

平成 20 年 4 月 10 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590774

研究課題名 (和文) 炭酸脱水酵素関連蛋白が癌細胞の進展を増強する分子メカニズムの解明

研究課題名 (英文) Analysis for molecular mechanisms of the carcinogenesis induced by carbonic anhydrase-related proteins

研究代表者

西森 功 (NISHIMORI ISAO)

高知大学・教育研究部医療学系・准教授

研究者番号：30237747

研究成果の概要：炭酸脱水酵素-関連蛋白 (CA-related protein, CA-RP) が癌細胞の進展を増強する分子メカニズムについて検討した。3 種類の CA-RP (VIII, X, XI) はいずれも細胞質内、特に核周囲に多く存在していた。CA-RP VIII は aminoacyl-tRNA をリボソームに搬送する eukaryotic translation elongation factor alpha 1 (EEF1A1) と細胞内で結合することが確認された。また、CA-RP VIII および XI は上皮細胞の分化やアポトーシスを誘導する Keratinocyte growth factor receptor (KGFR) の発現を抑制していることが示された。以上より、CA-RP が癌細胞の増殖・浸潤能を増強する細胞内メカニズムとして、EEF1A1 を介し KGFR などの蛋白翻訳を抑制した結果、アポトーシスが低下する機序が想定された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：癌細胞、炭酸脱水酵素、炭酸脱水酵素関連蛋白、eukaryotic translation elongation factor alpha 1 (EEF1A1)、Keratinocyte growth factor receptor (KGFR)、アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

炭酸脱水酵素 (carbonic anhydrase; CA) は二酸化炭素の水和反応を可逆的に触媒する亜鉛要求性の酵素であり、酸塩基平衡、pH調節、CO₂輸送などの基本的な生理機能において中心的役割を果たしている。これまで 15 種類のヒトCA遺伝子ファミリーが報告されたが、この中には酵素活性に必須である亜鉛結合ヒスチジン残基を欠失する 3 種類のアイソフォームがあり、炭酸脱水酵素-関連蛋白 (CA-related protein, CA-RP ; VIII, X, XI) と呼ばれる。

我々はこれまでヒトあるいは細菌における様々な CA 遺伝子のクローニングを行い (ヒト CA VB, CA XIV, CA-RP X, CA-RP XI ; マウス CA-RP X, CA-RP XI ; *H. pylori* α -CA, β -CA ; *M. tuberculosis* β -CA)、その生化学的特徴や発現分布を報告してきた。また、種々の病態を呈する組織において CA アイソザイムの発現をスクリーニングし、特定の癌細胞が CA-RP を過剰に発現すること、CA-RP の発現が癌細胞の進展 (増殖と浸潤) を促進することを発見した。細胞の癌化と活性型CAとの関連について

では、大腸癌、子宮頸癌、腎癌において細胞質膜貫通型CA IXあるいはCA XIIの発現増強が報告されている。一般に酸性条件下では癌細胞の浸潤・遊走能が増強されると言われており、癌細胞はCAの発現により周囲環境のpHバランス・CO₂濃度を調節し、浸潤増殖能を高めていると考えられる。一方、CA-RPの機能はいまだ不明であり、癌細胞の進展を増強する分子メカニズムについての検討が待たれている。

2. 研究の目的

本研究ではCA-RPの機能を分子レベルで解明し、癌細胞の進展過程（増殖、浸潤あるいは転移）における役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞におけるCA-RP mRNAの発現

8種類の培養神経系細胞におけるCA-RP VIII, X, XIのmRNA発現をRT-PCR法により検討した。

(2) CA-RPの細胞内局在の検討

① COS-7細胞における遺伝子導入発現

CA-RP VIII, X, XIの蛋白コード領域のcDNAをadapter primerを用いたPCRで増幅精製後、pE-GFPベクターにサブクローニングした。COS-7細胞に遺伝子導入し、CA-RPとGFPの融合蛋白の局在を蛍光顕微鏡で観察した。

② 内在性CA-RPの培養細胞内局在の検討

消化管間葉系培養細胞GIST-T1および神経系培養細胞TGWを用い、3種類のCA-RPに対するモノクローナル抗体(IgM)を用いた免疫蛍光抗体染色を行い、蛍光顕微鏡で観察した。

