

がん細胞のステロイドによる中心体制御機構の解明

京都大学ウイルス研究所細胞生物学研究部門構造形成学分野

豊島 文子

1. 目的

ステロイドはコレステロールを原料として体内の酵素により合成される代謝物質で、恒常性の維持や性分化に必須の物質である。プレグネノロンは、コレステロールはからチトクロム P450 ファミリーの Cyp11a1 により代謝されて生成するステロイド化合物である。プレグネノロンはさらに下流の Cyp17a1 や HSD3B などによって代謝され、17OH-プレグネノロンやプロゲステロンに変換され、その後、一連のステロイド代謝経路によって糖質コルチコイド、鉱質コルチコイド、性ホルモンに変換される。ステロイドホルモンは、結合タンパクとともに核内で標的遺伝子の転写活性を調節するゲノミック作用がよく知られている。しかし近年、プレグネノロンは微小管に対するノンゲノミックな作用を持つことが分かってきた。微小管は、細胞分裂における紡錘体形成に必須であるが、紡錘体形成とプレグネノロンの関連については、これまで研究がなされていなかった。我々は、プレグネノロンが細胞分裂期において紡錘体極に局在し、中心小体接着維持に必須である sSgo1 タンパク質を中心体に局在化させることで、分裂期での中心体の安定性を保証することを発見した。また、この現象は複数のがん細胞で観察された。そこで本研究では、プレグネノロンによる sSgo1 タンパク質の中心体局在化機構の解明と、がん細胞と正常細胞での比較解析を行うことを目的とした。

2. 方法

1) プレグネノロン結合タンパク質の同定

FITC 蛍光ラベルしたプレグネノロンを HeLa 細胞に導入すると、分裂期の紡錘体極に局在することを観察していた。そこで、FITC-プレグネノロンを用いて sSgo1 がプレグネノロンに直接結合する可能性を検討した。sSgo1 の GST または MBP 融合タンパク質を作製し、GST/MBP-pull down と蛍光プレートリーダーによって、FITC-プレグネノロンとの結合を解析した。

2) プレグネノロンによる結合タンパク質の構造変化の解析

プレグネノロン結合タンパク質のドメイン解析を行い、結合領域を特定した。プレグネノロンの結合が立体構造に及ぼす影響について、AFM による一分子レベルの解析を行った。sSgo1 の AFM 解析は京都大学生命科学研究科竹安邦夫教授との共同研究を実施した。

3) 中心小体接着維持における分子機構の解明

sSgo1 はリン酸化依存的に中心体に局在すると報告されているため、sSgo1 のリン酸化状態の変化を検討した。sSgo1 のリン酸化解析については、京都大学薬学研究科石濱泰教授との共同研究を実施した。また、プレグネノロン依存的に sSgo1 と中心小体接着因子 (pericentrin, Scc1 等) との結合が変化する可能性を検討した。

4) プレグネノロン依存的中心体制御機構をもつがん細胞の特性の検討

がん細胞株と非がん細胞株を用いて、プレグネノロンの除去による中心小体接着への影響を検討した。プレグネノロン濃度、結合タンパク質や Cyp11a1、sSgo1 の発現を比較解析し、プレグネノロンを必要とするがん細胞に共通する特性について検討した。

3. 結果

1) プレグネノロン結合タンパク質の同定

sSgo1 の中心体局在には、N 端 158 アミノ酸が必要十分であると報告されていた。そこでまず、GST 融合型 sSgo1-N 端(1-158aa) リコンビナントタンパク質を作成し、FITC-プレグネノロンとの *in vitro* binding assay を行った。その結果、GST-sSgo1-N 端(1-158aa) は、FITC-コレステロールに比べて FITC-プレグネノロンへの結合能が有意に高いことが分かった。同様の結果は、MBP 融合型 sSgo1-N 端(1-158aa) でも得られた。以上の結果から、プレグネノロンは sSgo1 の N 端領域に直接結合することが分かった。

2) プレグネノロンによる結合タンパク質の構造変化の解析

上記の結果を踏まえ、3 種類の MBP 融合型 sSgo1-N 端(1-105aa)、(51-105aa)、(106-158aa) リコンビナントタンパク質を作成して解析した結果、sSgo1-N 端 (51-105aa) 領域がプレグネノロン結合に必要であることが分かった。さらに、この領域は sSgo1 の中心体局在に必要な十分であることを示した。この領域は、coiled-coil domain を形成し、Sgo1 の二量体形成に必須のドメインであるとの報告がなされていた。そこで、sSgo1 の二量体化とプレグネノロンとの結合の関連を検討するため、二量体化が出来ない変異体 sSgo1-N 端(1-105aa)-L68A を作成して検討した。その結果、この変異体にもプレグネノロンは結合することが分かった。従って、sSgo1 の二量体化はプレグネノロンとの結合には必要では無いと結論した。また、プレグネノロンによって sSgo1 の構造が変化する可能性について AFM を用いて解析を行った。しかし、タンパク質の精製度や脂質存在下での AFM の解析が技術的に困難であり、明確な結果は得られなかった。

