢進する (Fig. 34-36)。

次に p38/JNK 経路によって中心体過剰複製が抑制されるか逆遺伝学的手法を用いて検証した。Roger Davis 博士 (University of Massachusetts Medical school, Worcester)より供与して頂いた MKK3/6 ノックアウト (Δ 3/6) MEF⁸ を用いて MKK4/7 を欠損させた MKK3/6^{-/-}, MKK4/7 ノックダウン (Δ 3/6/4/7) MEF の作製を行った。実際に MKK4 及び MKK7 が共に効率良くノックダウンされていることを western blot により確認した (Fig. 34a)。また、MKK3/6^{-/-}, MKK4ノックダウン (Δ 3/6/4) MEF も作製した。

この p38/JNK を活性化しない Δ 3/6/4/7 MEF を用いて、中心体複製の異常が惹起されるか検証を行った。MEF、 Δ 3/6 MEF、 Δ 3/6/4 MEF、 Δ 3/6/4/7 MEF それぞれに Myc-PLK4 を一過的に遺伝子導入した。48 時間後に細胞を固定し、中心体数の異常を Myc 抗体で免疫染色することにより観察した。この結果、p38/JNK を共に活性化しない Δ 3/6/4/7 MEF で特に顕著な中心体数の異常が観察された (Fig. 34b, c & d)。このことから、p38 または JNK 経路によって中心体数の異常を監査し、中心体数の保全性が維持され则认为られる。

次に、この Δ 3/6/4/7 MEF に活性型変異体 MKK3/6 また p38 を遺伝子導入することにより p38 経路の活性化を誘導した場合、PLK4 依存的な中心体過剰複製が抑制されるか検証を行った。恒常的活性型変異体 MKK3EE/6DD⁵ または p38AS⁷³ を Myc-PLK4 と共に



Δ3/6/4/7 MEF に共発現させた。Myc 抗体により Myc-PLK4 を免疫染色し、中心体数の異常 (≥3) が惹起されるか観察した。この結果、Δ3/6/4/7 MEF に Myc-PLK4 を発現させたことによる中心体数の亢進 (≥3) が観察されたが、恒常的活性型変異体 MKK3EE/6DD

3-結果

または p38AS を共発現させることにより中心体数の異常亢進に対する抑制効果が見られた (Fig. 35a)。また、不活性型変異体 MKK3/6(K/N)または p38(K/N)を用いて同様の実験を行ったが、抑制効果は特に観察されなかった。

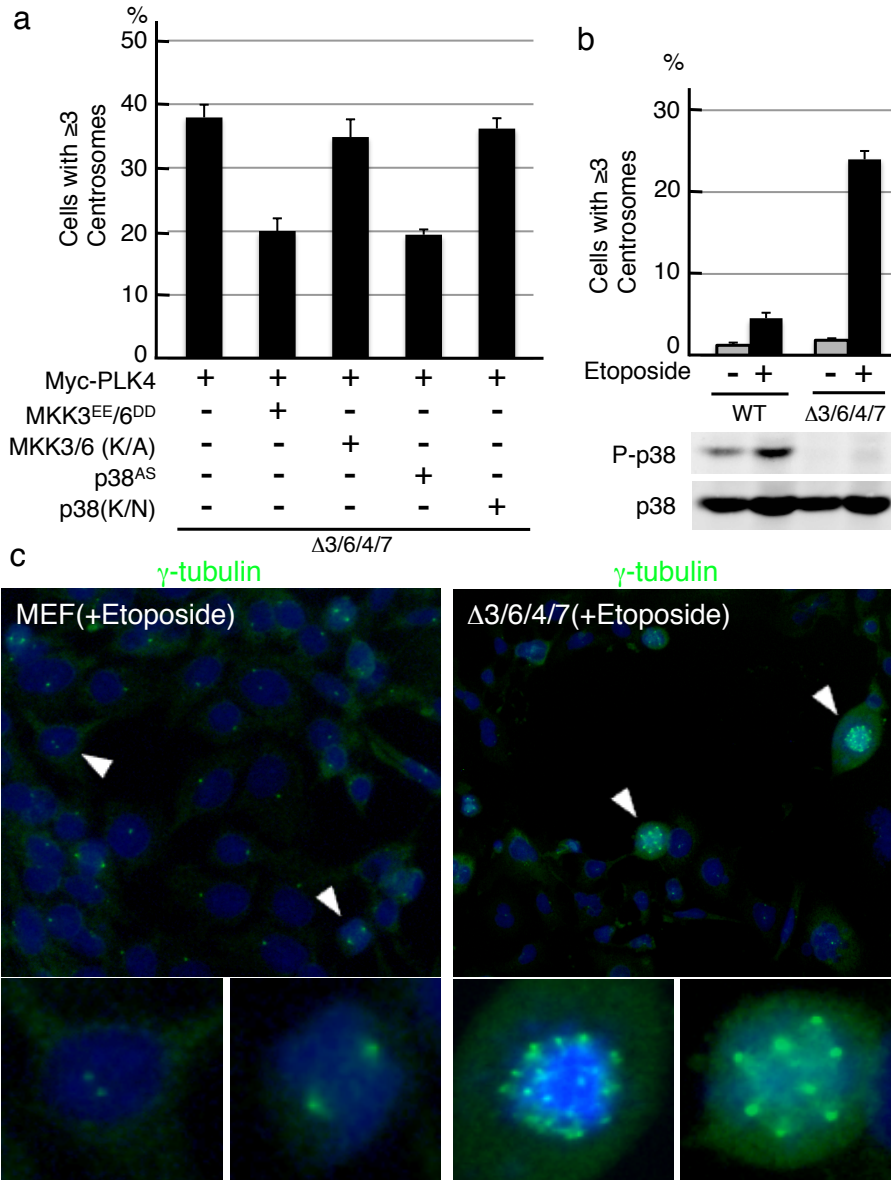


Fig. 35 p38/JNK経路は中心体数の異常亢進を抑制する。

- a) Myc-PLK4過剰発現におけるΔMKK3/6/4/7 MEF細胞での中心体数の異常はMKK3/6及びp38を再導入することにより抑制される。ΔMKK3/6/4/7 MEF細胞に恒常的活性型変異体HA-MKK3^{EE/6DD}、不活性型変異体HA-MKK3/6(K/N)、恒常的活性型変異体HA-p38^{AS}、不活性型変異体HA-p38(K/N)をそれぞれMyc-PLK4と共にHeLa細胞に発現させた。Myc抗体で免疫染色し、中心体数の異常 (≥3) を示す細胞を数えた。1回につき200細胞以上を対象に合計3回独立した実験を行い、標準誤差を算出した。
- b) MKK3/6/4/7欠損MEFはエトポシド刺激によって中心体数の異常が惹起される。野生型MEF細胞及びΔMKK3/6/4/7 MEF細胞にエトポシド刺激 (0.4 μM, 37°C) を加え、8時間後に無血清培養液で細胞を洗浄し、新たな培養液を加えて40時間細胞を培養した。細胞を氷冷MeOHで固定後、γ-tubulin抗体 (緑) で免疫染色を行った。核はDAPI染色 (青) した。1回につき200細胞以上を対象に合計3回独立した実験を行い、標準誤差を算出した。
- c) b)の典型図。

3-結果

MEF 及び $\Delta 3/6/4/7$ MEF に (p38/JNK を活性化させる) ストレス刺激を加えた場合に、中心体数の異常 (≥ 3) が惹起されるか検証を行った。MEF 及び $\Delta 3/6/4/7$ MEF に終濃度 $0.4 \mu\text{M}$ のエトポシド (トポイソメラーゼ II 阻害剤) を加え 37°C で培養した。8 時間後、細胞を無血清培養液で 2 回洗浄後、新たに血清入り培養液を加え 37°C で 48 時間さらに培養した。その結果、 $\Delta 3/6/4/7$ MEF において中心

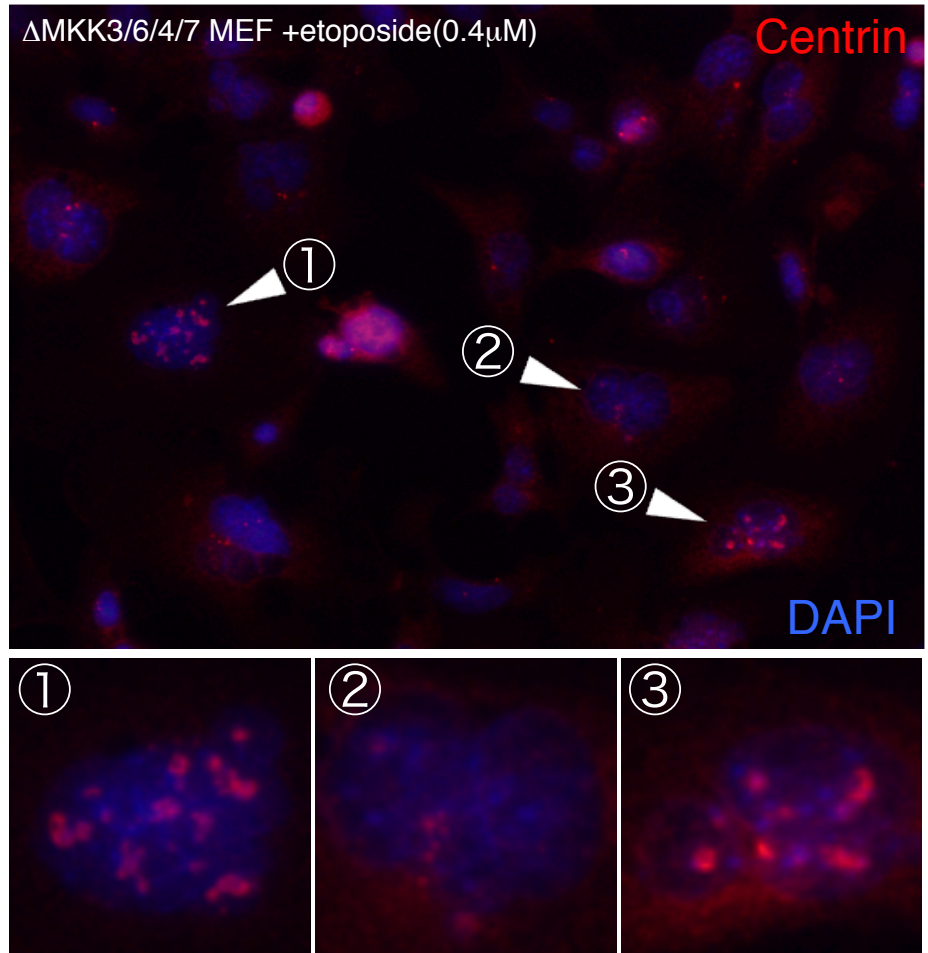


Fig.36 MKK3/6/4/7欠損MEFはエトポシド刺激によって中心小体数の異常が惹起される。

Fig.35bと同様の条件で、MKK3/6/4/7欠損MEFにエトポシド刺激 ($0.4 \mu\text{M}$ 、8時間、 37°C) を加えた後、エトポシド無処理の培養液でMKK3/6/4/7欠損MEFを更に40時間培養した。細胞を氷冷MeOHで固定後、Centrin (中心小体マーカー) 抗体 (赤) で免疫染色を行った。

体数が過剰となった細胞が多数観察された (Fig. 35b,c & 36)。中心体数の異常により染色体の不安定性が惹起されることが知られているため²⁸、 $\Delta 3/6/4/7$ MEF で観察された中心体数の異常 (≥ 3) が (染色体不均等分配によって引き起こされる) 1 細胞あたりの DNA 量の異常 ($>4N$) に反映されるか検証を行った。上記した様にエトポシド処理した MEF 及び MKK3/6/4/7 欠損 MEF をトリプシン処理した後、エタノールで固定して -20°C に一晩置いた。エタノールを除去して PBS に置換した後、propidium iodide (PI) 染色を行った。暗所に 30 分間置いた後、FACS により 1 細胞あたりの DNA 量を測定した。その結果、Fig. 17b, c において $\Delta 3/6/4/7$ MEF で観察された中心体数の異常と相関して 1 細胞あたりの DNA 量も異常に増加した ($>4N$) (Fig. 37a & b)。このように、MKK3/6/4/7 欠損を欠損させることで p38/JNK の活性が誘導されなくなると、ストレス刺激に依存して中心体数の異常と染色体の不均等分配が惹起された。このことから、p38/JNK は中心体数を制御する役割を担っていると考えられる。

