

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790235

研究課題名 (和文) 新しいタイプの癌抑制蛋白質パラフィブロミンの機能解析

研究課題名 (英文) Functional analysis of tumor suppressor protein, parafibromin

研究代表者

岩田 武男 (IWATA TAKEO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：10350399

研究成果の概要：パラフィブロミンは「顎腫瘍を伴う副甲状腺機能亢進症」の原因遺伝子 *HRPT2* がコードする癌抑制蛋白質である。パラフィブロミンは細胞増殖抑制能を有するが、SV40 ウイルスの large T 抗原 (LT) の存在下では、逆に細胞増殖を促進する。本研究ではパラフィブロミンと LT の相互作用部位の同定およびパラフィブロミンが関わる癌化機構に關与する分子の同定を試みた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：薬理学・内分泌学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：癌抑制蛋白質・癌蛋白質・細胞増殖

## 1. 研究開始当初の背景

副甲状腺機能亢進症は腺腫、過形成、癌などにより副甲状腺が腫大して副甲状腺ホルモンが過剰分泌される疾患である。この疾患のほとんどは散発性であるが、家族性副甲状腺機能亢進症 (FIHP)、多発性内分泌機能亢進症 1 型および 2A 型 (MEN1, 2A)、家族性低カルシウム尿性高カルシウム血症 (FHH)、顎腫瘍を伴う副甲状腺機能亢進症 (HPT-JT)、など遺伝性の疾患も存在する。他の副甲状腺機能亢進症の多くが良性の副甲状腺腫であるのに対し、HPT-JT は副甲状腺癌の頻度が高いこと、下顎および上顎に線維腫を併発することに特徴を有する。HPT-JT の原因遺伝子は *HRPT2* であり、この遺伝子は 531 アミノ酸残

基よりなるパラフィブロミンをコードする。HPT-JT 家系や散発性副甲状腺癌で *HRPT2* の変異によるパラフィブロミンの不活化が認められることから、パラフィブロミンは癌抑制蛋白質と考えられている。パラフィブロミンは各組織に発現し、核に局在する。その一次構造の C 末端は酵母 Paf1 複合体の構成蛋白質の一つである Cdc73 と相同性を有する。酵母 Paf1 複合体は Paf1、Cdc73、Leo1、Ctr9、Rtf1 からなり、ヒストン修飾反応を媒介することによる RNA ポリメラーゼ II の転写伸長反応に關与する。パラフィブロミンは Paf1、Ctr9、Leo1 のヒトホモログと相互作用することから、ヒト Paf1 複合体の構成蛋白質であることが示唆されているが、パラフィブロミ



ンおよびヒト Paf1 複合体の生理作用に関する報告は少ない。

我々は HEK293 細胞および NIH3T3 細胞にパラフィブロミンを強発現させると細胞増殖が抑制されるが、293FT 細胞や COS7 細胞にパラフィブロミンを強発現させると、細胞増殖が促進されること、S 期の細胞数が増加することを見いだした。293FT 細胞や COS7 細胞は SV40 ウイルスの large T 抗原 (以下 LT と略す) を発現する細胞株であることから、LT 存在下でパラフィブロミンは細胞増殖を促進させることが示唆された。またパラフィブロミンは LT 発現細胞中で LT と相互作用していることを明らかにした。このようにパラフィブロミンは正常細胞では細胞増殖抑制能を有する癌抑制蛋白質として作用するが、LT 発現細胞では LT との相互作用により細胞増殖を促進する癌蛋白質として作用する新しいタイプの癌抑制蛋白質であることが示唆された。

## 2. 研究の目的

癌抑制蛋白質パラフィブロミンの機能解析を行い、パラフィブロミンが関わる癌発生機序を明らかにすることを目的とし、パラフィブロミンと LT の相互作用部位の同定およびパラフィブロミン過剰発現により発現変動を示す遺伝子の同定を試みた。

## 3. 研究の方法

(1) パラフィブロミンと LT の変異体発現ベクターの構築: ヒト線維芽細胞株 TIG1 細胞と 293FT 細胞の total RNA から RT-PCR を行いパラフィブロミンと LT の全長 cDNA をそれぞれ増幅した。これらの PCR 産物を FLAG タグあるいは HA タグを付加した発現ベクター-pcDNA3.1+ にサブクローニングした。この全長パラフィブロミンと LT 発現ベクターを鋳型にパラフィブロミンと LT の特定の部位をコードする領域を PCR で増幅し、FLAG タグあるいは HA タグを付加した発現ベクター-pcDNA3.1+ にサブクローニングした。

