

制がん剤感受性を規定する遺伝子の同定及びその作用機構の解析

高橋 勉

Studies on Molecular Mechanism of Toxicity of Anticancer Drugs

Tsutomu TAKAHASHI

Laboratory of Molecular and Biochemical Toxicology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Tohoku University, 6-3 Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai 980-8578, Japan

(Received September 8, 2010)

The clinical utility of anticancer drugs is seriously limited by the development of adverse effects and acquisition of resistance to these drugs by tumor cells. The mechanism underlying the toxicity of anticancer drugs is still not fully understood. To elucidate the mechanisms underlying the toxicity of anticancer drugs in greater detail, we performed a screen for determinants of sensitivity to adriamycin, an anthracycline antitumor antibiotic, using budding yeast as a model eukaryote. We found that overexpression of Akl1, a protein kinase of uncertain function, confers resistance to adriamycin. We investigated the function of Akl1 in adriamycin resistance and found that downregulation of the internalization step in endocytosis by Akl1 might be closely involved in the mechanism of adriamycin resistance. In human cells, overexpression of AAK1 and a human homologue of Akl1, also decreased adriamycin toxicity, suggesting that downregulation of endocytosis *via* phosphorylation might be involved in the acquisition of adriamycin resistance not only in yeast cells but also in human cells. Further detailed investigation of the relationship between the endocytosis pathway and adriamycin toxicity might contribute further information for the improvement of chemotherapy with adriamycin.

Key words—adriamycin; resistance; endocytosis; kinase; yeast

1. はじめに

がんの化学療法において、制がん剤に対するがん細胞の反応性や副作用の発現の程度に個人差が認められる。また、がん細胞の制がん剤に対する耐性獲得も大きな障害となるが、この耐性細胞の発現頻度にも個人差がある。しかしながら、いまだに制がん剤による化学療法は一定のレジメンに従って行われているケースがほとんどである。がんの化学療法の効果を向上させるためには制がん剤の効果に影響を及ぼす個々の遺伝子の違いに基づいたテーラーメイド治療が有効と考えられる。このテーラーメイド治療を実現させるためには、個々の制がん剤に対する感受性を決定する遺伝子群の全容解明が不可欠となる。

われわれは、真核生物モデルとして生物学的研究

に広く利用されている出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を用いた独創的な制がん剤感受性決定因子のスクリーニング方法を確立し、その方法を用いてアントラサイクリン系制がん剤であるアドリアマイシンに対する感受性に影響を与える遺伝子の検索を行い、Ssl2, Bsd2, Akl1などを同定することに成功した。¹⁻⁵⁾ これらの遺伝子群はいずれも制がん剤感受性との関係がそれまでに検討されたことはなく、この事実はアドリアマイシン感受性決定機構の全容解明における本スクリーニング法の有用性を明確に示している。

同定された新規アドリアマイシン耐性遺伝子のうち、Akl1はそのアミノ酸配列上の特徴から、エンドサイトーシス経路の抑制に関与するArk/Prk kinase familyに属するセリン/スレオニンキナーゼであると考えられるが (Fig. 1),⁶⁻⁸⁾ その機能についてはほとんど解明されていない。本稿では、この機能未知のキナーゼであるAkl1の高発現による耐性獲得機構について、筆者らの研究成果を中心に概説する。

東北大学大学院薬学研究科生体防御薬学分野 (〒980-8578 仙台市青葉区荒巻字青葉 6-3)

e-mail: ttsutomu@mail.pharm.tohoku.ac.jp

本総説は、日本薬学会第130年会シンポジウム S33 で発表したものを中心に記述したものである。



Fig. 1. Schematic Representation of the Kinase Domain of the Ark/Prk Kinase Family

All members of the Ark/Prk kinase family have a kinase domain in the NH₂-terminal half of the amino acid sequence. Aspartic acid 181 (Asp181) in kinase domain of Akl1 is essential for kinase activity. S.c., *Saccharomyces cerevisiae*; H.s., *Homo sapiens*.