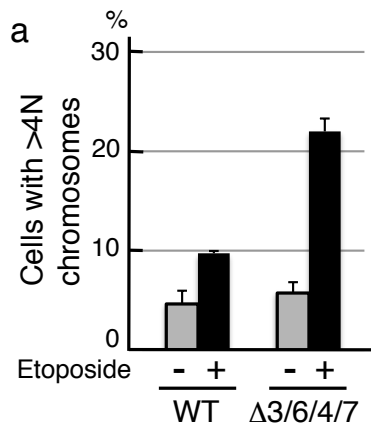
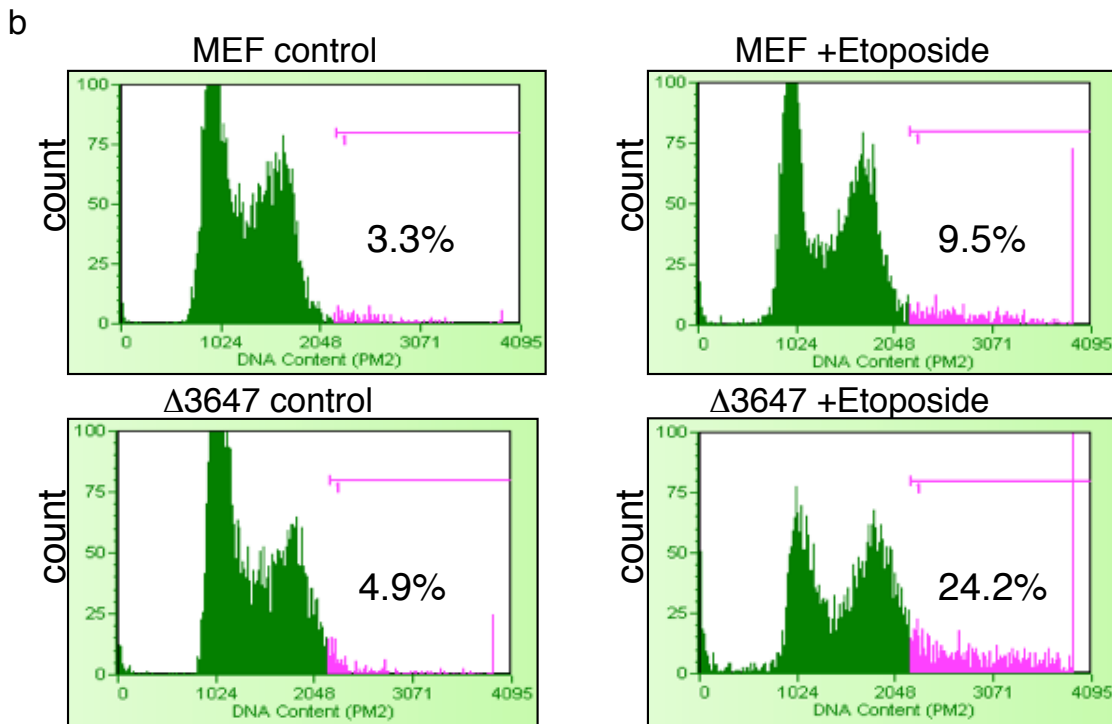


Fig. 37 Δ MKK3/6/4/7 MEF細胞はEtoposide刺激により染色体数の異常 (>4N) が顕著に誘導される。

a) MKK3/6/4/7欠損MEF細胞はエトポシド刺激によって染色体数の異常 (>4N) が惹起される。野生型MEF細胞及び Δ MKK3/6/4/7 MEF細胞にエトポシド刺激 (0.4 μ M、37°C、8時間) を加えた後、細胞を無血清培養液で洗浄し新たに培養液を加えて40時間細胞を培養した。細胞を氷冷EtOHにより固定し-20°Cに12時間以上おいた後、PI染色を暗所下で30分行った。この細胞をFAS解析 (Guava PCA, Millipore) にかける1細胞あたりのDNA量を算出した。1回につき5000細胞を対象として合計3回独立した実験を行い、標準誤差を算出した。

b) a)の典型結果。



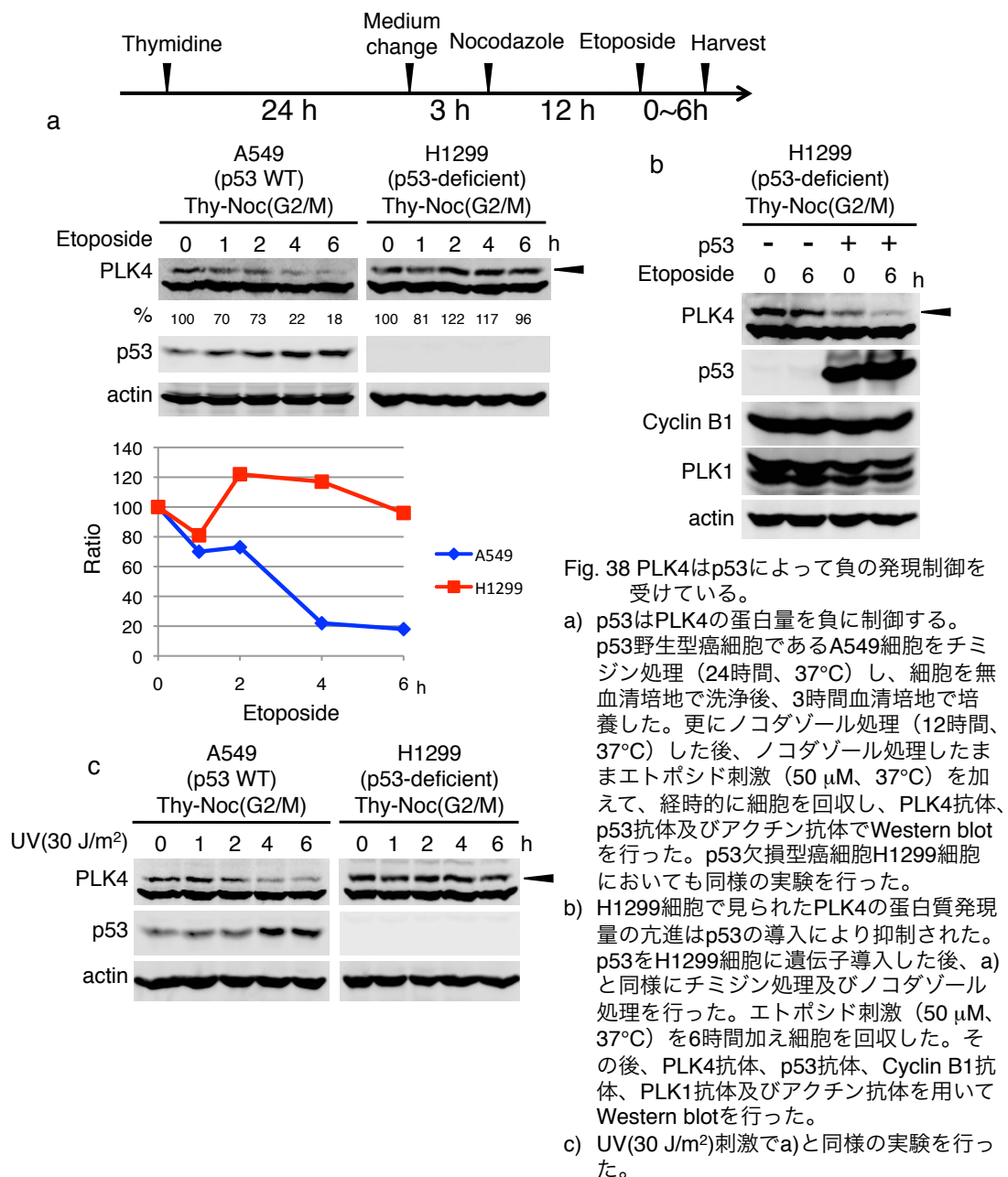
3-11 PLK4 の蛋白質量は p53 によって負に制御されている (Fig. 38)。

PLK ファミリーの蛋白質の発現制御において p53 が負に制御するという先行研究結果が同様に、PLK4 に関しても p53 によって転写制御を受け mRNA 量が減少することが報告されている^{74,75}。そこで、p53 による転写抑制により PLK4 の蛋白質発現量が低下するか検証を行った。

PLK4 は細胞周期に依存して蛋白質量が増減するため、PLK4 の発現量が最も多い G2/M 期にチミジン及びノコダゾール処理により細胞を同調した。次にこの細胞にエトポシド刺激を加えて DNA 損傷を引き起こすことで p53 の発現を誘導した。この結果、p53 野生型癌細

3-結果

胞 A549 細胞において p53 の発現量と反比例して PLK4 の発現量は低下した (Fig. 38a)。しかし、p53 欠損細胞 H1299 細胞をエトポシドで処理しても PLK4 の発現量の低下は観察されなかった。また、UV 刺激でも同様の実験を行ったところ、エトポシド刺激と同じように A549 細胞では p53 の発現量と反比例して PLK4 の発現量は低下したが、p53 欠損細胞 H1299 細胞では PLK4 の発現量は変化しなかった (Fig. 37c)。更に、H1299 細胞に外部から p53 を遺伝子導入して Fig.38a と同様の実験を行った結果、エトポシド刺激に依存して PLK4 の発現量は低下した (Fig. 38b)。以上の結果から、PLK4 の蛋白質量は p53 によって負に制御されていると考えられる。



3-12 PLK4 ノックダウン細胞ではエトポシド刺激によるアポトーシスが亢進する (Fig. 39-41)。

ここまでストレス刺激に依存して PLK4 がリン酸化されることを明らかにしてきた (Fig. 28&29)。次にストレス応答時における PLK4 の機能に関して解明を試みた。そこで、siRNA を用いて PLK4 を遺伝子欠損させた細胞にストレス刺激を加えて、細胞死、細胞周期停止などのストレス応答に影響が生じるか検証した。

まず、PLK4 に対する siRNA (2 種類) を Myc-PLK4 を HeLa 細胞に遺伝子導入し、ノックダウン効果を確認した (Fig. 39b)。次に、これらの siRNA が内在性の PLK4 に対してもノックダウン効果があるか検証する実験を行った。HeLa 細胞に PLK4 siRNA を 1 種類ずつ加えて 2 日間細胞培養した。その後、チミジン、ノコダゾール処理により細胞を G2/M 期に同調した。その結果、どちらの siRNA (#1,2) も内在性の PLK4 に対してノックダウン効果が見られた (Fig. 39a)。

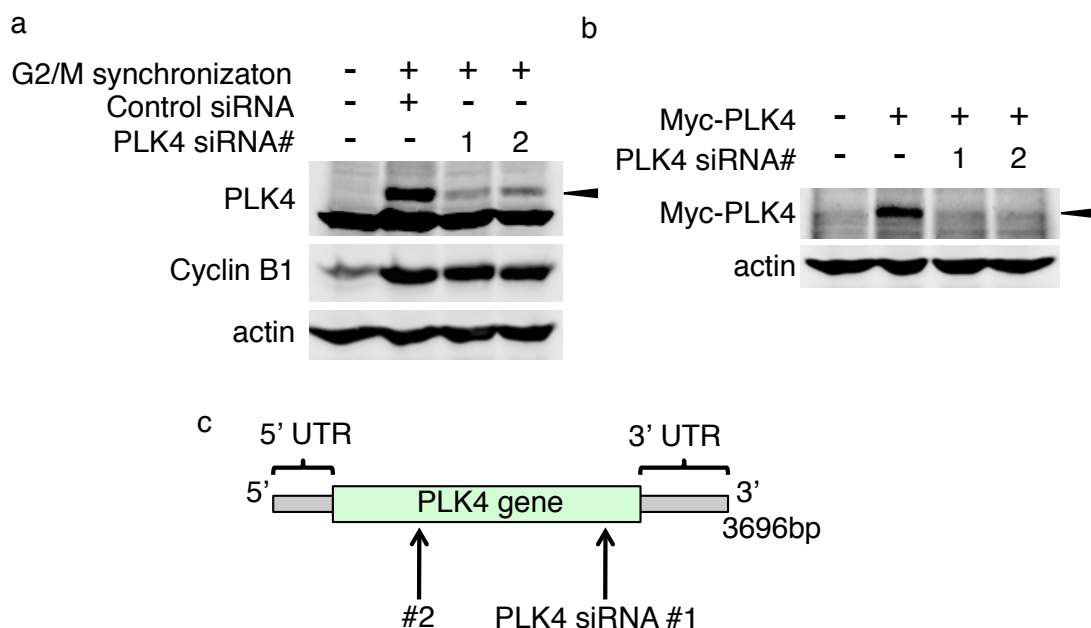


Fig. 39 PLK4に対するsiRNAは特異的にPLK4を認識して発現量を抑制する。

- a) PLK4 siRNA#1及び#2は内在性のPLK4を効率よくノックダウンする。無抗生物質培地で培養したHeLa細胞に2種類のPLK4 siRNAを1種類ずつ細胞に導入した。48時間細胞培養を行った後、チミジン処理 (2 mM) した。24時間後に細胞を無血清培養液で洗浄し、3時間血清培地で培養した。続いてノコダゾール処理 (100 ng/mL, 12時間) を行い、HeLa細胞をG2/M期に同調させた。細胞を回収後、PLK4抗体でWestern blotを行った。Cyclin B1抗体及びActin抗体でも同様にしてWestern blotを行った。
- b) PLK4 siRNA#1及び#2は効率良く過剰発現させたMyc-PLK4をノックダウンする。Myc-PLK4をHeLa細胞に一過的に遺伝子導入し、24時間細胞培養した。無抗生物質培地で培地交換した後、2種類のPLK4 siRNAを細胞に1種類ずつ導入した。細胞を48時間後に回収を行い、Myc抗体でWestern blotを行った。
- c) PLK4 siRNAの標的配列の位置。

