

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17014043

研究課題名（和文）がん細胞の細胞死の制御機構

研究課題名（英文）Mechanisms for the regulation of growth and cell death in cancer cells

研究代表者

垣塚 彰 (AKIRA KAKIZUKA)

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：80204329

研究成果の概要（和文）：

新しい癌治療戦略に向けた基盤を構築するため、本研究では、細胞増殖・細胞死に関わる遺伝子・蛋白質として同定した ATP 分解酵素の 1 つである VCP について解析を行い、VCP が多くの部位でアミノ酸修飾を受け、細胞周期や細胞内の活性酸素種のコントロール等で重要な機能を担っていることを明らかにした。また、VCP とそのパートナーである p47 は、進行した腺癌・扁平上皮癌で発現の亢進が認められ、癌の浸潤や転移能獲得との関連が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In order to build fundamentals for developing novel cancer treatment, we have analyzed the functions of VCP (an ATPase), which is involved in cell growth and cell death. Resultantly, we identified VCP being modified at many amino acid residues, by which VCP is involved in the cellular functions such as controls of cell cycle and reactive oxygen species. In most of examined advanced adeno-carcinomas and squamous cell carcinomas, we observed highly elevated expression of VCP and p47, a VCP co-factor, suggesting their involvement in the invasion and metastasis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	8,400,000	0	8,400,000
2006年度	9,300,000	0	9,300,000
2007年度	9,300,000	0	9,300,000
2008年度	8,200,000	0	8,200,000
2009年度	8,200,000	0	8,200,000
総計	43,400,000	0	43,400,000

研究分野：分子医学、薬理学、生化学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：細胞死、AAA、ATPase、アミノ酸修飾

## 1. 研究開始当初の背景

近年、癌に対する分子レベルの研究は長足の進展をみせ、これまで不明であった癌における様々な異常（増殖・細胞死・分化）の分子基盤が少しずつ明らかになってきた。しかしながら、これらの進展が癌治療の概念及び

実体に対して大きく変革をもたらしていると言える状況には未だに至っておらず、新しい治療戦略の模索が行われているのが現状である。

## 2. 研究の目的

本研究は、AAA family の ATPase である VCP 蛋白質を細胞増殖・細胞死のコントロールに重要な役割を果たす鍵分子であると位置付け、VCP が担う細胞内の役割を分子レベルで詳細に解析することによって、これまでに明らかになっていない新たな細胞増殖・細胞死の作用点を解明し、癌の新しい治療に結びつく基礎研究を行うことを目的としている。

### 3. 研究の方法

本研究では以下の実験手法で研究を行った。

- (1) 培養細胞に発現させた PLAG-VCP を抗 FLAG 抗体で免疫沈降させ、質量解析法 (LC/MS/MS) により、VCP のアミノ酸修飾を網羅的に解析した。さらに同定した幾つかの修飾部位のアミノ酸を置換し、修飾における VCP の機能変化の解析を行った。
- (2) VCP の 761 番目のスレオニンのリン酸化を認識する抗体を作成し、培養細胞での局在の解析を行った。
- (3) VCP と共沈殿してくる蛋白質を質量解析法によって網羅的に同定し、その内の幾つかについて培養細胞で機能解析をおこなった。
- (4) VCP 及びその co-factor に対して特異抗体を作成し、ヒト癌組織を中心にそれらの発現様式の解析を行った。
- (5) RNAi 法を用いて VCP 及びその co-factor をノックダウンさせた HeLa 細胞の増殖能や形態の解析を行った。
- (6) VCP の強発現がないと生育できない温度感受性の出芽酵母を作成し、その温度感受性株の詳細な解析をおこなった。

### 4. 研究成果

上記の手法を用いた実験により、それぞれ以下の結果を得た。

- (1) これまでに報告のあった 4 ヶ所のセリンに加え、10 個所のセリン、14 個所のスレオニン、6 個所のチロシンがリン酸化を受け、22 個所のリジンがアセチル化の翻訳後修飾を受けることを明らかにした。さらに、これまで機能が解っていなかった D2 $\alpha$  領域(646~765 のアミノ酸に対応)内の幾つかのアミノ酸修飾によって、VCP の ATPase 活性が変化することが判明し、D2 $\alpha$  領域を VAR (VCP ATPase Regulatory) domain と呼ぶことを提唱した。
- (2) 前述した D2 $\alpha$  領域内の 761 番目のスレオニン(Thr761)のリン酸化を模倣する酸性アミノ酸であるグルタミン酸に置換した VCP(T761E)は、野生型 VCP に比べて 2~3 倍の ATPase 活性を示した。そこで、Thr761 をリン酸化スレオニンに置換した