2. アドリアマイシン耐性獲得機構における Ark/Prk kinase family の役割

われわれの検討により、Akl1 がキナーゼ活性を有しており、またこのキナーゼ活性には他の Ark/Prk kinase family のキナーゼドメイン中でも保存性の高い 181 番目のアスパラギン酸残基 (Asp181) が必須であることが確認された (Fig. 1).^{4,6)} また、Akl1 の高発現によるアドリアマイシン耐性獲得には Akl1 のキナーゼ活性が必要であることも明らかとなった。⁴⁾

Akl1 は Ark/Prk kinase family に属する Ark1 及び Prk1 と相同性の高いキナーゼドメインを有していることから (Fig. 1),⁶⁾ Ark1 及び Prk1 も Akl1 と同様の機能を有すると予想された。しかし、Prk1 高発現酵母はアドリアマイシン耐性を示したもののその程度は Akl1 高発現酵母よりも弱く、Ark1 高発現酵母の感受性はコントロールの酵母とほぼ同程度であった。⁴⁾ また、Ark/Prk kinase family をそれぞれ欠損させた酵母のアドリアマイシン感受性を調べたところ、Ark1 欠損酵母はわずかに高い感受性を示したが、Akl1 又は Prk1 を欠損した酵母は著しく高い感受性を示した。⁴⁾ したがって、酵母におけるアドリアマイシン毒性の発現に Akl1 と Prk1 が密接に関与しているが、Ark1 の関与は少ないと考えられる。

Prk1 はエンドサイトーシスの初期過程に関与する Sla1/Pan1/End3 complex 中の Sla1 及び Pan1 をリン酸化してこの complex の解離を促進することによって、エンドサイトーシスを負に制御していると考えられている。⁹⁻¹⁴⁾ Sla1 及び End3 をそれぞれ

欠損した酵母も顕著なアドリアマイシン耐性を示したが、Sla1 及び End3 の各欠損酵母にそれぞれ Akl1 を高発現させても耐性度の上昇は認められなかった。⁴⁾ これらの結果から、Akl1 高発現によるアドリアマイシン毒性軽減作用には Sla1 及び End3 の存在が必須であると考えられる。また、アドリアマイシン耐性を示す Akl1 及び Prk1 の高発現酵母では Pan1 のリン酸化が亢進しており、エンドサイトーシス能の低下が認められた。^{4,10)} 一方、アドリアマイシン耐性を示さない Ark1 及びキナーゼ活性を持たない Akl1 変異体の高発現は Pan1 のリン酸化及びエンドサイトーシス活性にはほとんど影響を与えなかった。⁴⁾ 以上の結果は、Akl1 高発現によるアドリアマイシン耐性獲得に Pan1 のリン酸化の促進及びエンドサイトーシス能の低下が関与することを示唆している。

哺乳動物細胞では Ark/Prk kinase family として adaptor-associated kinase 1 (AAK1) 及び cyclin-G-associated kinase (GAK) が知られている (Fig. 1).¹⁵⁻¹⁸⁾ また、AAK1 の高発現は transferrin receptor や low-density lipoprotein (LDL)-receptor related protein などの膜タンパク質のエンドサイトーシスを低下させることも報告されている。¹⁹⁾ そこで、ヒト細胞におけるアドリアマイシン毒性と Ark/Prk kinase family の関係を調べるため、HEK293 細胞及び HeLa 細胞にそれぞれ AAK1 を高発現させたところ、両細胞ともにアドリアマイシン耐性が認められた (Fig. 2).⁴⁾ AAK1 は adaptor protein である AP2 μ のリン酸化を介して、エンドサイトーシスの初期過程を制御していると考えられてい

る.¹⁶⁾したがって、酵母細胞のみならずヒト細胞においてもキナーゼ依存的なエンドサイトーシスの制御機構がアドリアマイシン毒性発現機構に関与している可能性が考えられる。