3-結果

次にこれらの siRNA (#1, 2) を用いて PLK4 をノックダウンさせた場合に (エトポシド刺激によって誘導される) アポトーシスに影響を及ぼすか検証した。そこで、H1299 細胞 (p53 欠失) に PLK4 siRNA を導入して 48 時間培養した。培養液を交換して 3 時間細胞培養した後、エトポシド刺激 (50 μ M) を加えた。24 時間後に細胞を回収し、PARP 抗体、Caspase-9 抗体及び Caspase-3 抗体でウェスタンブロットを行い、PARP, Caspase-9 及び Caspase-3 が切断 (活性化) されるかでアポトーシスの判定をした。その結果、PLK4 をノックダウンしたことによりエトポシド刺激に依存して PARP, Caspase-9 及び Caspase-3 の切断が顕著に観察された (Fig. 40a & b)。この結果から PLK4 はアポトーシスを抑制する

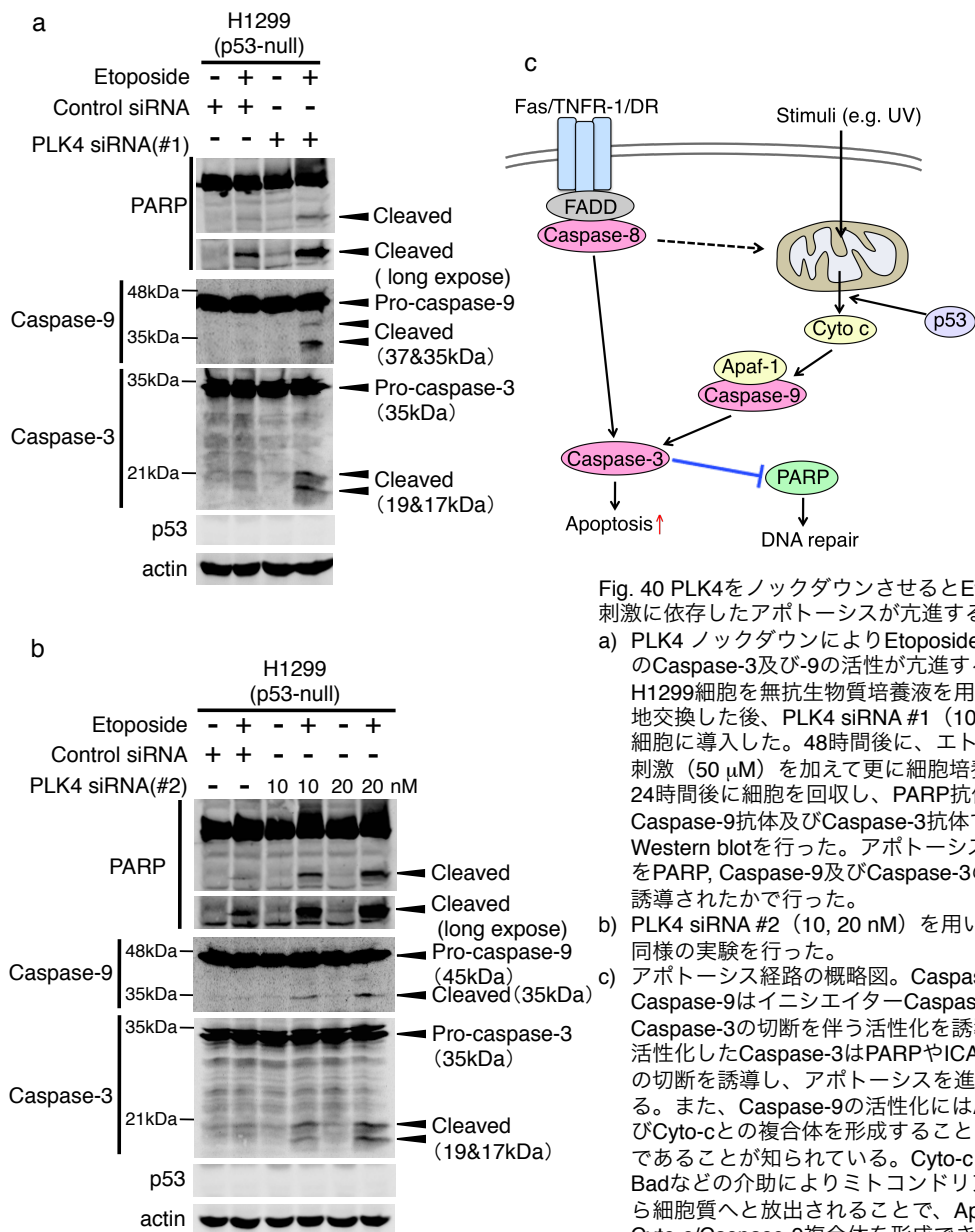


Fig. 40 PLK4をノックダウンさせるとEtoposide刺激に依存したアポトーシスが亢進する。

a) PLK4 ノックダウンによりEtoposide刺激時のCaspase-3及び-9の活性が亢進する。H1299細胞を無抗生物質培養液を用いて培地交換した後、PLK4 siRNA #1 (10 nM) を細胞に導入した。48時間後に、エトポシド刺激 (50 μ M) を加えて更に細胞培養した。24時間後に細胞を回収し、PARP抗体、Caspase-9抗体及びCaspase-3抗体でWestern blotを行った。アポトーシスの判定をPARP, Caspase-9及びCaspase-3の切断が誘導されたかで行った。

b) PLK4 siRNA #2 (10, 20 nM) を用いてa)と同様の実験を行った。

c) アポトーシス経路の概略図。Caspase-8及びCaspase-9はイニシエーターCaspaseとしてCaspase-3の切断を伴う活性化を誘導する。活性化したCaspase-3はPARPやICADなどの切断を誘導し、アポトーシスを進行させる。また、Caspase-9の活性化にはApaf-1及びCyto-cとの複合体を形成することが必要であることが知られている。Cyto-cはBax, Badなどの介助によりミトコンドリア内部から細胞質へと放出されることで、Apaf-1/Cyto-c/Caspase-9複合体を形成できるようになる。

3-結果

作用があると考えられる。以上を踏まえると、PLK4 は Caspase-9 の活性化に関与する経路を阻害することによりアポトーシスを抑制すると考えられる。

更に PLK4 のアポトーシス抑制機構の分子メカニズムを解明する実験を行った。Caspase-9 の活性化にはミトコンドリアから細胞質へ cyto c が流出することが必要である。cyto c の放出量は一般的に Bcl-2 ファミリー蛋白質 (Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-xL など) によって制御されている。そこで、まずこれら Bcl-2 ファミリー蛋白質が PLK4 によってリン酸化等に伴う制御を受けるか検証を行った。しかし、PLK4 による直接的なリン酸化は見られず、また PLK4 ノックダウンした場合でもこれらの Bcl-2 ファミリー蛋白質の発現量に変化は見られなかった (data not shown)。

次に、Caspase-9、Bcl-2 ファミリー蛋白質 (Bax 及び Bad) 及び FoxO 蛋白質を負に制御する AKT が、PLK4 による抗アポトーシス機構に関与するか検証を行った。そこで、PLK4 ノックダウン細胞にエトポシド刺激を加えた場合に AKT の活性化が低下するか 2 種類の AKT のリン酸化抗体 (P-T308 及び P-S473) を用いてウェスタンブロットを行った。その結果、コントロール細胞ではエトポシド刺激依存的に AKT の活性化 (T308 及び S473 のリン酸化) が観察されたのに対して、PLK4 ノックダウン細胞ではこうした AKT の活性化 (T308 及び S473 のリン酸化) が顕著に低下していた (Fig. 41a)。また Fig. 41a と同様のコンディションで調製した細胞を氷冷メタノールにより固定し、T308 残基に対する AKT リン酸化特異抗体により免疫染色を行った (Fig. 41b & c)。その結果、コントロール細胞ではエトポシド刺激依存的に活性化した AKT の核内への蓄積が見られたのに対して、PLK4 ノックダウン細胞ではこうしたストレス刺激に応答した AKT の核内へ蓄積は大きく低下していた。

DNA 損傷に伴い活性化型 AKT が核内に蓄積したことから、AKT が核内で標的分子をリン酸化している可能性が考えられた。そこで AKT の標的分子の 1 つである転写制御因子 Foxo4 のリン酸化状態に関してもウェスタンブロットにより検証した。その結果、コントロール細胞では AKT の活性化に伴い FoxO4 のリン酸化も観察されたのに対して、PLK4 ノックダウン細胞では AKT の不活性化と相関して FoxO4 のリン酸化もほとんど観察されなかった (Fig. 41a)。

FoxO ファミリー蛋白質は Fas 及び Bim の発現制御することによりアポトーシス誘導することが知られている。また、AKT により FoxO がリン酸化されると 14-3-3 によって核外へと輸送されるため、FoxO の転写能が低下することが報告されている。このため、個々までの結果を踏まえると、PLK4 は AKT の活性化を制御することにより、FoxO4 をリン酸化して核外排出を促進するため、Fas または Bim 発現誘導が低下しアポトーシスが低下すると考えられる。