ペプチドを合成し、このリン酸化ペプチドを特異的に認識する抗体を作成し、細胞染色を行った。するとこの抗体によって、間期ではセントロゾームを細胞分裂期にはスピンドルポールとミッドボディを特異的に染色した。上記の結果と合わせ、個別のアミノ酸修飾を受けた VCP が、細胞周期等において、特異的な機能を担っていることが示唆された。

- (3) VCP と物理的に相互作用する分子として PEX19 を同定した。VCP 及び PEX19 のノックダウン細胞では、カタラーゼが細胞質に蓄積することが判明し、VCP と PEX19 は協調してカタラーゼのペルオキシゾームへの輸送を担っていることが明らかになった。さらにこの輸送には VCP の ATPase 活性が必要で、ROS 等で VCP の ATPase 活性が失活するとカタラーゼが細胞質で増加し細胞内の ROS を消去するという新たなフィードバック機構の存在を明らかにした。癌細胞では、VCP の発現亢進によって、このフィードバック機構が破綻していることが示唆された。
- (4) VCP 及び VCP の co-factor のうち Ufd1, Npl4, p47 を特異的に認識する抗体を作成し、種々の癌組織について発現の解析をおこなった。VCP はほとんどの腺癌と扁平上皮癌で発現の亢進が認められたが、同様な発現の亢進を p47 についても認めた。一方、Ufd1, Npl4 に関しては、癌腫によって発現量に変化がみられた。これまでの報告で、Ufd1, Npl4 は強制的に作用することが報告されていたが、癌腫においては必ずしも同じような発現パターンではなく、Ufd1, Npl4 にはそれぞれ固有の機能があることが示唆された。
- (5) RNAi 法を用いて、内在性の VCP を 98% 以上ノックダウンさせた HeLa 細胞では、一見して細胞増殖の低下が観察された。詳細には、紡錘体極の数が不安定になり、娘細胞では多核を示す割合が増加していた。このような多核の細胞は、細胞周期の停止もしくは細胞死に陥った。ATPase 活性の欠失した VCP(K251A)の発現によっても同様な多核の細胞の出現が観察された。また、この HeLa 細胞では、thymidine で細胞周期を停止させた後の DNA 合成の開始が遅れ、DNA 合成の初期の段階にも VCP が深く関与していることが示唆された。一方、これらの co-factor のノックダウンでは VCP のノックダウンのような強い表現型は観察されず、細胞周期の進行には VCP 単独もしくは別の co-factor が関

与していることが示唆された。また、p47 のノックダウンした HeLa 細胞の形態解析から、p47 は細胞骨格の制御に重要な機能を担っていることが示唆され、癌の悪性化における転移や浸潤能と p47 の発現亢進の関連性が示された。

- (6) 単離した温度感受性株では、GPI10 という ER で GPI アンカーを形成するマンノシルトランスフェラーゼ遺伝子内のミスセンス変異が温度感受性の原因変異となっていることを突き止めた。この株を VCP の発現がない状態で 37°C (制限温度) で飼育すると出芽の停止とそれに引き続いて DNA の過剰複製が生じることが判明し、VCP の発現によってこれらの異常が回復することが観察された。以上の結果から、VCP には、出芽酵母の出芽の手助けと DNA の過剰複製を抑制する機能があることが示された。