(2) LT とパラフィブロミンの相互作用部位の同定: LT 発現細胞である 293FT にパラフィブロミンおよび N 末端、C 末端を欠損させたパラフィブロミン変異体に FLAG タグを付加した蛋白質を強発現させ、細胞抽出物の FLAG 抗体結合アガロースビーズによる免疫沈降を行った。共沈した蛋白質を SDS-PAGE および LT 抗体によるウエスタンブロッティングによりパラフィブロミンの LT 結合部位を検討した。また FLAG タグを付加した LT の各種変異体と HA タグを付加した全長パラフィブロミンを HEK293 細胞に共発現させ、FLAG 抗体による免疫沈降および HA 抗体によるウエ

スタンブロッティングにより LT のパラフィブロミン結合部位を検討した。

核移行ドメインを含む部位を欠損させた LT とパラフィブロミンの各変異体は網状赤血球抽出液の翻訳系を用いて蛋白質を合成し、その混合液を同様に免疫沈降し、SDS-PAGE、ウエスタンブロッティングにより相互作用を調べた。

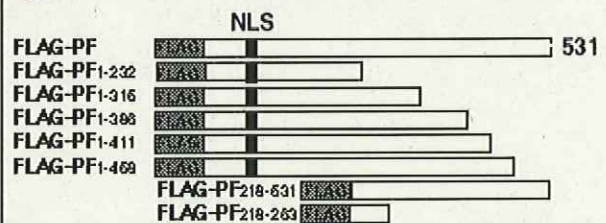
(3) マイクロアレイ解析: パラフィブロミンを強発現させた HEK293 細胞および 293FT 細胞と対照として空ベクターを導入した HEK293 細胞および 293FT 細胞から total RNA を抽出した。各細胞で変動する遺伝子を同定するため愛媛臨検 (株) にマイクロアレイ解析を委託した。

(4) リアルタイム RT-PCR による遺伝子発現解析: マイクロアレイにより変動が確認された遺伝子のプライマーを合成し、SYBR Green 法によるリアルタイム RT-PCR でパラフィブロミンを強発現させた HEK293 細胞および 293FT 細胞と対照として空ベクターを導入した HEK293 細胞および 293FT 細胞中の遺伝子発現の差異を検討した。

## 4. 研究成果

(1) パラフィブロミンの LT 結合部位の同定  
パラフィブロミンの LT 結合部位を同定するため、C 末端部位あるいは N 末端部位を欠損させた数種類のパラフィブロミン変異体の発現ベクターを構築した (図 1)。

図 1



核移行シグナル (NLS) を含むパラフィブロミン変異体は LT 発現細胞株である 293FT 細胞に発現させ、FLAG 抗体による免疫沈降、LT 抗体によるウエスタンブロッティング法を行ったところ、N 末端 1-232 アミノ酸残基よりなるパラフィブロミン変異体のみ LT との相互作用が認められなかった (図 2)。218-263、218-531 アミノ酸残基よりなるパラフィブロミン変異体は NLS が含まれないため、網状赤血球抽出液での翻訳系を用いて蛋白質を合成し、同じく合成した LT との相互作用を *in vitro* で確認した。この 2 つの変異体は LT との相互作用が認められた (図 3)。これらの結果からパラフィブロミンの 216-263 アミノ酸配列が LT との相互作用に必



要であることが分かった。

図 2

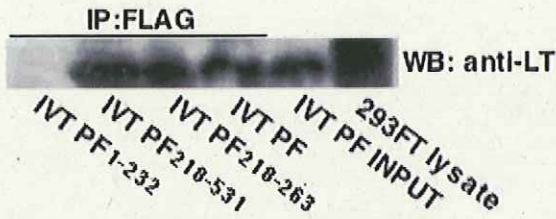
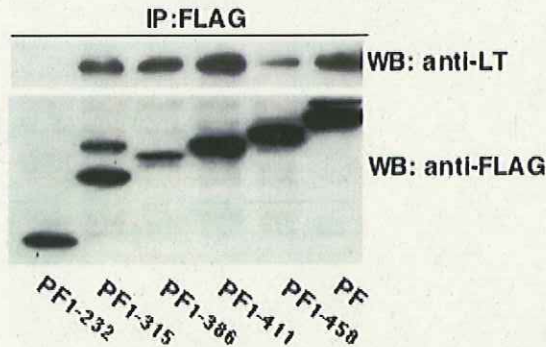
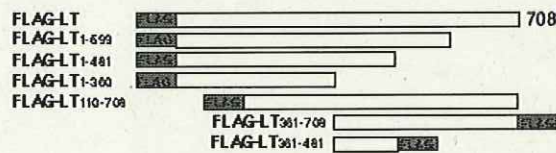


図 3



(2) LT のパラフィブロミン結合部位の同定  
LT のパラフィブロミン結合部位を同定するため、C 末端部位あるいは N 末端部位を欠損させた数種類の LT 変異体の発現ベクターを構築した (図 4)。