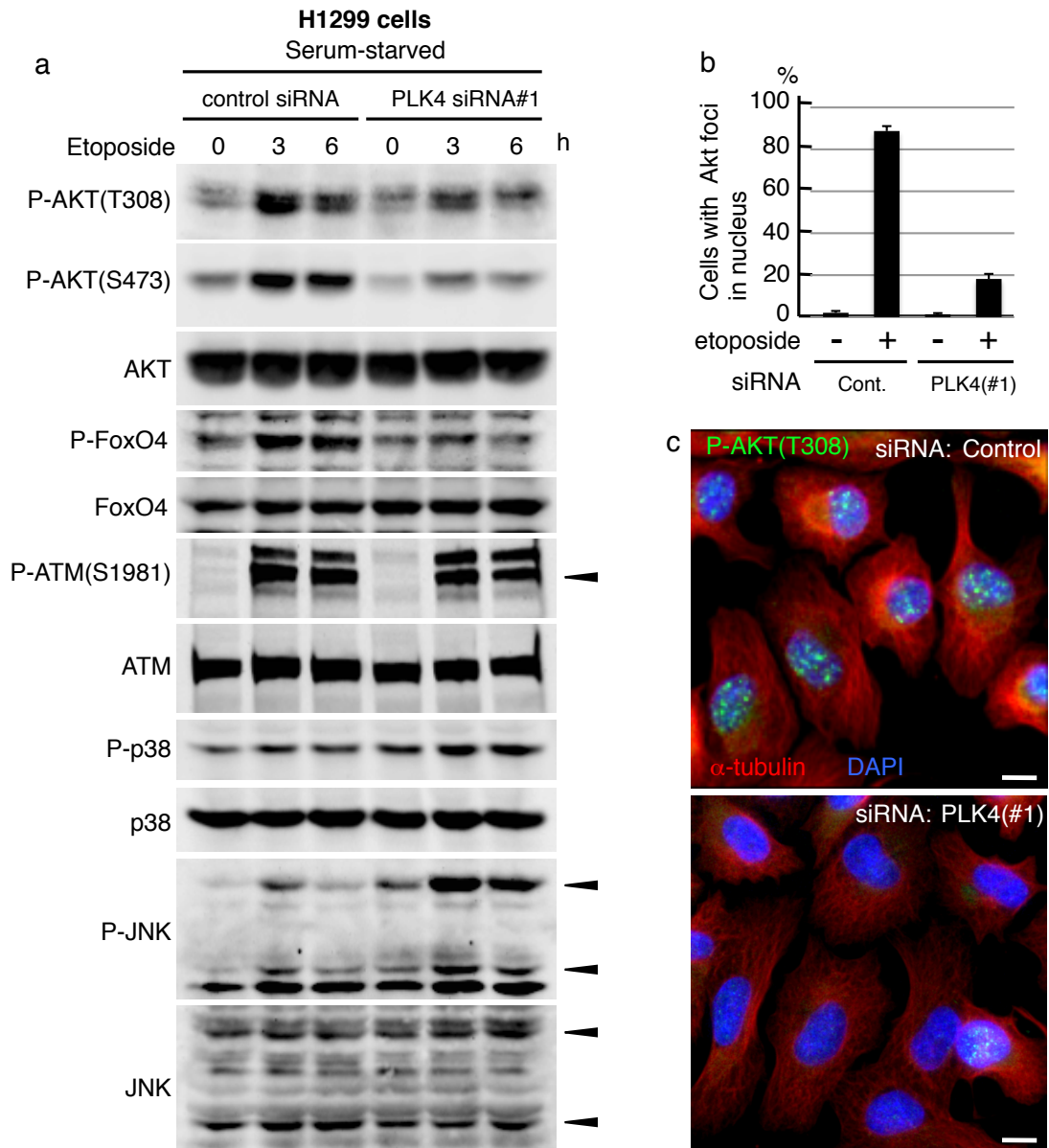


Fig. 41 PLK4はAKTの活性化を制御することによりアポトーシス抑制効果を示す。

- a) PLK4 はエトポシド刺激依存的なAKTの活性を制御する。H1299細胞を無抗生物質培養液を用いて培地交換した後、PLK4 siRNA #1 (10 nM) を細胞に導入した。48時間後に、無血清培養液に交換して細胞を培養した。16時間後にエトポシド刺激 (50 μ M) を加えて3及び6時間後に細胞を回収した。P-AKT(T308及びS473)抗体, P-Foxo1/4抗体, P-ATM(S1981)抗体, P-p38抗体及びP-JNK抗体でWestern blotを行った。
- b) PLK4はエトポシド刺激に見られるAKTの核内への集積を制御する。a)と同様の条件でPLK4ノックダウンH1299細胞を培養し、エトポシド刺激 (50 μ M, 3時間) を加えた。同細胞を氷冷メタノールで固定後、P-Akt(T308)抗体 (緑) 及び α -tubulin抗体 (赤) で免疫染色を行い、核内に集積する性型AKTの割合を調べた ($n \geq 200$)。また独立した実験を3回行い、SEMを算出した。核はDAPI染色 (青) した。
- c) b)の典型図。Scale barは10 μ m。

3-13 p53 と SAPK 経路は協調的に作用して中心体数の保全性を維持している (Fig. 42)。

これまでの実験結果から、1) p38/JNK が PLK4 依存的な中心体の過剰複製を阻害すること (Fig.31-36)、2) 更に p53 が PLK4 をダウンレギュレーションし、PLK4 活性の遷延化を阻止することが明らかとなった (Fig. 38)。従って p38/JNK と p53 は協調してストレス刺激時の中心体過剰複製を防ぎ、染色体安定性保持に重要な役割を果たしていると考えられる。興味深いことに p53 と SAPK 経路は、共に様々な癌において活性化消失が観察される。p53 はヒト全癌の約 50%において不活性型遺伝子変異が報告されと共に^{64,65}、パピローマウイルスなどの癌ウイルス由来蛋白質によりその機能が阻害されている⁷⁶。また、p38/JNK 経路の MAPKK である MKK4 も多くの癌細胞で不活性化されていることが知られている⁶。そこで p53 および p38/JNK 経路をそれぞれまたは同時に不活性化させた場合に中心体数の異常が惹起されるか検証する実験を行った。そこで、p53 を分解・不活化させるためにパピローマウイルス由来の E6 蛋白質を用いた⁷⁶。また、p38 及び JNK 経路は中心体数の維持に関与していることが明らかになったので (Fig. 31-36)、p38 及び JNK 両経路を不活性化させるためにドミナントネガティブ変異体 MKK4-S251N 及び N234I を用いた^{6,7} (Fig. 42d)。U2OS 細胞 (p53 野生型癌細胞) に HPV16-E6 及び Myc-MKK4(S251N or N234I)を遺伝子導入した。24 時間後にエトポシド刺激 (0.8 μ M) を加えた。8 時間後に培養液交換し、さらに 72 時間細胞を培養した。その結果、p53 及び p38/JNK 経路を同時に不活性化させると、エトポシド刺激によって中心体数の異常が惹起された (Fig. 42a-c)。しかし p53 または p38/JNK 経路いずれかを不活性化させた場合には、顕著な異常は観察されなかった。以上から、p53 及び p38/JNK 経路は協調的に作用することにより中心体数の保全性を維持していると考えられる。このため、p53 または p38/JNK 経路いずれかが失活した場合にはもう一方の作用によって中心体数の保全性は維持されるが、p53 及び p38/JNK 経路共に失活した場合に初めて中心体数の異常が惹起されることが考えられる。

3-結果

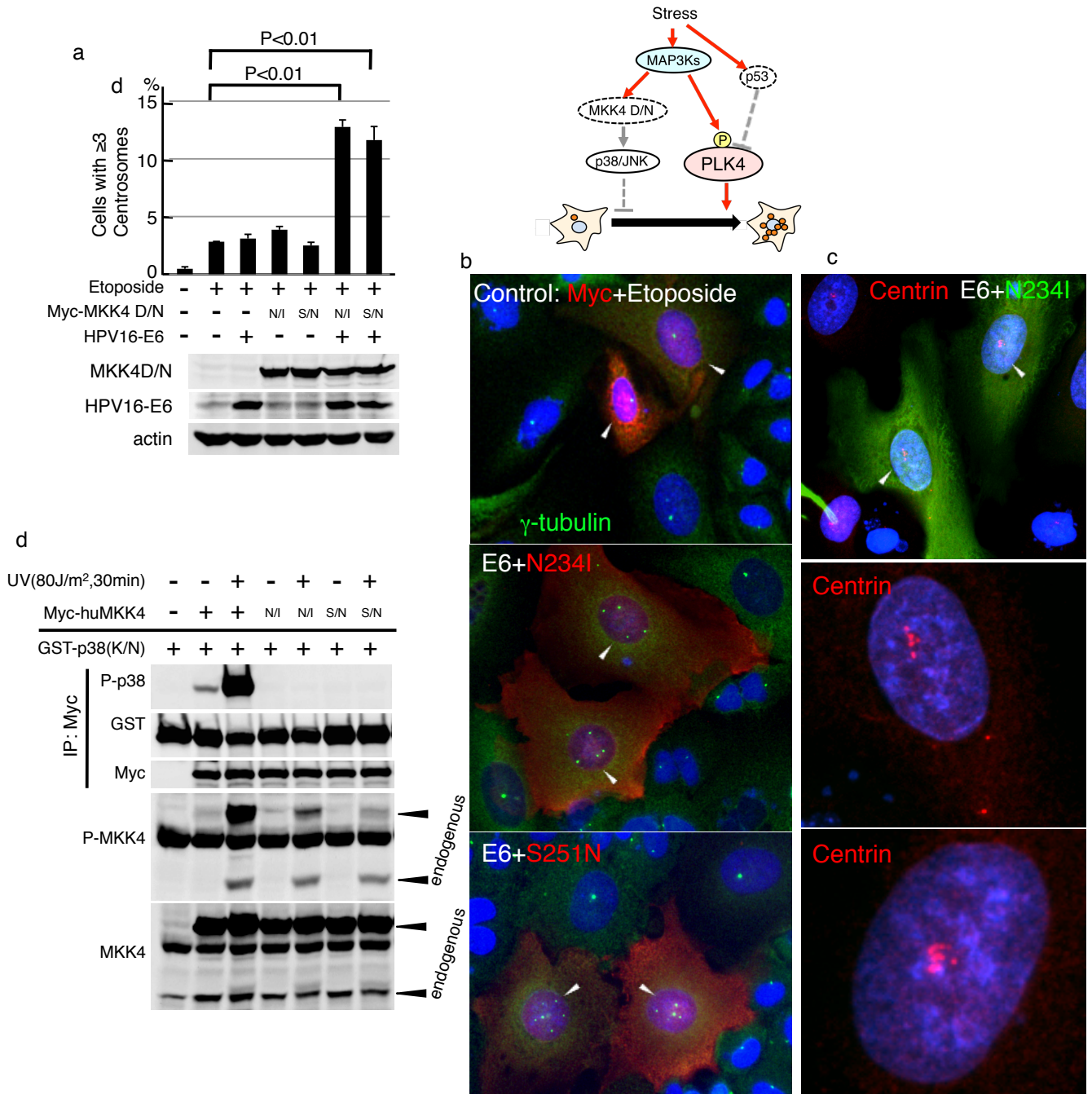


Fig. 42 PLK4はp53によって負の発現制御を受けており、p53及びp38/JNK経路の不活化により中心体数の異常が惹起される。

- a) E6によるp53の不活性化及びドミナントネガティブ変異体MKK4によるp38/JNK経路の不活性化により中心体数の異常が惹起される。パピローマウイルス蛋白質E6(Myc-HPV16-E6)及びドミナントネガティブ変異体Myc-MKK4(N234I又はS251N)をU2OS細胞(p53野生型癌細胞)に遺伝子導入した。24時間後に培養液交換を行い、エトポシド刺激(0.8 μ M)を37°C、8時間加えた。改めて培養液を交換し、72時間細胞を培養した。Myc抗体(赤)及び γ -tubulin抗体(緑)で免疫染色を行い、遺伝子導入された細胞(≥ 200)における中心体数の異常(≥ 3)を検証した。student t検定により有意差を検定した。Error barは標準誤差を表す。
- b) a)の典型図。Myc抗体(赤)及び γ -tubulin抗体(緑)で免疫染色を行った。核はDAPI染色(青)した。
- c) a)の典型図。Myc抗体(緑)及び中心小体マーカーであるCentrin抗体(赤)で免疫染色を行った。核はDAPI染色(青)した。
- d) MKK4(N234I及びS251N)は不活性化型変異体である。Myc-MKK4野生型又は変異体(N234I又はS251N)をそれぞれHEK293A細胞に遺伝子導入した。40時間後にUV刺激(80J/m², 30分)を加えた後に細胞を回収した。Myc抗体で免疫沈降した後、精製蛋白質GST-p38(K/N)及びATPを加えてin vitro kinase assayを行い、リン酸化p38抗体でウェスタンブロットをした(top panel)。また、lysateを用いてMKK4のリン酸化をモニターした(lower panel)。

3-14

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られないため、本章については、非公開

4-Discussion

4-考察

今回、MAP3Kの活性制御機構を研究する過程で、PLK4と相互作用することを見出し、MTK1を始めとするMAP3KがPLK4の活性化を制御することを明らかにした。MTK1を例に説明すると、無刺激時にはMTK1のキナーゼドメインはAIDに覆われているので不活性化状態になっている。しかしストレス刺激時にはAIDがキナーゼドメインから外れるためMTK1が活性化する(Fig. 6)。この解放されたキナーゼドメインを介してMTK1はPLK4と結合する。その結果、MTK1はPLK4の(活性化ループ内の)T170残基をリン酸化するためPLK4は活性化される。そしてキナーゼ活性の亢進したPLK4はさらにの自己リン酸化を誘導する(Fig. 25 & 26)。