3) 中心小体接着維持における分子機構の解明

sSgo1 は Plk1 によって S73 または T146 がリン酸化され、このリン酸化依存的に中心体に局在すると報告されている。そこで分裂期の細胞抽出液からリン酸化タンパク質を Mass 解析した結果、S73、T146 は検出されず、S154 が検出された。また、*in vitro* kinase アッセイにより、Plk1 が sSgo1-S154 を直接リン酸化することを確認した。また、S154 を Ala に置換した sSgo1-S154A 変異体は、中心体局在が顕著に低下することを見出した。プレグネノロンが Plk1 による S154 のリン酸化に影響を与える可能性を *in vitro* kinase アッセイで検討したが、これは変化が認められなかった。従って、sSgo1 の中心体局在におけるプレグネノロンと Plk1 の機能は独立したステップであると考えられる。さらに、プレグネノロンによって sSgo1 との結合が変化するタンパク質の同定を試みたが、明確な結果は得られなかった。

4) プレグネノロン依存的中心体制御機構をもつがん細胞の特性の検討

HeLa 細胞の細胞周期を同調させ、各周期で細胞内のプレグネノロンの濃度を測定した結果、プレグネノロンは分裂期で濃度がピークに達することが分かった。分裂期での細胞内の濃度は約 33nM であり、血中濃度とされる 1-3nM よりもはるかに高かった。また、がん細胞株である A549 と非がん細胞である HEK293 を比較した結果、A549 では sSgo1 は A549 細胞では紡錘体に局在したが、HEK293 細胞では局在しなかった。また、Cyp11a1 を抑制すると、A549 細胞では紡錘体の多極化が誘導されたが、HEK293 細胞ではされなかった。これらのことは、プレグネノロンによる中心小体接着維持機構は、がん細胞特異的である可能性が示唆される。しかし、Cyp11a1、sSgo1 の発現量には 3 細胞の間で顕著な変化は見られなかった。プレグネノロンの濃度の違

いについても明確な結果は得られなかった。

以上の結果を *Chemistry and Biology* 誌に発表した¹⁾。

4. 考察

以上の結果から、プレグネノロンによる中心体の制御機構について下記の分子機構が明らかとなった。

プレグネノロンは、がん細胞の細胞分裂期において細胞内濃度が上昇し、sSgo1 に結合する。プレグネノロンに結合した sSgo1 は、おそらく別のタンパク質への結合能が上昇し、この結合依存的に中心体へリクルートされる。中心体に移行した sSgo1 は Plk1 によって S154 がリン酸化され、さらに二量体を形成することによって中心小体結合因子に結合し、分裂期の間、その因子が中心体からかい離することを防ぐ。従って、プレグネノロン非存在下では、中心小体結合因子の早期かい離が起り、中心小体の早期分離と多極紡錘体の形成が引き起こされる。この分子機構が、がん細胞特異的である可能性とその原因の究明が今後の課題である。

最近、がん細胞は中心体数が異常であっても二極紡錘体を形成する機構を持つこと、この機構が働かないとがん細胞は多極分裂し、結果的に細胞死することが報告された。続いて、この機構を阻害する化合物として Griseofulvin の誘導体である GF15 が海外の研究グループ共同開発された。GF15 は多発性骨髄腫細胞に細胞死を特異的に誘導することが報告され、がん細胞特異的な中心体制御機構を標的とした制がん戦略が開始しつつある。本研究で明らかとなったプレグネノロン依存的な中心体制御機構ががん細胞特異的である場合、プレグネノロンと sSgo1 の結合を特異的に阻害する低分子化合物は、がん細胞に対する治療標的となり得る。今後は、さらに多くのがん細胞株や臨床サンプルを用いて検討を行う必要がある。

5. 参考文献

1) Hamasaki, M., Matsumura, S., Satou, A., Takahashi, C., Oda, Y., Higashiura, C., Ishihama, Y., and Toyoshima, F. Pregnenolone functions in centriole cohesion during mitosis. *Chem. Biol.* 21, 1707-1721, 2014