#### 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 24 件)

- ① Manno, A., Noguchi, M., Fukushi, J., Motohashi, Y., & Kakizuka, A. Enhanced ATPase activities as a primary defect of mutant valosin-containing proteins (VCPs) that cause inclusion body myopathy associated with Paget disease of bone and frontotemporal dementia (IBMPFD). **Genes Cells** (in press) 2010.
- ② Koike M, Fukushi J, Ichinohe Y, Higashimae N, Fujishiro M, Sasaki C, Yamaguchi M, Uchihara T, Yagishita S, Ohizumi H, Hori S, & Kakizuka A. Valosin-containing protein (VCP) in novel feedback machinery between abnormal protein accumulation and transcriptional suppression. **J Biol Chem.** (In press) 2010.
- ③ Okamoto, A., Koike, M., Yasuda, K., & Kakizuka A. Maintaining ATP levels via the suppression of PERK-mediated rRNA synthesis at ER stress. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 42:47, 2010.
- ④ Shintani, T., Yamazaki, F., Katoh, T., Umekawa, M., Matahira, Y., Hori, S., Kakizuka, A., Totani, K., Yamamoto, K., & Ashida, H. Glucosamine induces autophagy via an mTOR-independent pathway. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 391:1775-1779, 2010.
- ⑤ Yoshikawa, Y., Ogawa, M., Hain T., Yoshida, M., Fukumatsu, M., Kim, M., Mimuro, H., Nakagawa, I., Yanagawa, T., Ishii, T., Kakizuka, A., Sztul, E., Chakraborty, T., & Sasakawa, C. Listeria monocytogenes ActA-mediated escape from autophagic recognition. **Nat Cell Biol.** 1233-1240, 2009.
- ⑥ Mori-Konya, C., Kato, N., Maeda, R., Yasuda, K., Higashimae, N., Noguchi, M., Koike, M., Kimura, Y., Ohizumi, H., Hori, S., & Kakizuka, A. p97/valosine-containing protein (VCP) is highly modulated by phosphorylation and acetylation. **Genes Cells** 14:483-497, 2009.
- ⑦ Kimura Y, Yashiroda H, Kudo T, Koitabashi S, Murata S, Kakizuka A. & Tanaka K. An inhibitor of a deubiquitinating enzyme regulates ubiquitin homeostasis. **Cell** 137:549-559, 2009.
- ⑧ Kakizuka A. Roles of VCP in human neurodegenerative disorders. **Biochem. Soc. Trans.** 36:105-108, 2008.
- ⑨ Nomura, R., Suzuki, Y., Kakizuka, A., & Jingami, H. Direct detection of the interaction between recombinant soluble extracellular regions in the heterodimeric metabotropic gamma-aminobutyric acid receptor. **J Biol Chem.** 283:4665-4673, 2008.
- ⑩ Kobayashi, T., Manno, A., & Kakizuka, A. Involvement of valosin-containing protein (VCP)/p97 in the formation and clearance of abnormal protein aggregates. **Genes Cells.** 12:889-901, 2007.
- ⑪ Matsushita, H., Scaglioni, P.P., Bhaumik, M., Rego, E.M., Cai, L.F, Majid, S.M., Miyachi, H., Kakizuka, A., Miller, W.H. Jr., & Pandolfi, P.P. In vivo analysis of the role of aberrant histone deacetylase recruitment and RAR alpha blockade in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. **J Exp Med.** 203:821-828, 2006.
- ⑫ Kitami, M.I., Kitami, T., Nagahama, M., Tagaya, M., Hori, S., Kakizuka, A., Mizuno, Y., & Hattori, N. Dominant-negative effect of mutant valosin-containing protein in aggresome formation. **FEBS Lett.** 580: 474-478, 2006
- ⑬ Wang, Y.A., Shen, K., Ishida, Y., Wang, Y., Kakizuka, A., & Brooks, S.C. Induction of murine leukemia and lymphoma by dominant negative retinoic acid receptor alpha. **Mol Carcinog.** 44, 252-261, 2005.
- ⑭ Noguchi, M., Takata, T. Kimura, Y., Manno, A., Murakami, K., Koike, M., Ohizumi, H., Hori, S., & Kakizuka A. ATPase activity of Valosin-containing protein (VCP) is regulated by oxidative modification of the evolutionally conserved 522<sup>nd</sup> cysteine residue in Walker A motif. **J. Biol. Chem.** 280: 41332-41341, 2005.
- ⑮ Chou, A.H., Yeh, T.H., Kuo, Y.L., Kao, Y.C., Jou, M.J., Hsu, C.Y., Tsai, S.R., Kakizuka, A., & Wang, H.L. Polyglutamine-expanded

ataxin-3 activates mitochondrial apoptotic pathway by upregulating Bax and downregulating Bcl-x(L). *Neurobiol Dis.* 21: 333-345, 2005.