インターネット公表に関する共著者全員の同意が得られないため、図については、非公開

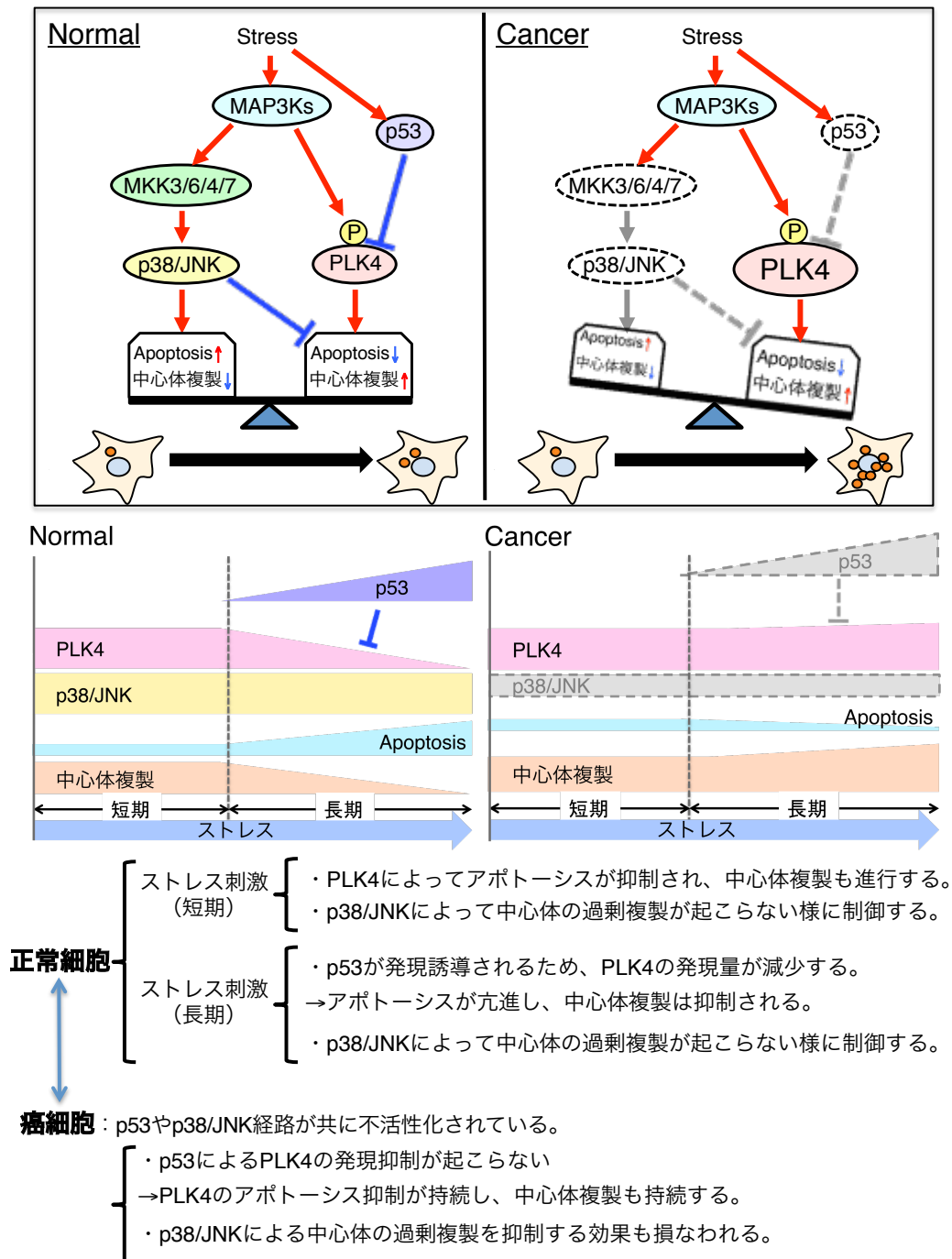


Fig. 46 MAPK経路 (p38/JNK) 、p53、PLK4による中心体複製制御のモデル図

また、ストレス環境下では PLK4, p38/JNK 経路, p53 が協調的に作用して中心体数が厳密に制御されていることを見出した (Fig. 31-38, 42 & 46)。正常な細胞ではストレス刺激によってストレス応答 MAP3K が活性化される。この結果 MAP3K により p38/JNK 経路及び PLK4 が活性化される。細胞が短期間ストレス刺激に曝された場合 DNA 修復などを行う必要があるため、PLK4 によってアポトーシスを一時的に抑制する。また p38/JNK 経路も同時に活性化されるため中心体複製そのものを阻害することにより中心体数の異常が起

こるのを防いでいる (Fig.31-36)。一方長期間ストレス刺激に曝された場合には、DNA 修復が困難になるため (p53 のユビキチン分解が停止することにより) p53 蛋白量が増加し PLK4 の蛋白質発現量を抑制する。この発現量の低下と共に PLK4 のアポトーシス抑制効果も低下するためアポトーシスが進行する。また、p38/JNK によりアポトーシス促進因子 (Bax, Bim, Bmf など) を活性化させることによりアポトーシスを進行させる。

多くの癌細胞では、p53 や p38/JNK 経路 (特に MKK4) が不活性化されている^{6,7,64}。このため、上記した様な p53 による PLK4 の発現抑制が起こらず PLK4 の発現量は一定に保たれる。PLK4 の発現が持続することと相関して PLK4 の持つアポトーシス抑制効果及び中心体複製能も維持されるため、本来プログラム死により排除されるべき細胞が生存する上に継続的な中心体複製が惹起される。さらに、p38/JNK 経路も不活性化されているため中心体の過剰複製が抑制されず、中心体数の異常 (≥ 3) を示す細胞が蓄積される。この結果、染色体の不均等分配も起こりやすくなり細胞の癌化が促進されと考えられる。

4-1 MAP3Ks と PLK4 が細胞質で結合する意味に関して

これまでの先行研究から MAP3K は細胞質、PLK4 は主に中心体に局在することが報告されている。このため、両分子の結合が細胞質で起こるのか、または中心体上で起こるのか検証する必要があった。そこで、両分子の結合を PLA (Proximity ligation assay) によって可視化したところ、細胞質で相互作用することを見出した (Fig.3&4)。しかし、MAP3K が細胞質に局在することは既に知られているのに対して、内在性 PLK4 が細胞質にどの程度存在するか不明であった。そこで、G2/M 期に同調させた HeLa 細胞を細胞画分して実際に細胞質に PLK4 が存在するか検証した。その結果、中心体を含む不溶性画分に PLK4 が存在するのが確認されたのに加えて、細胞質を含む可溶性画分にも PLK4 が存在することが明らかになった (Fig.24)。また、GFP-PLK4 を細胞に発現させて、中心体に局在する GFP-PLK4 をレーザーで退色させた上で蛍光の回復 (FRAP) をモニターしたところ、中心体に存在する PLK4 の約 20% が 20~30 秒ほどで中心体外から中心体へと流入することが先行研究結果から明らかになっている⁶⁸。以上を踏まえると、内在性の PLK4 は蛋白質量が微量であるため免疫染色などで観察すると中心体のみに局在するように考えられるが、実際には中心体以外にも細胞質に局在しており細胞質でストレス応答 MAP3K による活性制御を受けると考えられる。

4-2 p38/JNK が中心体数の異常を抑制するメカニズムに関して

今回 Δ MKK3/6/4/7 MEF を用いて PLK4 の過剰発現させた場合やエトポシド刺激を加えた場合に中心体数の異常が惹起されることが明らかになった (Fig.34 & 35)。また、こうした異常は活性型 MKK3/6 または p38 を導入することで一定の割合で抑制することができた。以上から、p38 には中心体数の異常を抑制する作用があると考えられる。次に p38 による過剰な中心体複製の抑制機構の解明を試みた。Fig.5 で言及した様に、p38 は MAPKAPK2 を活性化させることにより G2/M 期の進行を停止し¹⁸、また cyclin D1/CDK4 の活性を抑制することにより G1/S 期の進行を停止することが報告されている^{8,17,77}。このように p38 が細胞周期を G1 期または G2 期で停止させることで過剰な中心体複製が抑制されるのか、もしくは p38 が S 期における中心体複製を直接阻害するのか検証する必要がある。そこで、U2OS 細胞をアフィジコリン (DNA ポリメラーゼ α 阻害剤: DNA 複製は停止するが、中心体複製は停止しない) 処理により S 期に同調させた上で p38 が中心体複製を直接抑制するか検証を行った。その結果、U2OS 細胞にアフィジコリンを加えて長時間処理することによって中心体数の異常が惹起されたが、活性型 p38 を発現させた細胞ではこうした異常は抑制された (Fig. 33)。以上から、p38 は単に細胞周期を停止させるのではなく、S 期における中心体複製を直接抑制することで過剰な数の中心体が複製されないように制御していると考えられる。

これまでに p38 及び JNK が中心体に局在することを示唆する知見はあるが^{78,79}、両分子が直接中心体複製に関与することを示す論文は存在していない。そこで、今後さらに中心体複製の抑制機構における p38/JNK のエフェクター分子を同定する必要がある。今回の研究成果から中心体複製に関与する PLK4, SAS-6, SAS-4(CPAP), CP110, Cep135, Cep152 などの分子をリン酸化することで過剰な中心体複製を抑制すると考えられる。しかし、p38 は PLK4 の活性化を直接抑制することはなかったため、PLK4 以外の中心体構成蛋白質分子を標的のすると考えられる。

現在、p38/JNK の基質分子のスクリーニングを開始している。

4-3 PLK4 のストレス刺激によって活性化される意義に関して

今回の実験結果から、ストレス刺激に依存して PLK4 が MAP3K によって活性化されることが明らかになった (Fig. 29 & 30)。これまでの先行研究から PLK4 は中心体複製に関与することが知られているが、ストレス応答における機能に関しての報告はほとんど知られていない。しかし、今回 PLK4 ノックダウン H1299 (p53-null) 細胞では、コントロール細胞に比べてエトポシド刺激によるアポトーシス誘導が亢進することが明らかになった (Fig. 39 & 40)。このことから、PLK4 は中心体複製の制御以外に、アポトーシス抑制効

果があると考えられる。また、興味深いことに PLK4 ノックダウン H1299 細胞ではエトポシド刺激に応答して Caspase-3 及び-9 の活性化が検出された。このことから PLK4 は Caspase-9 の活性化に関与するシグナル伝達経路を抑制すると考えられる。

Caspase-9 は Apaf-1 とミトコンドリアから放出される cyto c が複合体 (アパプソーム) 形成することによって初めて Caspase-9 の切断/活性化が誘導される。PLK4 のアポトーシス抑制機序の一つとしてこのアパプソーム形成を阻害する可能性が考えられる。また別の作用機序として、PLK4 が Bax, Bad などの Bcl-2 ファミリー蛋白質と結合またはリン酸化することによりこれらの Bcl-2 ファミリー蛋白質の機能を阻害する可能性が考えられる。しかし、PLK4 が Bcl-2 ファミリー蛋白質 (Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-xL 等) を直接リン酸化する結果は得られず、また PLK4 をノックダウンした場合にこれらの Bcl-2 ファミリー蛋白質発現量にも変化は観察されなかった。このため、PLK4 のアポトーシス抑制機構における標的分子は Bcl-2 ファミリー蛋白質 (Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-xL 等) ではないと考えられる。

次に、AKT は Bax, Bad, Caspase-9 及び FoxO をリン酸化することによりアポトーシスを抑制することが知られているため、PLK4 の抗アポトーシスメカニズムに AKT が関与するか検証を行った (Fig.47a)。その結果、PLK4 ノックダウン細胞ではエトポシド刺激時における AKT の活性化 (T308 及び S473 のリン酸化) が低下することを見出した (Fig. 41a)。また、活性型 AKT (T308) の細胞内局在を観察してみると、コントロール細胞では DNA 損傷刺激に応答して核内への活性型 AKT の集積が見られたのに対して、PLK4 ノックダウン細胞ではこうした活性型 AKT の核集積が見られなくなった (Fig. 41b &c)。これらの結