図 4



LT を発現していない細胞株である HEK293 細胞に C 末端を欠損させた LT を HA タグ付加パラフィブロミンと共に発現させ、FLAG 抗体による免疫沈降、HA 抗体によるウェスタンブロットリング法により相互作用を確認した。N 末端 1-2360 アミノ酸残基よりなる LT 変異体のみパラフィブロミンとの相互作用が認められなかった (図 5)。N 末端を欠損させた 361-481、2361-708 アミノ酸残基よりなる LT 変異体は網状赤血球抽出液での翻訳系を用いて蛋白質を合成し、同じく合成したパラフィブロミンとの相互作用を *in vitro* で確認した。この 2 つの変異体はパラフィブロミンとの相互作用が認められた (図 6)。これらの結果から LT のパラフィブロミン結合部位は 361-481 アミノ酸間であることが分かった。

図 5

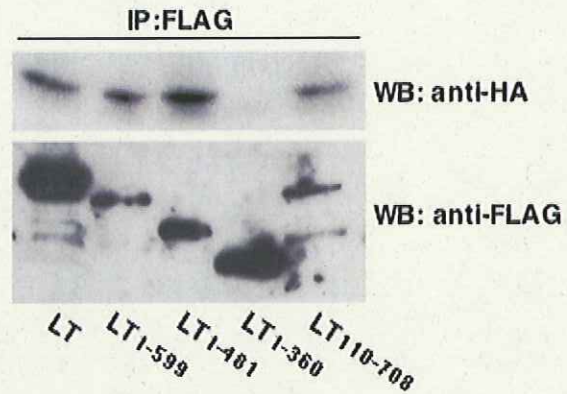
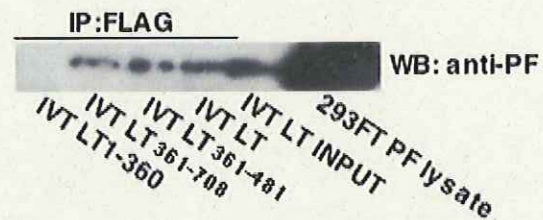


図 6



(3) マイクロアレイ解析

パラフィブロミンの細胞増殖抑制機序と LT 発現細胞での細胞増殖促進機序に関わる分子を同定するために、パラフィブロミン過剰発現細胞で発現変動する遺伝子の同定をマイクロアレイ解析により試みた。

HEK293 細胞でパラフィブロミン過剰発現により 96 種類、307 種類、1110 種類の遺伝子の発現がそれぞれコントロールの細胞と比較して 10 倍、5 倍、2 倍以上低下した。またパラフィブロミン過剰発現細胞で、10 倍、5 倍、2 倍以上発現が上昇した遺伝子はそれぞれ 388、1137、3160 種類あった (図 7)。一方、パラフィブロミンを過剰発現させた 293FT 細胞では 558、1093、2341 種類の遺伝子の発現がそれぞれコントロールの細胞と比較して 10 倍、5 倍、2 倍以上低下し、750、1731、6298 種類の遺伝子の発現がそれぞれ 10 倍、5 倍、2 倍以上増加した (図 8)。

図 7

Number of genes up- or down-regulated by parafibromin in HEK293

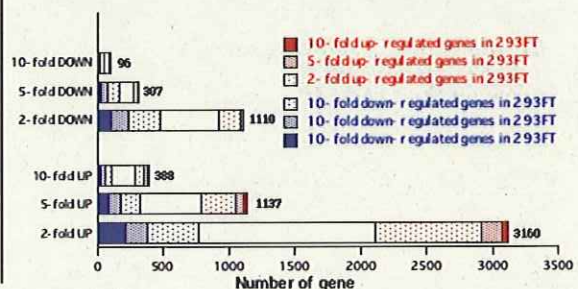
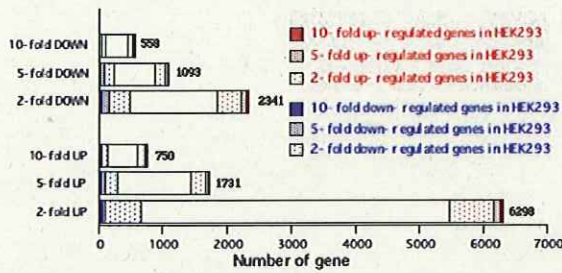




図 8

Number of genes up- or down-regulated by parafibromin in 293FT



パラフィブロミン過剰発現により HEK293 細胞で発現が上昇し、かつ 293FT 細胞で発現が低下した遺伝子、あるいは HEK293 細胞で発現が低下し、かつ 293FT 細胞で発現が上昇した遺伝子、および 10 倍以上発現が変動した細胞増殖に関わる遺伝子について、リアルタイム RT-PCR を用いてパラフィブロミンを過剰発現させた HEK293 細胞および 293FT 細胞とコントロール細胞との発現量比較を検討したが、現在まで有意な差を示す遺伝子はみつかっていない。今後、マイクロアレイ解析でパラフィブロミン過剰発現により発現変動を示した遺伝子について、引き続き解析していく予定である。

