

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09666

研究課題名(和文) 神経芽細胞腫増殖におけるアンチザイム2とMYCNの相互作用の解析

研究課題名(英文) Functional Significance of Interaction between MYCN and AZ2 in Neuroblastoma Cells

研究代表者

村井 法之(MURAI, NORIYUKI)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：60300927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：神経芽細胞腫は、小児固形がんの中で脳腫瘍に次いで多いがんである。神経芽細胞腫の予後を左右する生物学的特性において最も強力な生物学的因子であるMYCNが高発現しているハイリスクタイプは、現有の抗がん剤が効きにくく、新規分子標的薬の開発が待たれている。我々は、ポリアミン調節タンパク質アンチザイム2(AZ2)がMYCNと核や核小体で相互作用し、その分解をユビキチン非依存的に促進することを発見した。さらに神経芽細胞腫細胞株のAZ2をノックダウンし発現を抑制すると細胞株の増殖能が3倍に増大した。これらのことからAZ2は、神経芽細胞腫増殖をMYCNの分解促進を介して抑制していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：It has been known that high expression of MYCN in neuroblastoma patient correlates with poor prognosis. We have previously found that AZ2 interacts with c-Myc and accelerates its degradation in ubiquitin-independent manner. It has been reported that high expression of AZ2 mRNA in neuroblastoma patients correlates with good prognosis. Then we hypothesized that AZ2 can also interact with MYCN and accelerates MYCN degradation in neuroblastoma. Through this study, we identified as follows. 1) AZ2 interacts with MYCN in the nuclear and nucleolar in neuroblastoma cells. 2) AZ2 can accelerates MYCN degradation by the proteasome in a ubiquitin-independent manner. 3) Knocking down of AZ2 in neuroblastoma cell line with siRNA stabilized the level of MYCN and increased the colony number and size more than two-fold compared to that of control cells in soft-agar colony formation assay. Thus AZ2 have the potential to regulate neuroblastoma cell growth through accelerating the degradation of MYCN.

研究分野：生化学・細胞生物学

キーワード：神経芽細胞腫 MYCN アンチザイム ポリアミン ユビキチン非依存的タンパク質分解

## 1. 研究開始当初の背景

神経芽細胞腫は、小児固形がんの中で脳腫瘍に次いで多いがんであり、日本では毎年約300人が新たに発症している。このがんは発症年齢によって予後が大きく異なり、生後18カ月までに発症した場合は外科的手術のみで完治が可能なほど良好で95%を超える生存率はあるが、それ以上の年齢において発症した場合の無病3年生存率はおよそ30%程度と低い。神経芽細胞腫の予後を左右する生物学的特性において最も強力な生物学的因子としてMYCN遺伝子が知られている。MYCNは良く知られているc-MYCと同じようにMYCファミリーの一員であり、細胞増殖促進や分化・アポトーシス抑制に働くことがわかっている。MYCN遺伝子の増幅は非増幅の神経芽細胞腫と比較し著しく予後が不良となる。神経芽細胞腫は交感神経節や副腎から生ずると考えられており、実験的には、マウスにおいて交感神経節特異的にMYCNを過剰発現させると、生後数カ月で神経芽細胞腫を発症し死亡することが報告されている。このようにMYCNは神経芽細胞腫の進行に大きく関わっているがその発現調節機構についてはよくわかっていない。最近神経芽細胞腫の患者の生存率は、細胞内ポリアミン制御タンパク質、アンチザイム2(AZ2)遺伝子の発現が高いほど良好であり、またMYCN遺伝子の増幅のある患者のAZ2遺伝子の発現は、非増幅患者と比較し優位に低くなっていたことが報告された(Geerts D et al. Int J Cancer 126, 2012-24(2010))。

アンチザイム(AZ)は、細胞増殖に必須なポリアミンの細胞内濃度調節を行うタンパク質であり、細胞内のポリアミン濃度が高くなると翻訳フレームシフトというユニークな機構により誘導され、ポリアミン合成の律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素(ODC)に結合し26SプロテアソームによるODCのユビキチン非依存的分解を促進する。つまりAZは細胞内ポリアミン濃度を負に制御している。がん細胞ではポリアミンが高値となることが知られている。哺乳動物のアンチザイムにはAZ1、AZ2、AZ3の3つのファミリーが存在し、AZ3は精巢特異的であるが、AZ1、AZ2は全身に普遍的に存在する。AZ2は、てんかん(癲癇)で誘導される因子として発見され、AZ1と同じようにODCに結合し、ODCのプロテアソームによる分解を促進することができるタンパク質であるが、その細胞内局在は、主に核でありまたリン酸化されることが申請者の解析からわかっている(Murai Net al. J Cell Biochem 108, 1012-21 (2009))。我々はさらに、がん原遺伝子産物c-MYCがAZ2と相互作用しその分解を促進することを発見した。この分解は、これまでに報告のあるc-MYCがユビキチン化されてプロテアソームで分解されるのではなくAZ2を介してユビキチン非依存的に分解するものである。