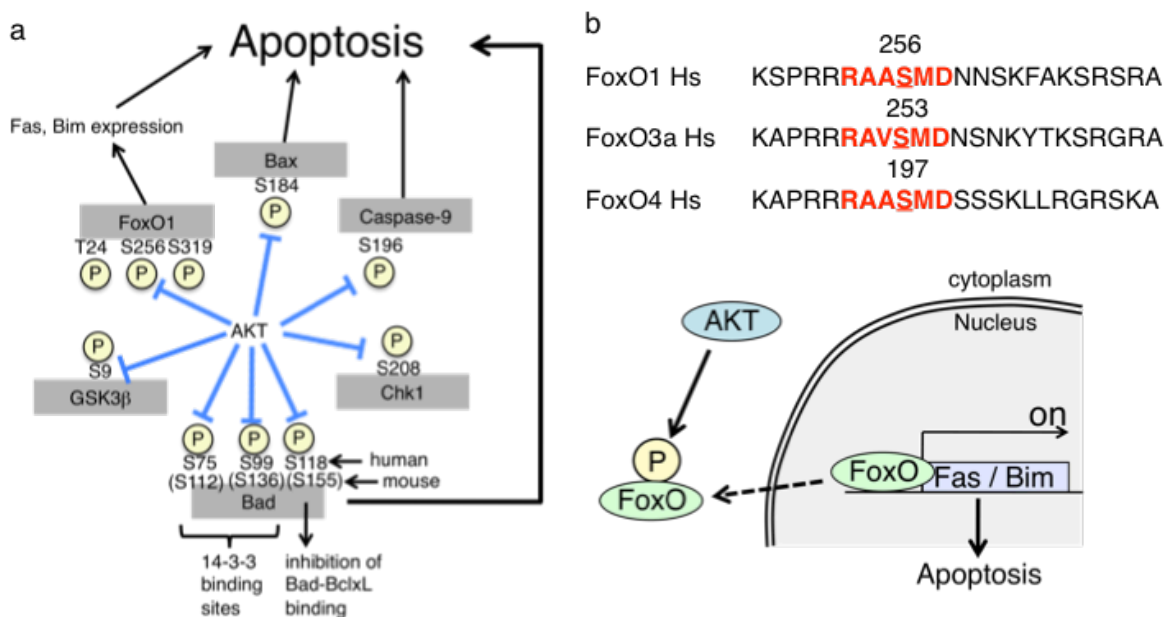


Fig. 47 AKTの標的分子

果から、PLK4 は DNA 損傷刺激に応答して AKT の活性化と核への集積を促進していることが明らかになった。

AKT の標的分子の中で、核内で作用する分子として FoxO ファミリー蛋白質が挙げられる。FoxO は転写因子として Fas, Bim, p27 などの発現に促進することが知られており、この結果アポトーシスや細胞周期停止が誘導されることが報告されている⁸⁰。この FoxO は Akt によってリン酸化されると 14-3-3 を介した核外輸送が亢進するため、転写因子としての機能が低下する (Fig. 47b)。今回の実験結果では、control siRNA を導入した H1299 細胞においてエトポシド刺激依存的に AKT が活性化され、その標的分子の 1 つである FoxO4 のリン酸化も亢進した (Fig. 41a)。一方、PLK4 ノックダウンではこうした AKT 及び FoxO4 のリン酸化は見られなかった。このことから、PLK4 は AKT の活性化を介して FoxO 依存的に誘導されるアポトーシスを抑制すると考えられる。

4-4 癌抑制遺伝子 MKK4 の中心体制御に関して

MKK4 遺伝子は 17 番染色体(17p11.2)に存在しており、MKK4 遺伝子と隣接する位置に p53 遺伝子も存在している。これらの遺伝子を含む領域は欠損などの変異が高頻度で起こることが知られている⁹。癌細胞 (特に原発性癌) において約 5% の頻度で MKK4 の driver-mutation が見つかっている⁶。その変異の多くがキナーゼドメイン (94-364aa) 内に集中しており、MKK4 のキナーゼ活性 (下流の JNK へのリン酸化) が低下または消失していることが報告されている⁷。このため、MKK4 は癌抑制遺伝子であると考えられている。実際、MKK4 を欠損した前立腺癌細胞 AT6.1 に MKK4 を遺伝子導入したところ、癌細胞の転移能が低下したことが報告されている⁹。また MKK4 を欠損した卵巣癌細胞 SKOV3ip.1 でも同様に MKK4 を遺伝子導入すると、癌細胞の転移能は低下した。このように MKK4 は癌抑制作用があると言えるが、その理由の一つとして MKK4 は p38 及び JNK 両分子を活性化できる唯一の MAPKK であり p38 及び JNK 経路を効率良く活性化しストレス応答することが挙げられる。MKK4 に上述した様な不活性型変異が蓄積すると p38 及び JNK への活性化が著しく阻害される。この結果、p38 及び JNK を介したストレス応答が抑制されるため、細胞にダメージが蓄積し癌化が進行すると考えられる。

今回の実験結果から、HPV16-E6⁷⁶により p53 を失活させ、また MKK4 のドミナントネガティブ (MKK4 DN) 変異体^{6,7}により p38 及び JNK の活性を抑制した場合にエトポシド刺激に依存して中心体数の異常が亢進した (Fig. 42)。しかし、p53 または p38/JNK いずれかの不活性化だけでは、中心体数の異常はほとんど観察されなかった。約半数の癌細胞で p53 は不活性化されているため、p53 による PLK4 の発現抑制が起らない。このた

め、p53 失活細胞では PLK4 によるアポトーシス抑制と中心体複製を阻害することができない (Fig. 38 & 40-41)。しかし、p38/JNK は活性化できるため、p38/JNK によって中心体の過剰複製は阻害される。このように p53 を失活させた場合でも p38/JNK の作用によって中心体数の保全性は維持される。また、p38/JNK が失活した場合には逆に p53 によって PLK4 の発現は抑制されるため、PLK4 を介する中心体複製は起こらなくなり中心体数の保全性は維持される。しかし、p53 及び p38/JNK 経路 (特に MKK4) が失活した場合には、p53 による PLK4 の発現抑制及び p38/JNK による中心体複製の抑制が共に起こらなくなるため中心体数の異常が惹起されると考えられる。

上記した様に MKK4 は p38 及び JNK 両経路を活性化できる唯一のキナーゼ分子として p38 及び JNK 両経路の活性化が迅速に起こる様に貢献している。このため、多くの癌細胞で MKK4 の不活性化 (driver mutation) が見られるのだと考えられる。また、MKK4 の癌抑制遺伝子としての機能は不明であったが、(p53 と協調的に作用して) p38/JNK を活性化して中心体の過剰複製を抑制することを今回明らかにした。

p53 が失活した細胞で、さらに MKK4 のドミナントネガティブ変異が起こることにより p38/JNK 活性が阻害され、ストレスによる中心体の複製異常さらに染色体の不安定性を惹起し、発癌と癌の悪性化が進行すると考えられている。

5-Experimental procedures

5-材料及び実験方法

5-1 Buffer

Lysis buffer は、20 mM Tris-HCl (pH7.5), 1% TritonX-100, 0.5% deoxycholate, 10% glycerol, 137 mM NaCl, 2mM EDTA, 54 mM β -glycerophosphate, 10 mM NaF, 2 mM sodium vanadate, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSP), 10 mg ml⁻¹ leupeptin, 10 mg ml⁻¹ aprotinin を加えて調製した。

Co-immunoprecipitation buffer は、20 mM Tris-HCl (pH7.5), 1% TritonX-100, 10% glycerol, 137 mM NaCl, 2 mM EDTA, 54 mM β -glycerophosphate, 10 mM NaF, 2 mM sodium vanadate, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSP), 10 mg ml⁻¹ leupeptin, 10 mg ml⁻¹ aprotinin を加えて調製した。

Kinase buffer は、25 mM Tris-HCl (pH7.5), 25 mM MgCl₂, 25 mM β -glycerophosphate, 0.5 mM sodium vanadate, 2 mM EGTA, 2 mM dithiothreitol を加えて作製した。

SDS-PAGE loading buffer は、65mM Tris-HCl (pH6.8), 5%(vol/vol) 2-mercaptoethanol, 3% SDS, 0.1% bromophenol blue, 10% glycerol を加えて調製した。

5-2 Plasmids

PLK4 は PCR かけることにより pcDNA4Myc, pcDNA3Flag 及び pEGFP (Clontech) ベクターにサブクローニングした。変異体は PCR mutagenesis により作製した。MTK1-N は Met22 から His1249 の領域を用い、MTK1-C は Arg1309 から Glu1607 (C 末端)の領域を用いた。ほ乳類発現プラスミドとして pMyc-MTK1, Myc-MTK1 (K/R), HA-ASK1, Myc-TAK1, HA-TAK1, Myc-TAK1(K63W), Myc-TAB1, Flag-MEKK1-C, Flag-MLK3, Flag-B-Raf(V600E), Flag-C-Raf-C, GADD45 β , Myc-GADD45 β , Flag-TRAF2, GST-Cdc42(V12), HA-MKK3^{EE}, HA-MKK3(K/N), HA-MKK6^{DD}, HA-MKK6(K/N), Myc-p38^{AS}, HA-p38^{AS}(AS = D176A/F327S), HA-p38, HA-p38(K/N), HA-JNK を用いた。MKK4 は PCR により pcDNA3HA vectors にサブクローニングした。ドミナントネガティブ変異体 MKK4 (S251N or N234I)は PCR により作製した。Myc-PLK4(K41M)及び Myc-PLK4(K41M/T170A)を pQCXIP (Invitrogen)にサブクローニングすることによりレトロウィルスベクターを作製した。HPV16E6 ベクターは清野透博士(国立癌センター)より供与して頂いた⁷⁶。HPV16E6 は splicing donor site に変異を導入することにより発現レベルを高めている。HPV16E6 が特異的に p53 に作用させるため、PDZ domain-binding motif の一部である L151 を欠損させた。

5-3 細胞培養

HEK293A 細胞、293FT 細胞、HeLa 細胞、U2OS 細胞、A549 細胞、H1299 細胞は 10% fetal bovine serum (FBS)、L-glutamate、penicillin-streptomycin を含む Dullbecco's modified Eagle medium (DMEM)(Glucose 1.0 g/L)を用いて培養した。また、MEF 細胞は 10% FBS、L-glutamate、penicillin-streptomycin を含む DMEM(Glucose 4.5 g/L)を用いて培養した。

5-4 Transient transfection

Effectene Transfection Reagent (QIAGEN)を用いて培養細胞への一過的遺伝子導入を行った。各細胞を 60 mm / 35 mm 培養皿で培養し、プラスミド DNA の合計量が 1 μ g / 60 mm または 0.4 μ g / 35 mm となるように調整した。

5-5 レトロウィルスを用いた安定発現細胞株の樹立

Myc-PLK4(K41M)または Myc-PLK4(K41MT170A)の安定発現 HEK293A 細胞は以下の手順で作製した。GP2-293 パッケージング細胞に VSV ベクターと共に pQCXIP Myc-PLK4 (レトロウィルスベクター)を Effectene Transfection Reagent (QIAGEN)を用いて遺伝子導入した。48 時間後、培養上清をフィルター (0.45 μ m) で濾過し、ポリブレンを終濃度 8 μ g/ml となるように添加した。このレトロウィルスを宿主細胞となる HEK293A 細胞に感染後、ピューロマイシン処理により目的の蛋白質を発現する細胞を選別した。

5-6 GST-PLK4 (K41M) 精製蛋白質の作製

pGEX-6p-1-GST-PLK4(K41M)を導入した大腸菌株 DH5 α のコロニーを LB/ampicillin 25 ml に添加し、37°Cで一晩培養した。この培養液を LB/ampicillin 225 ml に添加し 37°C 3 時間培養した。対数増殖期において IPTG (0.1 M) を添加し蛋白質の発現誘導を行った (30°C, 4 時間)。低速遠心 (3000 rpm, 15 分, 4°C) により大腸菌を回収し、GST buffer で懸濁した後、超音波により大腸菌を破碎した。ここに Triton X-100 を終濃 1%となるように添加し、高速遠心 (15000 rpm, 15 分, 4°C) により可溶性画分と不溶性画分を分離した。可溶性画分に GSH ビーズを添加後、4°Cで一晩回転培養した。TBST で 2 回、TBS で 3 回洗浄後、抽出 buffer {50 mM Tris(pH9.6), 10 mM Glutathione} を加えて目的蛋白質を抽出した。抽出行程は合計 4 回行った。

5-7 細胞画分

細胞を PBS, PHEM buffer (60 mM PIPES, 25 mM HEPES, 10 mM EDTA, 2 mM MgCl_2) の順で 1 回ずつ洗浄した。続いて PHEM buffer/1% Triton X-100 を加えた後、細胞を回収した。氷上に 10 分間置いた後、遠心 ($300\times g$, 10 分) により可溶性画分と不溶性画分に分けた。その後、可溶性画分に 9 倍容量の MeOH を加えて氷上に 1 時間置いた後、遠心 ($4,000\times g$, 10 分) により可溶性画分内の蛋白質を沈殿させ、sample buffer (SDS) を加えた。不溶性画分に関しても可溶性画分と等量の sample buffer を加えた。

5-8 標的蛋白質のノックダウン

・ siRNA による TAK1 及び PLK4 のノックダウン

60 mm 培養皿に Myc-PLK4 (K41M) 安定発現 HEK293A 細胞株を播種した。24 時間後に、TAK1 siRNA (QIAGEN) 及びコントロール siRNA (Allstars Negative siRNA, QIAGEN) を 40 pmol/well になるように Myc-PLK4(K41M) 安定発現細胞株に Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) を用いて導入した。48 時間後、培地交換し、さらに 48 時間後に実験に用いた。

PLK4 siRNA (QIAGEN) に関しては、60 mm 培養皿に播種した HeLa 細胞に 30 pmol/well になるように加えて 72 時間細胞培養した。