(3) 抗CA-RP抗体による免疫沈降蛋白

培養大腸癌培養細胞LoVoおよびA549の細胞homogenateに抗CA-RP VIII抗体、さらにprotein G Sepharose (Zymed)を加え免疫沈降した。同抗体で特異的に沈降した蛋白バンド5本(銀染色)を抽出し、MALDI-TOFマスマスペクトロメトリーで解析した。

(4) CA-RP VIIIとEEF1A1の結合の検討
Eukaryotic translation elongation factor α 1 (EEF1A1)-c-Mycの融合蛋白、CA-RP VIII-GFPの融合蛋白をCOS-7細胞で共発現させ、各々抗c-Myc抗体、抗GFP抗体で免疫沈降後、抗EEF1A1抗体、抗CA-RP VIII抗体でblotした。

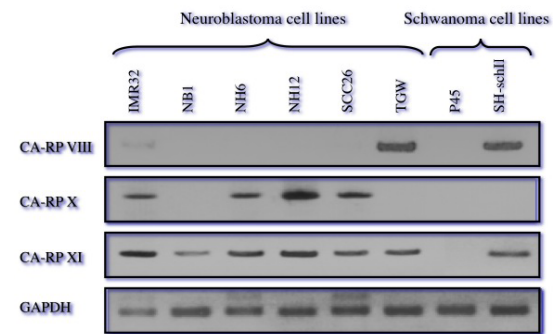
(5) CA-RP VIII/XIのcDNAをpCIneoにサブクローニングし、大腸癌培養細胞LoVoと消化管間葉系腫瘍培養細胞GIST-T1に各々transfectした。Transfectantとwild-typeの細胞のcDNAをNHS-Cy3とNHS-Cy5で標識後、マイクロアレイ(2万遺伝子)にハイブリダイズし、CA-RP VIII/XIにより共通して発現が変化する遺伝子を比較検討した。

4. 研究成果

(1) 培養細胞におけるCA-RP mRNAの発現

8種類の培養神経系細胞において、3種類のCA-RPは様々な発現パターンを示した。これらの神経系細胞ではCA-RP XIの発現が最も汎く見られた(図1)。

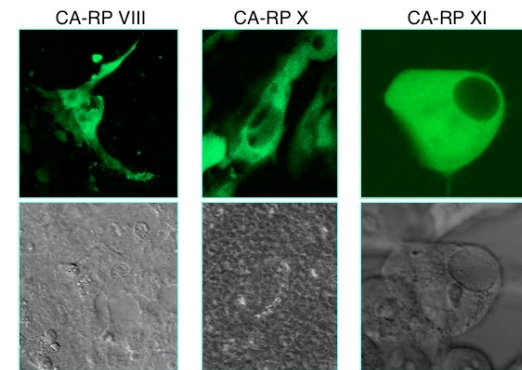
図1 培養腫瘍細胞における炭酸脱水酵素関連蛋白(CA-RP VIII, X, XI)の発現



(2) CA-RPの細胞内局在の検討

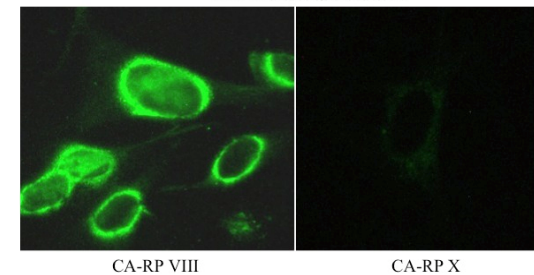
COS-7細胞においてGFPとの融合蛋白を強制発現させた結果、3種類のCA-RPとも細胞質内での発現が確認された(図2)。

図2 炭酸脱水酵素関連蛋白(CA-RP VIII, X, XI)の細胞内局在 (COS-7細胞、共焦点蛍光顕微鏡)



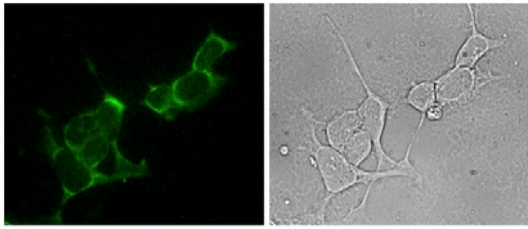
GIST-T1細胞において内在性のCA-RP VIIIは細胞質内、特に核周囲に局在が見られた(図3)。また、TGW細胞におけるCA-RP XIの発現は神経突起にはほとんど見られず、核周囲に発現が見られた(図4)。

