Aurora A阻害性ペプチドの開発

愛知県がんセンター研究所　発がん制御研究部
後藤　英仁

１．　はじめに　目的

Aurora Aは、癌などの疾患で異常発現していることが知られている分裂期キナーゼの一つで、中心体に局在していることが知られている。我々のグループは、RPE1細胞（ヒト網膜色素上皮細胞株）で、Aurora Aをノックダウンすると、一次繊毛（Primary Cilium）が形成され、G0/G1移行期に細胞周期が停止することを見出した。しかしながら、HeLa細胞（子宮頸部癌細胞）においては、このような一次繊毛の形成能が著しく低いため、Aurora Aをノックダウンしても、G0/G1移行期での細胞周期停止が引き起こされず、むしろ、分裂期で染色体分配異常が引き起こされ、（その結果として）mitotic catastropheという細胞死を導くことが判明した。この結果は、Aurora Aの癌の分子標的としての可能性を示唆するものといえる。そこで、本研究では、癌由来培養細胞と非癌由来（正常）上皮細胞との間におけるAurora Aのノックダウンの表現型の違いを明らかにするとともに、将来の創薬につながるAurora A阻害性ペプチドを開発することをその目的とする。

２．　方法

１）Aurora A の活性抑制が癌細胞および正常細胞に及ぼす影響の検討

我々のグループは、Aurora Aのノックダウンの表現型がRPE1細胞（ヒト網膜色素上皮細胞）とHeLa細胞（子宮頸部癌細胞）で大きく異なる（つまり、HeLa細胞特異的に細胞死が誘導される）ことを報告してきた。この２つの細胞株における表現型の違いは、癌細胞と正常細胞の一般的な差異を反映しているかどうかについて検討を加えるため、種々の癌由来細胞株と非癌（正常）細胞株におけるAurora Aの活性抑制の効果を検討する。具体的には、FACSによる細胞周期分析やTUNNEL法によるアポトーシスの割合などの検討を通じて、Aurora Aのノックダウンの表現型がRPE1細胞（つまり、G0/G1移行期における細胞周期停止）に近い表現型なのか、それとも、HeLa細胞（つまり、染色体分配異常から引き起こされるmitotic catastrophe）に近い表現型かについて、検討する。これらの解析を通じて、Aurora Aが癌の分子標的になりうるかについて検討する。

２）Aurora A 抑制性ペプチドの開発

Aurora Aは、その活性化に必要なタンパク質と結合し、自己のスレオニン288 (T288) のリン酸化修飾を引き起こすことで活性化することが知られている。そのような活性化タンパク質は、TPX2などの種々のタンパク質が同定されている。最近、申請者らは、G1期特異的なAurora A活性化タンパク質として、trichopleinを同定した。本研究では、Aurora Aとの結合や活性化に必要なTPX2ならびtrichopleinのアミノ酸領域を同定する。この情報をもとに、このようなTPX2ならびtrichopleinの結合配列にアミノ酸変異を加えることで、Aurora Aには結合するが、Aurora Aを活性化しえないペプチドを同定する。具体的には、種々のペプチドタンパク質を精

製し、*in vitro*系でAurora Aの結合能および活性化抑制能を評価する。

３．　結果　研究成果

１）　hTERTで不死化したLP-9細胞（ヒト中皮細胞株）などの正常細胞株では、Aurora A-trichoplein系の阻害によって、増殖条件下にもかかわらず、一次繊毛が形成され、細胞周期がG0/G1で停止することが明らかになった。これに対して、U2OS細胞（骨肉腫細胞株）などの癌細胞株を用いた解析では、Aurora Aのノックダウンでは G0/G1停止は引き起こされず、むしろ、分裂期の染色体分配異常による致死的なAneuploidyを誘導することが判明した。また、このような癌細胞株では、血清飢餓による一次繊毛形成能が、正常細胞株に比して著しく低下していた。

２）　GST pull-down法などを用いて、Aurora A結合部位として、TPX2の6-39、trichopleinの35-65のアミノ酸領域を同定した。また、同部位にAurora Aの活性化能が存在することも*in vitro*のアッセイ系で明らかにした。TPX2の6-39の種々のアミノ酸領域に変異を加えてAurora Aの活性化能が変化するかについて検討を加えたところ、Y8A, Y10Aなどの変異でAurora Aの活性化能が消失することが判明した。しかしながら、これらの変異はすべてAurora Aとの結合能を失ってしまったことから、これらのペプチドはAurora A阻害性ペプチドとして機能しない可能性が高いと考えられる。

４．考察　まとめ

本研究において、少なくとも、培養細胞レベルでは、Aurora Aの阻害によって、（一次繊毛の形成能が高い）正常細胞では、G0/G1における細胞周期停止は導くが、細胞死は誘導せず、（一次繊毛の形成能が著しく低い）癌細胞では、分裂期の染色体分配異常によるmitotic catastropheを引き起こすことが明らかになった。今後、生体レベルでの検討が必要であるが、Aurora A阻害剤は、癌細胞特異的に細胞死を誘導できる可能性がより高まったといえる。我々は、正常細胞株におけるAurora A阻害による細胞周期停止にp53またはpRb経路（もしくは、その両方）に起因しているのではないかと考え、そのシグナル伝達経路を詳細に検討中である。

しかし、残念ながら、当初の目的の一つであったAurora A阻害性ペプチドの開発は、想定通りには進まなかった。その要因としては、（我々が本研究で見出した）Aurora Aの活性化能を失った変異ペプチドは、すべてAurora Aの結合能を同時に喪失していたためである。もちろん、すべての種類の変異を検討できた訳でないので、当初の目的の阻害性ペプチドが存在しないという意味ではないが、その検索の道のりは現状では極めて厳しいと言わざるを得ない。

しかし、本研究から、Aurora AとTPX2, trichopleinは比較的短いアミノ酸領域で結合することが判明した。現在、我々は、この部分のペプチドをbaitに、蛍光Aurora A蛋白質をprobeとしたハイスループットの低分子化合物のスクリーニング系を立ち上げた。この解析により、Aurora AとTPX2, trichopleinとの結合を特異的に阻害するリード化合物が見出せればと考えている。

謝辞

本研究は、平成24年度（第44回）公益財団法人アステラス病態代謝研究会の研究助成を受けて行われたものであり、ここに厚く御礼申し上げます。

５．　発表論文

1) Kasahara K., Goto H., Izawa I., Kiyono T., Watanabe N., Elowe S., Nigg E.A., and Inagaki M.: PI 3-kinase-dependent phosphorylation of Plk1-Ser99 promotes association with 14-3-3γ and is required for metaphase-anaphase transition. ***Nat. Commun.*** 4: 1882, 2013.

2) Goto H., Inoko A., and Inagaki M.: Cell cycle progression by the repression of primary cilia formation in proliferating cells. ***Cell. Mol. life Sci.*** 70: 3893-3905, 2013. [Review]

3) Goto H., Izawa I., Li P., and Inagaki M.: Novel regulation of checkpoint kinase 1: Is checkpoint kinase 1 a good candidate for anti-cancer therapy? ***Cancer Sci.*** 103: 1195-1200, 2012. [Review]