今回使用した siRNA を以下に示す。

- ・ si-TAK1#1: 5'-AAAGCGUUAUUGUAGAGCUUdTdT-3'
- ・ si-TAK1#2: 5'-CCCGUGUGAACCAUCCUAAUAdTdT-3'
- ・ si-TAK1#3: 5'-AACGGACAGCCAAGACGUAGAdTdT-3'
- ・ si-PLK4#1: 5'-AAGGACUUGGUCUUACAACUAdTdT-3'
- ・ si-PLK4#2: 5'-GGACCUUAUUCACCAGUUAAdTdT-3'

・ shRNA による MKK4 及び MKK7 のノックダウン

MKK4 shRNA 及び MKK7 shRNA を作製し、これらをレトロウィルスベクター pQCXIP にクローニングした。pQCXIP MKK4 shRNA 及び pQCXIP MKK7 shRNA を pVSV と共にパッケージング細胞 GP2-293 細胞に遺伝子導入してレトロウィルスを作製した。このウィルスを MKK3/6^{-/-} MEF 細胞に感染させ、ピューロマイシンで shRNA が発現している細胞のみを選別した。その後、サブクローニングを行い、MKK4 及び MKK7 が共に効率良くノックダウンされた細胞を選別した。同様の手順で MKK3/6^{-/-}, MKK4 ノックダウン MEF も作製した。

今回使用した shRNA を以下に示す。

・ shMKK4:

5'-gatccccATGTCTACCTCGTTTCGATAttcaagagaTATCGAACGAGGTAGACATttttta-3'

・ shMKK7:

5'-gatccccGTGAGATACTCGAGGTGGATttcaagagaATCCACCTCGAGTATCTCAttttta-3'

5-9 ウェスタンブロッティング

ウェスタンブロットによる解析は、LAS-1000 Plus (Fujifilm) を用いて行った。今回、実験に用いた抗体は以下の通りである。

Myc mouse mAb (Santa cruz, 9E10)、Myc rabbit pAb (Santa cruz)、Myc mouse mAb (cell signaling, 9B11)、Flag mouse mAb (Sigma, M2)、HA mouse mAb (Santa cruz, F-7)、HA rat mAb (Roche, 3F10)、HA mouse mAb (cell signaling, 6E2)、GST mouse mAb (Santa cruz, B-14)、GFP mouse mAb (Santa cruz, B-2)、MKK4 rabbit pAb (Santa cruz, H-98)、MKK7 rabbit pAb (cell signaling)、MKK3/6 rabbit pAb (Santa cruz)、MEK1 mouse mAb (Santa cruz, H-8)、GADD45 β goat pAb (Santa cruz, N-19)、p38 rabbit pAb (Santa cruz)、JNK rabbit pAb (Santa cruz)、ERK1 rabbit pAb (Santa cruz, K-23)、TAK1 rabbit pAb (Sigma)、p53 mouse mAb (Santa cruz, DO-1)、phospho-MKK4 rabbit pAb (cell signaling)、phospho-MKK3/6 rabbit pAb (cell signaling)、phospho-MEK1/2 rabbit pAb (cell signaling)、phospho-p38 rabbit pAb (cell signaling)、phospho-JNK rabbit pAb (cell signaling)、phospho-ERK rabbit pAb (cell signaling)、phospho-MAPKAPK2 rabbit pAb (cell signaling)、phospho-c-jun rabbit pAb (cell signaling)、phospho-Aurora A/B/C rabbit mAb (cell signaling, D13A11)、phospho-PLK1 mouse mAb (Abcam, 2A3)、PLK1 mouse mAb (Zymed, 35-206)、PLK4 rabbit pAb (cell signaling)、Actin mouse mAb (Thermo, ACTN05)、Cyclin B1 mouse mAb (MBL, V152)、 α -tubulin mouse mAb (Sigma, B-5-1-2)、Centrin mouse mAb IgG2 κ (Millipore, 20H5)、PARP rabbit pAb (Roche)、Caspase-3 rabbit pAb (cell signaling)、Caspase-9 mouse mAb IgG1 κ (MBL, 5B4)。

リン酸化 (T170) PLK4 抗体の作製は、リン酸化ペプチドの設計を行った後、ペプチド合成及び抗体作製はスクラム社に受託した。

α -tubulin 及び cyclin B1 抗体は 1:10000 で、PARP 抗体は 1:3000 で使用した。その他の抗体は 1:1000 で使用した。

5-10 Co-immunoprecipitation assay

co-immunoprecipitation buffer を用いて作製した細胞可溶液に Protein G-セファロースビーズを加えて 1 時間 (4℃) 非特異的に結合する蛋白質を除去した。このビーズを除去後、改めて標的蛋白質に対する抗体を固定した Protein G-セファロースビーズを加えて 5 時間 (4℃) 抗原抗体反応を誘導した。遠心により免疫沈降物を回収して co-immunoprecipitation buffer で 4 回洗浄した後、SDS-PAGE にかけた。

5-11 *In vitro* kinase assay

Lysis buffer を用いて作製した細胞可溶液に標的蛋白質に対する抗体を加えて 4 時間 (4℃) 抗原抗体反応を誘導した。次に Protein G-セファロースビーズを加えて 1 時間 (4℃) 置き、免疫沈降物を回収後、Lysis buffer (500 mM NaCl) で 2 回、Lysis buffer で 2 回、kinase buffer で 2 回洗浄した。kinase buffer を加えて再懸濁した後、基質としてリコンビナント蛋白質 GST-PLK4-K41M または α -casein を加え、最後に γ -³²P-ATP を加えてリン酸化反応を誘導した。リン酸基の取り込みはオートラジオグラフィーにより検出した。

5-12 Phosphatase assay

Flag-MTK1-C 及び Myc-PLK4 を 293FT 細胞に遺伝子導入した。免疫沈降により Myc-PLK4 を回収し、Calf intestine alkaline phosphatase (CIAP) (54.9 units / sample) を加えて 25℃、30 分脱リン酸化反応を誘導した。phosphatase 阻害剤として、25 mM β -glycerophosphate, 25 mM NaF, 2 mM sodium vanadate を用いた。

5-13 免疫染色

PBS で 2 回洗浄後、冷却した MeOH で 10 分間処理し、細胞を固定した。PBS で 2 回洗浄後、0.1% Triton X-100 で 5 分間処理することで、細胞膜に透過処理をした。冷却した PBS で洗浄後、BlockAce (雪印) で 1 時間ブロッキングした。PBS で 2 回洗浄後、1 次抗体/2% BSA-PBS を加え 50 分間室温に置いた。冷却した PBS で 4 回洗浄後、蛍光標識 2 次抗体/2% BSA-PBS を加え遮光状態で 30 分間室温に置いた。冷却した PBS で 4 回洗浄後、DAPI/PBS (終濃度 0.025 μ g/ml) を加え遮光状態で 10 分間室温に置いた。PBS で 2 回及び精製水で 1 回洗浄後、FluorSave (Calbiochem) によりカバーガラスをマウントし、蛍光顕微鏡で細胞内局在を観察した。

今回、実験に用いた抗体は以下の通りである。

・1 次抗体: PLK4 rabbit pAb (cell signaling)、Myc mouse mAb IgG1 (Santa cruz, 9E10)、

Myc mouse mAb IgG2 α (cell signaling, 9B11)、Myc rabbit pAb IgG (Santa cruz, A-14)、HA mouse mAb IgG1 (cell signaling, 6E2)、 γ -tubulin mouse mAb IgG1 (Sigma, GTU-88)、Pericentrin mouse mAb IgG (Abcam, mAbcam 28144)、Centrin mouse mAb IgG2 α κ (Millipore, 20H5)、

- ・2次抗体：Cy2-conjugated Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson)、Dylighy488-conjugated Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson)、Alexa Fluor 568 anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen)、Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen)、Alexa Fluor 488 anti-mouse IgG1 (Invitrogen)、Alexa Fluor 568 anti-mouse IgG2a (Invitrogen)、

5-14 Proximity ligation assay (PLA)

PBS で2回洗浄後、冷却した MeOH で10分間処理し、細胞を固定した。PBS で2回洗浄後、0.1% Triton X-100 で5分間処理することで、細胞膜に透過処理をした。冷却した PBS で洗浄後、ブロッキング液(Olink)を加えて 37℃に30分間置いた。ブロッキング液を除いた後1次抗体を加えて1時間(37℃)置き、TBS-T で2回洗浄した後、PLA probe を含む2次抗体を加えて1時間(37℃)置いた。続いて、Ligation 液を加えて30分(37℃)、ポリメラーゼを含む増幅液を加えて100分(37℃)置いた。増幅反応終了後、段階希釈した SSC で洗浄しサンプル内の塩濃度を下げ、70% EtOH で洗浄後サンプルを完全に乾燥させた。最後に、DAPI を含む mounting 液を加えて上からカバーガラスを被せた。

今回用いた1次抗体及び2次抗体は以下の通りである。

- 1次抗体：Flag mouse mAb IgG1 (Sigma, M2)、Myc mouse mAb IgG1 (Santa cruz, 9E10)、Myc rabbit pAb IgG (Santa cruz, A-14)、TAK1 rabbit pAb (Sigma)、
- 2次抗体： anti-mouse Minus (onlink)、anti-rabbit Plus (onlink)

5-15 蛍光顕微鏡観察法

蛍光顕微鏡画像は、Photometrics Cool-SNAP-HQ CCD カメラ内蔵 Nikon TE2000-E 顕微鏡 (Molecular Devices) または BZ-9000 蛍光顕微鏡 (Keyence) で撮影した。

5-16 フローサイトメトリー

MEF をエトポシド (0.4 μ M, 8時間) で処理した後、新たな培養液を加えて2日間細胞培養した。細胞をトリプシン処理して PBS で洗浄後、70%エタノールで一晩固定した (-20℃)。PBS で洗浄後、propidium iodide (PI) 染色を遮光下で30分行った。細胞を cell-strainer に通した上で Guava PCA (Millipore) に導入し、1細胞あたりの DNA 量を算出した。

5-17 統計解析

各実験を独立して3回行い、平均値とSE（標準誤差）を算出した。2種類の異なる平均値間の統計学的有意差は、Student t 検定により検証した。

6-Acknowledgments

6-謝辞

本研究を遂行するにあたり、指導教員として懇切丁寧な御指導と御鞭撻を賜った斎藤春雄教授に深謝を申し上げます。

多様な実験技術と活発な議論を賜り、また親身になって御指導と御鞭撻を賜った武川睦寛教授に深く感謝を申し上げます。

MKK3/6-/- MEF 細胞を供与して頂いた Roger Davis 博士 (University of Massachusetts Medical School, Worcester) に感謝の意を表します。

また、pLRHL-16E6 を供与して頂いた清野透博士 (国立がん研究センター) に感謝の意を表します。

活発な議論と御支援を頂いた東京大学医科学研究所・分子細胞情報分野及び名古屋大学環境医学研究所・分子シグナル制御分野の方々に感謝の意を表します。

最後に、これまでの学生生活を陰に陽に心身共に支えて頂いた家族に感謝を申し上げます。

7-References

7-参考文献

- 1 Davis, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**, 239-252 (2000).
- 2 Avruch, J. MAP kinase pathways: the first twenty years. *Biochim Biophys Acta* **1773**, 1150-1160 (2007).
- 3 Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Tournier, C., Yasuda, J. & Davis, R. J. A mammalian scaffold complex that selectively mediates MAP kinase activation. *Science* **281**, 1671-1674 (1998).
- 4 Remenyi, A., Good, M. C., Bhattacharyya, R. P. & Lim, W. A. The role of docking interactions in mediating signaling input, output, and discrimination in the yeast MAPK network. *Mol Cell* **20**, 951-962 (2005).
- 5 Takekawa, M., Tatebayashi, K. & Saito, H. Conserved docking site is essential for activation of mammalian MAP kinase kinases by specific MAP kinase kinase kinases. *Mol Cell* **18**, 295-306 (2005).
- 6 Greenman, C. *et al.* Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* **446**, 153-158 (2007).
- 7 Kan, Z. *et al.* Diverse somatic mutation patterns and pathway alterations in human cancers. *Nature* **466**, 869-873 (2010).
- 8 Brancho, D. *et al.* Mechanism of p38 MAP kinase activation in vivo. *Genes Dev* **17**, 1969-1978 (2003).
- 9 Whitmarsh, A. J. & Davis, R. J. Role of mitogen-activated protein kinase kinase 4 in cancer. *Oncogene* **26**, 3172-3184 (2007).
- 10 Lei, K. & Davis, R. J. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 2432-2437 (2003).
- 11 Kim, B. J., Ryu, S. W. & Song, B. J. JNK- and p38 kinase-mediated phosphorylation of Bax leads to its activation and mitochondrial translocation and to apoptosis of human hepatoma HepG2 cells. *J Biol*