## 2. 研究の目的

我々が発見した、AZ2によるc-MYCのユビキチン非依存的分解促進と神経芽細胞腫におけるAZ2遺伝子の発現と予後とが正の相関をしていることを考え合わせると、神経芽細胞腫においてAZ2がMYCNの発現を調節している可能性が考えられ、それはAZ2とc-MYCの相互作用と同じようにMYCNにAZ2が結合し、その分解をユビキチン非依存的に促進していることを想像させる。

そこで我々は、これらの仮説を検証するとともにAZ2が神経芽細胞腫の増殖においてどのように関連しているか解析し、明らかとなったメカニズムを利用して、新規分子標的薬開発に結びつけることが目的である。

## 3. 研究の方法

1) MYCNはAZ2と細胞内で相互作用しているか、免疫沈降法、蛍光タンパク質や蛍光抗体法を用いた結合および局在の解析により確認する。

2) MYCNはc-MYCと同様にユビキチン依存的にプロテアソームにより分解されることが報告されているが、AZ2によってもMYCNの分解が促進されるか、神経芽細胞腫細胞株を用いてAZ2やMYCNの強制発現系やAZ2のノックダウンによる解析により明らかにする。

3) 神経芽細胞腫においてMYCNの増幅のある患者はなぜAZ2の発現が低くなっているのか、MYCNの増幅有と無しの神経芽細胞腫細胞株のAZ2とMYCN遺伝子発現を網羅的に比較解析する

4) 神経芽細胞腫細胞株においてAZ2発現が細胞増殖にどのように影響するか軟寒天コロニーアッセイにより解析する。

5) 4)において細胞増殖に明らかな関連があった場合、ゼノグラフトマウスモデル実験により個体における腫瘍形成へのAZ2の影響を解析する。

## 4. 研究成果

細胞内におけるAZ2とMYCNの相互作用を解析するために、SH-SY5YやBE(2)-C細胞にHAやFLAGタグを付加したMYCNおよびAZ2を発現させ、タグ抗体を用いて免疫沈降し結合の有無をウエスタンブロットングにより確認した。MYCNとAZ2の結合が確認できたが、コントロールとして用いたODCはMYCNへ結合しなかった。さらに細胞内局在を解析するために、ECFFやEYFPを付加したまたはタグ抗体および蛍光抗体を用いたMYCNやAZ2をBE(2)-Cに発現させ蛍光顕微鏡により観察すると両者は核において共局在した。またMG132を添加するとそれらの局在は核小体へと移行した。これらのことからAZ2とMYCNは、核や核小体で相互作用することが明らかとなった。

次に c-Myc と同様に MYCN の分解が AZ2 によって促進されるか細胞内において HA タグを付加した MYCN や AZ2 の発現系を用いた

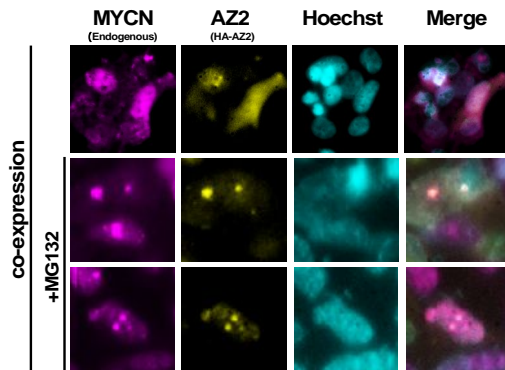


図1 MYCN と AZ 2 の核および核小体における共局在

パク合成阻害剤シクロヘキシミド添加による分解実験を行ったところ、AZ2 の存在下において MYCN の分解促進が確認された。また内在性の MYCN も AZ2 を発現させることにより分解促進された。これらの分解はプロテアソーム阻害剤 MG132 により抑制された。さらに siRNA を用いて AZ2 をノックダウンすると MYCN は安定化され分解促進は抑制された(図 2)。

これらのことは、c-MYC と同様に AZ2 がプロテアソームによる MYCN の分解をユビキチン非依存的に促進することを示唆している。

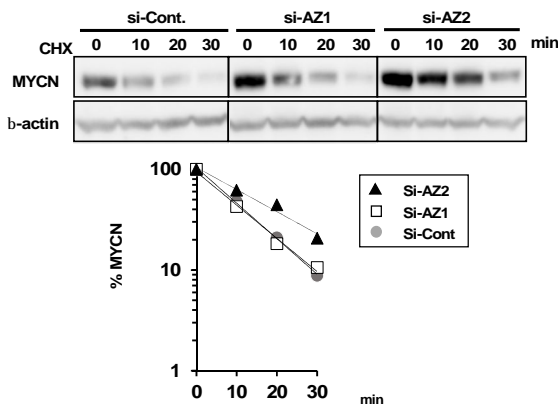


図2 AZ2 ノックダウンによる MYCN 分解の抑制

アンチザイムの MYCN に対する役割を明らかにするための解析として、足場非依存性のコロニー形成解析を行った。基底の寒天培地の上に神経芽細胞腫株を一定細胞数含ませた軟寒天培地を重層し、37、5% CO<sub>2</sub> 条件下で8日間培養しコロニーの形成をコントロールと比較した。このとき使用した細胞は培養48時間前に siRNA により AZ1、AZ2 をノックダウンした細胞を用いた。興味深いことに、軟寒天コロニーアッセイによる増殖能の解析では、AZ2 をノックダウンするとコロニー形成量が2倍以上に増加し、またコントロールに比べ大きいサイズのコロニーが多数観