3. おわりに

われわれは、出芽酵母を用いた制がん剤感受性決定因子の検索方法を確立し、新規アドリアマイシン耐性遺伝子を同定することに成功した。同定された

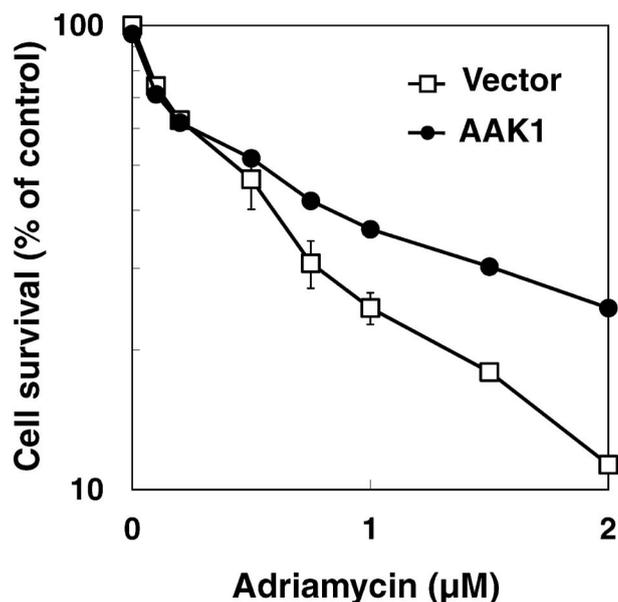


Fig. 2. Effects of Overexpression of AAK1, a Human Homologue of Akl1, on the Sensitivity of HeLa Cells to Adriamycin

HeLa cells expressing HA-tagged AAK1 were cultured for 60 h in the presence of various concentrations of adriamycin. Each point and bar represents the mean value and S.D. of results from three cultures.

遺伝子の1つである Akl1 は、エンドサイトーシス経路に係わる Sla1/Pan1/End3 complex 中の Pan1 のリン酸化を介してこの複合体の解離を促し、その結果としてアドリアマイシン毒性を軽減することを紹介した (Fig. 3). さらにわれわれは、エンドサイトーシスの抑制によるアドリアマイシン耐性獲得機構に、小胞体からゴルジ体及びエンドソームを経由して液胞までタンパク質を運ぶ小胞輸送経路が関与していることも明らかにしている (未発表データ). 近年、小胞輸送経路の異常が様々ながんの悪性化や化学療法抵抗性に関与することが報告されており,²⁰⁻²²⁾ がん治療の標的として注目されている。したがって、本研究によって得られた知見は、新しいアドリアマイシン耐性獲得機構の存在を示唆するだけでなく、小胞輸送経路に異常が認められるがんに対する化学療法の効果向上にも貢献できるものと考えられる。

謝辞 本総説に関する研究は東北大学大学院薬学研究科生体防御薬学分野において永沼 章教授の指導の下、同分野の卒業生である廣瀬健一郎博士とともに実施されたものであり、この場を借りて心から感謝申し上げます。

REFERENCES

- 1) Furuchi T., Nitta K., Takahashi T., Nagamura A., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **314**, 844-848 (2004).
- 2) Furuchi T., Takahashi T., Tanaka S., Nitta