-
- Chem* **281**, 21256-21265 (2006).
- 12 Yamamoto, K., Ichijo, H. & Korsmeyer, S. J. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol* **19**, 8469-8478 (1999).
 - 13 Fan, M. *et al.* Vinblastine-induced phosphorylation of Bcl-2 and Bcl-XL is mediated by JNK and occurs in parallel with inactivation of the Raf-1/MEK/ERK cascade. *J Biol Chem* **275**, 29980-29985 (2000).
 - 14 Tsuruta, F. *et al.* JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J* **23**, 1889-1899 (2004).
 - 15 Ventura, J. J., Kennedy, N. J., Flavell, R. A. & Davis, R. J. JNK regulates autocrine expression of TGF-beta1. *Mol Cell* **15**, 269-278 (2004).
 - 16 Casanovas, O. *et al.* Osmotic stress regulates the stability of cyclin D1 in a p38SAPK2-dependent manner. *J Biol Chem* **275**, 35091-35097 (2000).
 - 17 Bulavin, D. V. *et al.* Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. *Nat Genet* **36**, 343-350 (2004).
 - 18 Manke, I. A. *et al.* MAPKAP kinase-2 is a cell cycle checkpoint kinase that regulates the G2/M transition and S phase progression in response to UV irradiation. *Mol Cell* **17**, 37-48 (2005).
 - 19 Bulavin, D. V. & Fornace, A. J., Jr. p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor. *Adv Cancer Res* **92**, 95-118 (2004).
 - 20 Zheng, H. *et al.* The prolyl isomerase Pin1 is a regulator of p53 in genotoxic response. *Nature* **419**, 849-853 (2002).
 - 21 Zacchi, P. *et al.* The prolyl isomerase Pin1 reveals a mechanism to control p53 functions after genotoxic insults. *Nature* **419**, 853-857 (2002).
 - 22 Takekawa, M., Posas, F. & Saito, H. A human homolog of the yeast Ssk2/Ssk22 MAP kinase kinase kinases, MTK1, mediates stress-induced activation of the p38 and JNK pathways. *EMBO J* **16**, 4973-4982 (1997).

-
- 23 Gerwins, P., Blank, J. L. & Johnson, G. L. Cloning of a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MEKK4, that selectively regulates the c-Jun amino terminal kinase pathway. *J Biol Chem* **272**, 8288-8295 (1997).
- 24 Miyake, Z., Takekawa, M., Ge, Q. & Saito, H. Activation of MTK1/MEKK4 by GADD45 through induced N-C dissociation and dimerization-mediated trans autophosphorylation of the MTK1 kinase domain. *Mol Cell Biol* **27**, 2765-2776 (2007).
- 25 Saitoh, M. *et al.* Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J* **17**, 2596-2606 (1998).
- 26 Yamaguchi, K. *et al.* Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science* **270**, 2008-2011 (1995).
- 27 Shibuya, H. *et al.* TAB1: an activator of the TAK1 MAPKKK in TGF-beta signal transduction. *Science* **272**, 1179-1182 (1996).
- 28 Ganem, N. J., Godinho, S. A. & Pellman, D. A mechanism linking extra centrosomes to chromosomal instability. *Nature* **460**, 278-282 (2009).
- 29 Thompson, S. L., Bakhoum, S. F. & Compton, D. A. Mechanisms of chromosomal instability. *Curr Biol* **20**, R285-295 (2010).
- 30 Andersen, J. S. *et al.* Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature* **426**, 570-574 (2003).
- 31 Kleylein-Sohn, J. *et al.* Plk4-induced centriole biogenesis in human cells. *Dev Cell* **13**, 190-202 (2007).
- 32 Strnad, P. & Gonczy, P. Mechanisms of procentriole formation. *Trends Cell Biol* **18**, 389-396 (2008).
- 33 Habedanck, R., Stierhof, Y. D., Wilkinson, C. J. & Nigg, E. A. The Polo kinase Plk4 functions in centriole duplication. *Nat Cell Biol* **7**, 1140-1146 (2005).
- 34 Bond, J. *et al.* A centrosomal mechanism involving CDK5RAP2 and CENPJ controls brain size. *Nat Genet* **37**, 353-355 (2005).

-
- 35 Kalay, E. *et al.* CEP152 is a genome maintenance protein disrupted in Seckel syndrome. *Nat Genet* **43**, 23-26 (2011).
- 36 Nigg, E. A. & Raff, J. W. Centrioles, centrosomes, and cilia in health and disease. *Cell* **139**, 663-678 (2009).
- 37 Nigg, E. A. & Stearns, T. The centrosome cycle: Centriole biogenesis, duplication and inherent asymmetries. *Nat Cell Biol* **13**, 1154-1160 (2011).
- 38 Kitagawa, D. *et al.* Structural basis of the 9-fold symmetry of centrioles. *Cell* **144**, 364-375 (2011).
- 39 van Breugel, M. *et al.* Structures of SAS-6 suggest its organization in centrioles. *Science* **331**, 1196-1199 (2011).
- 40 Spektor, A., Tsang, W. Y., Khoo, D. & Dynlacht, B. D. Cep97 and CP110 suppress a cilia assembly program. *Cell* **130**, 678-690 (2007).
- 41 Schmidt, T. I. *et al.* Control of centriole length by CPAP and CP110. *Curr Biol* **19**, 1005-1011 (2009).
- 42 Sunkel, C. E. & Glover, D. M. polo, a mitotic mutant of *Drosophila* displaying abnormal spindle poles. *J Cell Sci* **89** (Pt 1), 25-38 (1988).
- 43 Fenton, B. & Glover, D. M. A conserved mitotic kinase active at late anaphase-telophase in syncytial *Drosophila* embryos. *Nature* **363**, 637-640 (1993).
- 44 Winkles, J. A. & Alberts, G. F. Differential regulation of polo-like kinase 1, 2, 3, and 4 gene expression in mammalian cells and tissues. *Oncogene* **24**, 260-266 (2005).
- 45 Strebhardt, K. & Ullrich, A. Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **6**, 321-330 (2006).
- 46 Carvalho-Santos, Z. *et al.* Stepwise evolution of the centriole-assembly pathway. *J Cell Sci* **123**, 1414-1426 (2010).
- 47 Elia, A. E. *et al.* The molecular basis for phosphodependent substrate targeting and regulation of Plks by the Polo-box domain. *Cell* **115**, 83-95 (2003).
- 48 Elia, A. E., Cantley, L. C. & Yaffe, M. B. Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. *Science* **299**, 1228-1231 (2003).

-
- 49 Barr, F. A., Sillje, H. H. & Nigg, E. A. Polo-like kinases and the orchestration of cell division. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 429-440 (2004).
- 50 Oshimori, N., Ohsugi, M. & Yamamoto, T. The Plk1 target Kizuna stabilizes mitotic centrosomes to ensure spindle bipolarity. *Nat Cell Biol* **8**, 1095-1101 (2006).
- 51 Alexander, J. *et al.* Spatial exclusivity combined with positive and negative selection of phosphorylation motifs is the basis for context-dependent mitotic signaling. *Sci Signal* **4**, ra42 (2011).
- 52 van Vugt, M. A., Bras, A. & Medema, R. H. Polo-like kinase-1 controls recovery from a G2 DNA damage-induced arrest in mammalian cells. *Mol Cell* **15**, 799-811 (2004).
- 53 Bassermann, F. *et al.* The Cdc14B-Cdh1-Plk1 axis controls the G2 DNA-damage-response checkpoint. *Cell* **134**, 256-267 (2008).
- 54 Rogers, G. C., Rusan, N. M., Roberts, D. M., Peifer, M. & Rogers, S. L. The SCF Slimb ubiquitin ligase regulates Plk4/Sak levels to block centriole reduplication. *J Cell Biol* **184**, 225-239 (2009).
- 55 Cunha-Ferreira, I. *et al.* The SCF/Slimb ubiquitin ligase limits centrosome amplification through degradation of SAK/PLK4. *Curr Biol* **19**, 43-49 (2009).
- 56 Holland, A. J., Lan, W., Niessen, S., Hoover, H. & Cleveland, D. W. Polo-like kinase 4 kinase activity limits centrosome overduplication by autoregulating its own stability. *J Cell Biol* **188**, 191-198 (2010).
- 57 Strebhardt, K. Multifaceted polo-like kinases: drug targets and antitargets for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 643-660 (2010).
- 58 Swallow, C. J., Ko, M. A., Siddiqui, N. U., Hudson, J. W. & Dennis, J. W. Sak/Plk4 and mitotic fidelity. *Oncogene* **24**, 306-312 (2005).
- 59 Archambault, V. & Glover, D. M. Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 265-275 (2009).
- 60 Ko, M. A. *et al.* Plk4 haploinsufficiency causes mitotic infidelity and carcinogenesis. *Nat Genet* **37**, 883-888 (2005).
- 61 Rodrigues-Martins, A., Riparbelli, M., Callaini, G., Glover, D. M. & Bettencourt-Dias, M. Revisiting the role of the mother centriole in

- centriole biogenesis. *Science* **316**, 1046-1050 (2007).
- 62 Pelletier, L., O'Toole, E., Schwager, A., Hyman, A. A. & Muller-Reichert, T. Centriole assembly in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **444**, 619-623 (2006).
- 63 Bettencourt-Dias, M. *et al.* SAK/PLK4 is required for centriole duplication and flagella development. *Curr Biol* **15**, 2199-2207 (2005).
- 64 Brosh, R. & Rotter, V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer* **9**, 701-713 (2009).
- 65 Petitjean, A. *et al.* Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* **28**, 622-629 (2007).
- 66 Huangfu, W. C., Omori, E., Akira, S., Matsumoto, K. & Ninomiya-Tsuji, J. Osmotic stress activates the TAK1-JNK pathway while blocking TAK1-mediated NF-kappaB activation: TAO2 regulates TAK1 pathways. *J Biol Chem* **281**, 28802-28810 (2006).
- 67 Soderberg, O. *et al.* Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods* **3**, 995-1000 (2006).
- 68 Cizmecioglu, O. *et al.* Cep152 acts as a scaffold for recruitment of Plk4 and CPAP to the centrosome. *J Cell Biol* **191**, 731-739 (2010).
- 69 Hudson, J. W. *et al.* Late mitotic failure in mice lacking Sak, a polo-like kinase. *Curr Biol* **11**, 441-446 (2001).
- 70 Sillibourne, J. E. *et al.* Autophosphorylation of polo-like kinase 4 and its role in centriole duplication. *Mol Biol Cell* **21**, 547-561 (2010).
- 71 Sato, S. *et al.* Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol* **6**, 1087-1095 (2005).
- 72 Ninomiya-Tsuji, J. *et al.* A resorcylic acid lactone, 5Z-7-oxozeaenol, prevents inflammation by inhibiting the catalytic activity of TAK1 MAPK kinase kinase. *J Biol Chem* **278**, 18485-18490 (2003).
- 73 Diskin, R., Askari, N., Capone, R., Engelberg, D. & Livnah, O. Active mutants of the human p38alpha mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **279**, 47040-47049 (2004).

-
- 74 Martin, B. T. & Strebhardt, K. Polo-like kinase 1: target and regulator of transcriptional control. *Cell Cycle* **5**, 2881-2885 (2006).
 - 75 Li, J. *et al.* SAK, a new polo-like kinase, is transcriptionally repressed by p53 and induces apoptosis upon RNAi silencing. *Neoplasia* **7**, 312-323 (2005).
 - 76 Kiyono, T. *et al.* Binding of high-risk human papillomavirus E6 oncoproteins to the human homologue of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 11612-11616 (1997).
 - 77 Xiu, M. *et al.* The transcriptional repressor HBP1 is a target of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in cell cycle regulation. *Mol Cell Biol* **23**, 8890-8901 (2003).
 - 78 Cha, H., Wang, X., Li, H. & Fornace, A. J., Jr. A functional role for p38 MAPK in modulating mitotic transit in the absence of stress. *J Biol Chem* **282**, 22984-22992 (2007).
 - 79 MacCorkle-Chosnek, R. A., VanHooser, A., Goodrich, D. W., Brinkley, B. R. & Tan, T. H. Cell cycle regulation of c-Jun N-terminal kinase activity at the centrosomes. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 173-180 (2001).
 - 80 van der Horst, A. & Burgering, B. M. Stressing the role of FoxO proteins in lifespan and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 440-450 (2007).