察された(図 3)。これらのことから、神経芽細胞腫において、AZ2 は MYCN の安定性を制御することによってその増殖を調節できる可能性を示唆された。

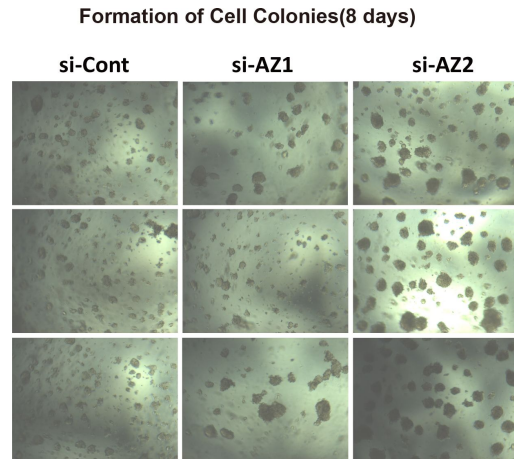


図3 軟寒天コロニーアッセイによる増殖能の解析

現在マウス個体においても AZ2 が神経芽細胞種の腫瘍形成に関与しているかゼノグラフトマウスモデル実験により解析中である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2件)

- 1) Murai N, Murakami Y, Tajima A, Matsufuji S. Novel ubiquitin-independent nucleolar c-Myc degradation pathway mediated by antizyme 2 *Sci Rep* 2018; **8**:3005. (査読有)
- 2) Tajima A, Murai N, Murakami Y, Iwamoto T, Migita T, Matsufuji S. Polyamine regulating protein antizyme binds to ATP citrate lyase to accelerate acetyl-CoA production in cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **471**: 646-51, 2016 (査読有)

[学会発表](計 9件)

- 1) 村井法之, 村上安子, 松藤千弥. (口頭) 神経芽細胞腫増殖における MYCN とアンチザイム 2 の関与. 日本ポリアミン学会 第9回年会 兵庫, 1月. 2018
- 2) Murai N. (Invited speaker) Antizyme interacting proteins in cancer cells: 2017 Gordon Research Conference, Polyamine (Polyamine Metabolism in Disease and Polyamine-Targeted Therapies. Waterville Valley, June, 2017

- 3) Tajima A, Murai N, Matsufuji S. Relationship between ATP citrate lyase and Polyamine metabolism: Gordon Research Conference, Polyamine: Polyamine Metabolism in Disease and Polyamine-Targeted Therapies. Waterville Valley, June, 2017
- 4) Murai N, Murakami Y, Matsufuji S. Novel ubiquitin-independent c-Myc degradation mediated by antizyme 2. 4th International Conference on Polyamines: Biochemical, Physiological and Clinical Perspectives Tivoli (Rome), ITALY. September 4-9, 2016.
- 5) Tajima A, Murai N, Murakami Y, Matsufuji S. Antizyme binds to ATP citrate lyase to accelerate acetyl-CoA production in cancer cells. 4th International Conference on Polyamines: Biochemical, Physiological and Clinical Perspectives Tivoli (Rome), ITALY. September 4-9, 2016.
- 6) Murai N, Murakami Y, Matsufuji S. Interaction between c-Myc and antizyme 2 in the nucleolus. 2015 Gordon Research Conference, Polyamine (Polyamine Metabolism in Disease and Polyamine-Targeted Therapies. Waterville Valley, June, 2015
- 7) Tajima A, Murai N, Murakami Y, Matsufuji S. Interaction between antizyme ATP citrate lyase in cancer cells. 2015 Gordon Research Conference, Polyamine (Polyamine Metabolism in Disease and Polyamine-Targeted Therapies. Waterville Valley, June, 2015
- 8) 村井法之. ワークショップ 1W8-p: 生理活性物質ポリアミンから疾病と健康を考える。イントロダクション BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会合同大会) 神戸 12月
- 9) 村井法之, 村上安子, 松藤千弥. ワークショップ 1W8-p: 生理活性物質ポリアミンから疾病と健康を考える。アンチザイム2とc-Myの核小体局在とユビキチン非依存的分解. BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会合同大会) 神戸 12月

〔図書〕(計 2件)

- 1) 村井法之. 1章: ヒトの細胞と分子基盤 . 細胞の発生  
リップンコットシリーズ イラストレ  
テッド統合臨床基礎医学(栗原 敏 監  
修), 2018. p.1-7. 丸善出版

- 2) 村井法之. アンチザイム (シリーズ ポ  
リアミン研究). 日本ポリアミン学会誌 .  
2017; 4 (1): 8-13.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村井 法之 ( MURAI, Noriyuki )  
東京慈恵会医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 60300927