#### (4) 考察と今後の展望

パラフィブロミンの過剰発現は LT 存在下では S 期の細胞数が増加しており、パラフィブロミンは LT と相互作用することにより、細胞周期を正に制御すると考えられる。LT 発現細胞株ではパラフィブロミンの過剰発現はパラフィブロミンの細胞増殖抑制能を打ち消しているのではなく、むしろ細胞増殖促進の方向に向かわせる。このことからパラフィブロミンは LT 存在下で癌蛋白質としての特徴を示す新しいタイプの癌抑制蛋白質と考えられる。このような性質をもつ例として Kruppel-like factor (KLF) family の KLF4 や MEN1 の原因遺伝子産物である MENIN が挙げられる。KLF4 は癌抑制蛋白質としての作用を示すが、特定の条件下では癌蛋白質としても作用する。MENIN は転座により白血病を引き起こす癌蛋白質である Mixed-Lineage Leukemia (MLL) に結合し、MLL による癌化機構に必須な因子でもある。

副甲状腺腫瘍では *HRPT2* の変異によるパラフィブロミンの不活化が生じているが、反対に *HRPT2* が位置する 1q25 領域の増幅が肝癌や肺癌、神経膠芽腫、腭頭部癌で認められる。このことは *HRPT2* が癌遺伝子として作用する例と考えられる。最近、ショウジョウバエの Parafibromin のホモログである Hyrax が  $\beta$ -catenin と相互作用し、Wnt/Wg シグナルの核への伝達に必要であること、パラフィブロミンも  $\beta$ -catenin と相互作用し、Wnt シグナ

ルを増強する作用をもつことが明らかにされた。ヒトでの Wnt シグナルはその標的遺伝子である c-myc や cyclin D1 など細胞増殖遺伝子の転写を促進し、腫瘍化を引き起こすことが知られているため、パラフィブロミンは癌蛋白質としての作用を有していることが示唆される。

*Hrpt2* 欠損マウスは胚 6.5 日で致死であり、成体マウスで *Hrpt2* を欠損させると、体重が減少し、深刻な悪液質により 20 日以内に死に至る。このマウスでは内分泌器官を含む特定の臓器が正常マウスと比べ縮小しており、アポトーシスが認められる。*Hrpt2* 欠損マウスの胚線維芽細胞ではアポトーシスの促進、成長因子遺伝子の発現の減少が認められる。これらのことからパラフィブロミンは成長因子遺伝子発現を制御し、発生やアポトーシスの抑制に重要な役割を担っていると考えられる。

このようにパラフィブロミンの癌蛋白質としての作用を示唆する報告が近年増えてきている。本研究はパラフィブロミンと LT の相互作用による細胞増殖促進作用の発見に端を発し、パラフィブロミンの細胞増殖抑制機構および LT 存在下での細胞増殖促進機構を明らかにすべく、研究を行ってきた。本研究で同定したパラフィブロミンと LT の相互作用部位は、パラフィブロミンの LT 存在下での細胞増殖促進に関与している可能性がある。またマイクロアレイ解析および、リアルタイム RT-PCR によるパラフィブロミンにより発現変動を引き起こす因子の同定を試みたが、現在までに同定には至っていない。今後引き続き研究を行い、パラフィブロミンが関わる癌化機構の一端を明らかにすることが最大の課題である。また他にパラフィブロミンが癌蛋白質として作用する状況の同定やヒト Paf1 複合体の腫瘍化への関与などが今後の課題として挙げられる。



## 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 3 件)

- ① 岩田武男「副甲状腺機能亢進症-顎腫瘍症候群の原因産物パラフィブロミン」四国歯誌 21(2): 327-332, 2009 査読無
- ② 岩田武男、水澤典子、Hossain Md. Golam、吉本勝彦「癌抑制因子パラフィブロミンは SV40 large T 抗原存在下では細胞増殖促進に働く」ホルモンと臨床 Vol. 56 増刊号 147-155, 2008 査読無
- ③ Iwata T, Mizusawa N, Taketani Y, Itakura M, Yoshimoto K. Parafibromin tumor suppressor enhances cell growth in cells expressing SV40 large T antigen. Oncogene, 26, 6176-6183, 2007 査読有

[学会発表] (計 1 件)

- ① 岩田武男、水澤典子、竹谷豊、板倉光夫、吉本勝彦「副甲状腺癌抑制因子パラフィブロミンは SV40 large T 抗原存在下では細胞増殖促進に働く」第 32 回日本比較内分泌学会大会 2007 年 10 月 12-13 日 (日光)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩田 武男 (IWATA TAKEO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・助教

研究者番号：10350399