- ⑯ Liao, W.L., Wang, H.F., Tsai, H.C., Chambon, P., Wagner, M., Kakizuka, A., Liu, F.C. Retinoid signaling competence and RARbeta-mediated gene regulation in the developing mammalian telencephalon. *Dev. Dyn.* 232:887-900, 2005.
- ⑰ Shiraki, T., Kamiya, N., Shiki, S., Kodama, T.S., Kakizuka, A., & Jingami, H. - alpha,beta-unsaturated ketone is a core moiety of natural ligands for covalent binding to peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Biol. Chem.* 279:51376-51385, 2005.

[学会発表] (計 79 件)

- ① 垣塚 彰 「ストレス応答における VCP 蛋白質の役割」第 82 回日本生化学会シンポジウム「ストレス応答の新機軸」平成 21 年 10 月 24 日 神戸国際会議場
- ② 垣塚 彰 「細胞機能における VCP 蛋白質の役割」第 10 回京都大学生命科学研究科シンポジウム 平成 21 年 7 月 2 日 芝蘭会館
- ③ Akira Kakizuka “A novel feedback machinery between abnormal protein accumulation and transcriptional suppression.” The 5<sup>th</sup> NTU-Kyoto-U mini-symposium on molecular and cellular biology. May 23, 2009. Raku-yu Kaikan, Kyoto, Japan.
- ④ 垣塚 彰 「癌ってどうゆうもの？」膳所高等学校・京都大学公開講義 平成 21 年 5 月 8 日 京都大学
- ⑤ 垣塚 彰 「異常蛋白質の蓄積がもたらすフィードバック機構」第 9 回京都大学生命科学研究科シンポジウム 平成 20 年 6 月 26 日 京大会館
- ⑥ 垣塚 彰 「分子が織りなす生命の不思議—どうして病気になるの？ 運動しても肥満は防げない？ がん・神経難病、肥満・糖尿病をめぐる—」徳島県立総合大学校まなびあ徳島 開校記念講演 平成 20 年 6 月 8 日 徳島県立総合教育センター (徳島県板野郡)
- ⑦ Akira Kakizuka “Roles of VCP in human neurodegenerative disorders” 7<sup>th</sup> international conference on AAA proteins. September 11, 2007. Royal Agricultural College, Cirencester (England)
- ⑧ 垣塚 彰 「癌ってどういうもの？」文部科学省科学研究費補助金特定領域研究「がん特定」公開シンポジウム「高校生の諸君に伝えたい、がん研究の今！」第 3 回 出前授業 平成 18 年 11 月 20

日 徳島県立城南高等学校

- ⑨ 垣塚 彰 「VCP 蛋白質の機能解析」平成 18 年度生理学研究所研究会 細胞死研究の新たな展開と関連する素過程 平成 18 年 10 月 31 日 生理学研究所
- ⑩ 垣塚 彰 「細胞周期における VCP 蛋白質の機能解析」第 78 回日本生化学会大会 ランチョンセミナー 平成 17 年 10 月 20 日 神戸ポートピアホテル
- ⑪ Akira Kakizuka “ATPase activity of Valosin-containing protein (VCP) is regulated by oxidative modification of the evolutionally conserved 522<sup>nd</sup> cysteine residue in Walker A motif” 6th international conference on AAA proteins. September 15, 2005 Schloss Seggau, Austria

[図書] (計 2 件)

- ① 垣塚 彰 「ヒトの分子生物学」分子生物学 第 2 版 (編集: 柳田光弘、西田栄介、野田 亮) 東京科学同人 261-273, 2009.
- ② 垣塚 彰 「ポリグルタミン病」脳神経科学 イラストレイテッド 改訂第 2 版 (編集: 森 寿、真鍋俊也、渡辺雅彦、岡野栄之、宮川 剛) 羊土社 312-319, 2006.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

- ①名称: ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体活性剤および組成物  
発明者: 垣塚 彰、大滝佳代、大泉 宏、庭野吉己、別府史章、鈴木尚志  
権利者: 京都大学、(株)サニーヘルス  
種類: 特許  
番号: 特願 2008-227635  
出願年月日: 2008 年 9 月 4 日  
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

- ①名称: 蛋白質切断活性を有する細胞のスクリーニング方法  
発明者: 垣塚 彰、山本幸男  
権利者: JST  
種類: 特許  
番号: 特許第 4033637 号  
取得年月日: 2007 年 11 月 2 日  
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ:

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/funcbiol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

垣塚 彰 (AKIRA KAKIZUKA)

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号: 80204329

- (2) 研究分担者 なし
- (3) 連携研究者 なし