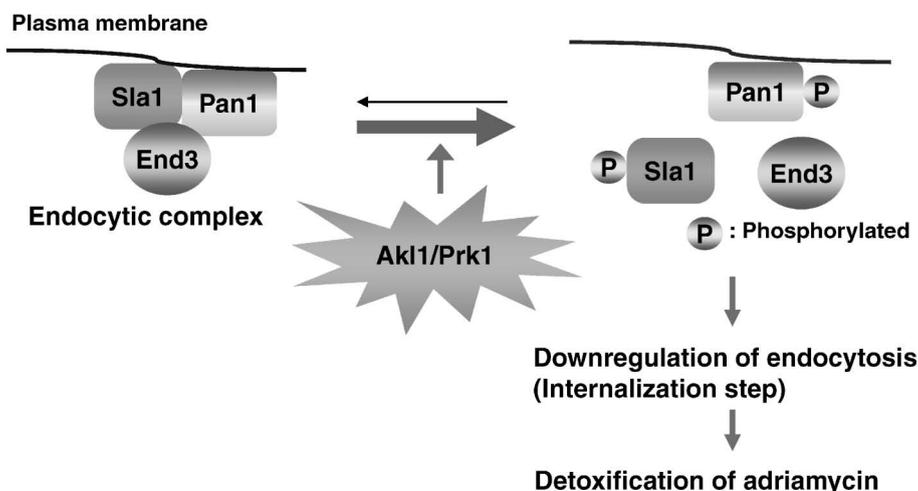


Fig. 3. Role of Ark/Prk Kinase Family in Adriamycin Resistance in *Saccharomyces cerevisiae*

- K., Naganuma A., *Nucleic Acids Res.*, **32**, 2578–2585 (2004).
- 3) Takahashi T., Furuchi T., Naganuma A., *J. Cell. Physiol.*, **202**, 100–104 (2005).
 - 4) Takahashi T., Furuchi T., Naganuma A., *Cancer Res.*, **66**, 11932–11937 (2006).
 - 5) Takahashi T., Hirose K., Mizutani E., Naganuma A., *J. Toxicol. Sci.*, **34**, 703–708 (2009).
 - 6) Smythe E., Ayscough K. R., *EMBO Rep.*, **4**, 246–251 (2003).
 - 7) Zeng G., Cai M., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **37**, 48–53 (2005).
 - 8) Sekiya-Kawasaki M., Groen A. C., Cope M. J., Kaksonen M., Watson H. A., Zhang C., Shokat K. M., Wendland B., McDonald K. L., McCaffery J. M., Drubin D. G., *J. Cell Biol.*, **162**, 765–772 (2003).
 - 9) Zeng G., Cai M., *J. Cell Biol.*, **144**, 71–82 (1999).
 - 10) Zeng G., Yu X., Cai M., *Mol. Biol. Cell*, **12**, 3759–3772 (2001).
 - 11) Cope M. J., Yang S., Shang C., Drubin D. G., *J. Cell Biol.*, **144**, 1203–1218 (1999).
 - 12) Huang B., Cai M., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **39**, 1760–1764 (2007).
 - 13) Tang H. Y., Xu J., Cai M., *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 12–25 (2000).
 - 14) Toshima J., Toshima J. Y., Martin A. C., Drubin D. G., *Nat. Cell Biol.*, **7**, 246–254 (2005).
 - 15) Conner S. D., Schmid S. L., *J. Cell Biol.*, **156**, 921–929 (2002).
 - 16) Ricotta D., Conner S. D., Schmid S. L., von Figura K., Honing S., *J. Cell Biol.*, **156**, 791–795 (2002).
 - 17) Korolchuk V. I., Banting G., *Traffic*, **3**, 428–439 (2002).
 - 18) Umeda A., Meyerholz A., Ungewickell E., *Eur. J. Cell Biol.*, **79**, 336–342 (2000).
 - 19) Conner S. D., Schmid S. L., *J. Cell Biol.*, **162**, 773–780 (2003).
 - 20) Wang Y., Roche O., Yan M. S., Finak G., Evans A. J., Metcalf J. L., Hast B. E., Hanna S. C., Wondergem B., Furge K. A., Irwin M. S., Kim W. Y., Teh B. T., Grinstein S., Park M., Marsden P. A., Ohh M., *Nat. Med.*, **15**, 319–324 (2009).
 - 21) Tanaka N., Kyuuma M., Sugamura K., *Cancer Sci.*, **99**, 1293–1303 (2008).
 - 22) Wlodkowic D., Skommer J., McGuinness D., Hillier C., Darzynkiewicz Z., *Leuk. Res.*, **33**, 1440–1447 (2009).