図3 炭酸脱水酵素関連蛋白CA-RP VIIIの細胞内局在 (GIST-T1細胞、間接蛍光抗体法)



以上の検討結果より、3種類のCA-RPはいずれも細胞質内に局在し、特に核周囲に存在することが示された。

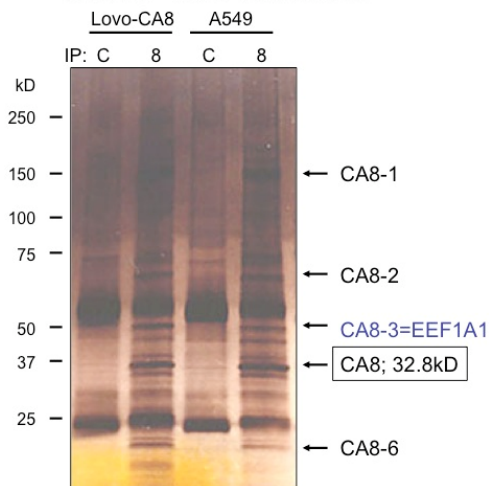
図4. 炭酸脱水酵素関連蛋白CA-RP XIの細胞内局在 (TGW細胞, 間接蛍光抗体法)



(3) 抗 CA-RP 抗体による免疫沈降蛋白

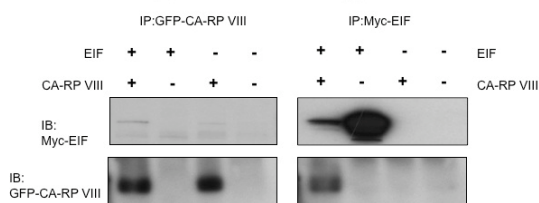
抗 CA-RP VIII 抗体により 2 種類の細胞で免疫沈降された 5 本の蛋白バンドを MALDI-TOF マススペクトロメトリーで解析した結果、50.1kDa 蛋白 (CA8-3) が eukaryotic translation elongation factor alpha 1 (EEF1A1) であることが確認された (図 5)。さらに、COS-7 細胞で単あるいは共発現させ、各々抗 c-Myc 抗体、抗 GFP 抗体で免疫沈降後、抗 EEF1A1 抗体、抗 CA-RP VIII 抗体で blot した結果、EEF1A1 と CA-RP VIII の細胞内での結合が確認された (図 6)。

図5. 抗CA-RP VIII抗体による免疫沈降蛋白



EEF1A1 は蛋白の翻訳開始を調節する (aminoacyl tRNA をリボソームに搬送) 重要な機能分子である。本実験により、これまで報告してきた CA-RP が癌細胞の進展 (増殖と浸潤) を促進する分子メカニズムとして、CA-RP VIII が EEF1A1 に結合し、癌細胞の蛋白翻訳を調整している可能性が示された。

図6. CA-RP VIIIとEEF1A1との結合



(4) CA-RP VIII/XI により発現の変異する分子の検索 (マイクロアレイによる検討)

CA-RP VIII および XI の強制発現により Keratinocyte growth factor receptor (KGFR) の発現が約 1/4 (CA-RP VIII により 0.27 倍、CA-RP XI により 0.25 倍) に低下していた。KGFR (=Fibroblast growth factor receptor 2-IIIb) はチロシンキナーゼ受容体であり、リガンドである FGF-7 (=KGF) は上皮細胞の分化やアポトーシスに関与するとされる。さらに、KGFR の発現は大腸癌や唾液腺癌で低下し、大腸癌の分化度や局所浸潤度と逆相関することが報告されている。以上より CA-RP が癌細胞の増殖・浸潤能を増強する細胞内メカニズムのひとつと考えられた。

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 13 件)

- ① Nishimori I, (他 2 名, 1 番目). Carbonic anhydrase Inhibitors. Cloning, characterization, and inhibition studies of a new beta-carbonic anhydrase from *Mycobacterium tuberculosis*. J Med Chem, 2009, in press (PMID: 19338333), 査読あり.
- ② Minakuchi T, Nishimori I, (他 3 名, 2 番目). Molecular cloning, characterization, and inhibition Studies of the Rv1284 beta-carbonic anhydrase from *Mycobacterium tuberculosis* with sulfonamides and a sulfamate. J Med Chem, 2009, in press (PMID: 19317447), 査読あり.
- ③ Nishimori I, (他 6 名, 1 番目). Carbonic anhydrase inhibitors. Cloning, characterization and inhibition studies of the cytosolic isozyme III with anions. J Enzyme Inhib Med Chem, 24, 70-76, 2009, 査読あり.
- ④ Vullo D, Nishimori I, (他 2 名, 2 番目). Carbonic anhydrase activators: Activation of the human cytosolic isozyme III and membrane-associated isoform IV with amino acids and amines. Bioorg Med Chem Lett. 18, 4303-4307, 2008, 査読あり.
- ⑤ Morishita S, Nishimori I, (他 7 名, 2 番目). Cloning, polymorphism, and inhibition of beta-carbonic anhydrase of *Helicobacter pylori*. J Gastroenterol, 43, 849-857, 2008, 査読あり.

- ⑥ Nishimori I, (他 3 名、1 番目). The alpha and beta classes carbonic anhydrases from *Helicobacter pylori* as novel drug targets. *Curr Pharm Des*, 14, 622-630, 2008、査読なし.
- ⑦ Pastorekova S, Vullo D, Nishimori I, (他 3 名、3 番目). Carbonic anhydrase activators: activation of the human tumor-associated isozymes IX and XII with amino acids and amines. *Bioorg Med Chem*, 16, 3530-3536, 2008、査読あり.
- ⑧ Nishimori I, (他 6 名、1 番目). Carbonic anhydrase inhibitors: cloning, characterization, and inhibition studies of the cytosolic isozyme III with sulfonamides. *Bioorg Med Chem*, 15, 7229-7236, 2007、査読あり.
- ⑨ Nishimori I, (他 4 名、1 番目). Carbonic anhydrase inhibitors: the inhibition profiles of the human mitochondrial isoforms VA and VB with anions are very different. *Bioorg Med Chem*, 15, 6742-6747, 2007、査読あり.
- ⑩ Vullo D, Innocenti A, Nishimori I, (他 3 名、3 番目). Carbonic anhydrase activators: activation of the human isoforms VII (cytosolic) and XIV (transmembrane) with amino acids and amines. *Bioorg Med Chem Lett*, 17, 4107-4112, 2007、査読あり.
- ⑪ Nishimori I, (他 5 名、1 番目). Carbonic anhydrase activators: the first activation study of the human secretory isoform VI with amino acids and amines. *Bioorg Med Chem*, 15, 5351-5357, 2007、査読あり.
- ⑫ Nishimori I, (他 7 名、1 番目). Carbonic anhydrase inhibitors: the beta-carbonic anhydrase from *Helicobacter pylori* is a new target for sulfonamide and sulfamate inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 17, 3585-3594, 2007、査読あり.
- ⑬ 西森 功. 膵臓における炭酸脱水酵素の発現と機能. *膵臓*, 22, 534-546, 2007、査読なし.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 森下佐織、西森 功, (他 6 名、2 番目). ヘリコバクター・ピロリ炭酸脱水酵素の遺伝子クローニングと酵素阻害薬の検討第 49 回日本消化器病学会大会、2007 年 10 月 18 日、神戸.

- ② 麻植啓輔、西森 功, (他 6 名、7 番目). 自己免疫性膵炎における炭酸脱水酵素 IV ペプチドに対する細胞性免疫応答. 第 38 回日本膵臓学会大会、2007 年 6 月 29 日、福岡.

[図書] (計 1 件)

- ① Nishimori I, Takeuchi H, Supuran CT: Drug design of zinc-enzyme inhibitors: Functional, structural, and disease applications (Supuran CT, Winum J, eds). *Inhibitors of Helicobacter pylori α - and β -carbonic anhydrases as novel drugs for gastroduodenal diseases*. Wiley, Hoboken, 2009 (in press)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西森 功 (NISHIMORI ISAO)
高知大学・教育研究部医療学系・准教授
研究者番号：30237747

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

竹内 保 (TAKEUCHI TAMOTSU)
高知大学・教育研究部医療学系・准教授
研究者番号：50226990