

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月29日現在

機関番号：17701  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2010～2012  
 課題番号：22590287  
 研究課題名（和文） 転写因子スネイルによる細胞のエネルギー代謝調節機構の解明  
 研究課題名（英文） Investigation of the regulatory mechanisms of cellular energy metabolism by snail

## 研究代表者

原口 みさ子 (HARAGUCHI MISAKO)  
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・准教授  
 研究者番号：10244229

研究成果の概要（和文）：スネイル（snail）は転写抑制因子であり、上皮-間葉変換 EMT を誘導する機能をもつ。低グルコース含有培地中では snail を発現させた MDCK（MDCK/snail）細胞は顕著に細胞死が誘導された。そこで、snail が細胞内の代謝調節に関わるか解析した。snail はピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼの発現を亢進させて酸化的リン酸化への進行を抑制すると考えられた。また脂肪酸代謝、アミノ酸代謝酵素の発現も抑制しており代謝を統合的に調節していると考えられた。

## 研究成果の概要（英文）：

Snail expression decreases oxidative phosphorylation and increases glucose dependency in MDCK cells. MDCK/Snail cells exhibited reduced activity of pyruvate dehydrogenase (PDH), which controls pyruvate entry into the TCA cycle, and increased promoter activity and expression of pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1), which inhibits PDH. In addition, the activities of TCA cycle enzymes were decreased in MDCK/snail cells. Consequently, MDCK/snail cells exhibited lower O<sub>2</sub> consumption and ATP levels than MDCK/neo cells. MDCK/snail cells also showed reduced expression of enzymes essential for glutaminolysis and fatty acid synthesis.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：1. Snail, 2. ピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ (PDK1) 3. VLCAD, 4. ATP  
クエン酸リアーゼ 5. ATP, 6. グルコース

## 1. 研究開始当初の背景

転写因子スネイルは細胞間接着因子カドヘリンの発現を抑制して上皮-間葉転換を誘導する機能を持ち、癌の転移などにも関与することが知られている因子である。我々はスネイルが MDCK 細胞のエネルギー代謝を変化させる機能をもつことを見出した。すなわち

- 1) 低濃度グルコース含有の DMEM 培地で培養した場合、スネイルを発現させた細胞 (MDCK/snail) 細胞は 48-72 時間で顕著な細胞死が誘導されることを見出した。この細胞死はグルコース添加により抑制された。
- 2) ATP 産生は顕著に低下しており細胞の酸素消費も低下していた。グルコースを添加しても ATP 産生の有意な亢進はみられなかった。
- 3) 種々のエネルギー代謝に関わる酵素の活性を調べたところ TCA 回路の酵素 4 種、電子伝達系に関わる複合体 2 種の活性が低下していた。そのために ATP 産生が低下したものと考えられる。
- 4) これらの酵素の発現を RT-PCR で調べたがコントロール細胞と差はなかった。
- 5) 亜鉛は SDH などの TCA 回路の酵素活性を阻害することが知られている。MDCK/snail 細胞は MDCK/neo 細胞に比較して細胞内亜鉛含量が高く亜鉛トランスポーター ZnT3, ZnT8 の発現が顕著に亢進していた。申請時にはスネイルが代謝に関わるという報告は全く見られず新規の知見であった。

## 2. 研究の目的

- 1) MDCK にスネイルを発現させた MDCK/snail 細胞では酸化的リン酸化に関わる酵素の活性が低下するのでその分子機構を解明する。
- 2) MDCK/snail 細胞は低グルコース培地では顕著に細胞死が誘導される。グルコースを添加した場合、生存が亢進する分子機構を明らかにする。

- 3) 癌細胞では ATP 産生の効率のよい酸化的リン酸化が低下し解糖系の亢進がみられる (ワールブルグ効果) がその詳細な意義はわかっていない。スネイルは種々の癌で発現が高くなっているワールブルグ効果におけるスネイル発現の寄与についても調べる。

## 3. 研究の方法

解糖系、酸化的リン酸化、電子伝達系、脂肪酸合成、脂肪酸代謝、アミノ酸代謝に関わる多数の酵素の発現と活性を snail を発現させた MDCK/snail 細胞とコントロール細胞で比較した。発現はウエスタンブロット法や RT-PCR 法で比較し、差があるものに関してはリアルタイム PCR で定量した。

またミトコンドリアの形態維持に関わる遺伝子の発現についても解析した。

さらに発現が亢進していた遺伝子 PDK1 についてはスネイルがその転写を直接誘導したのかプロモーターアッセイで調べた。

## 4. 研究成果

スネイルを発現させた MDCK/snail 細胞は解糖系から酸化的リン酸化への進行を決定する酵素であるピルビン酸デヒドロゲナーゼ (PDH) の活性が顕著に低下していることがわかった。RT-PCR で PDH の発現を調べたと

がPDHの発現は低下していなかった。PDHの活性はピルビン酸デヒドロゲナーゼキナーゼ(PDK1)によって厳密に抑制されている。そこで次にPDK1の発現を調べた。MDCK/snail細胞ではPDK1の発現が亢進していることがわかった。スネイルはPDK1の発現を転写レベルで亢進していることがプロモーター活性亢進によって明らかになった。PDK1発現亢進によってPDHの活性が低下し、酸化リン酸化が抑制されATP産生が低下するものと考えられた。MDCK/snail細胞はMDCK/neo細胞に比較して低酸素下での生存が亢進している。これは酸化リン酸化への依存が低下したためと考えられた。またMDCK/snail細胞はグルコース不含培地で培養した場合、グルタミン酸への依存が高まっていた。やグルタミン酸代謝に関わる酵素やグルタミントランスポートの発現を調べたところ、Glutamic Pyruvic Transaminase (GPT) および glutaminase 2 (GLS2)の発現が低下していた。グルタミンからグルタミン酸への変換が低下するためにグルタミン酸への依存が高まったと考えられた。さらに脂肪酸合成に関わる酵素、および脂肪酸代謝に関わる酵素の発現もRT-PCRによって解析した。脂肪酸β代謝の最初のステップである極長鎖アシルCoAの加水分解に関わる酵素である極長鎖アシルCoA脱水素酵素 VLCADの発現が低下していた。また細胞質のAcetyl-CoA産生に関わり脂肪酸合成の最初のステップであるATPクエン酸リアーゼの発現も低下していた。以上の結果よりスネイルは代謝を統合的に調節していると考えられた。スネイルがこれらの酵素の発現を転写レベルで直接抑制しているか今後プロモーター活性などで調べる必要がある。

##### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計4件)

1. \*[Haraguchi M](#), Indo HP, Iwasaki Y, Iwashita Y, Fukushige T, Majima HJ, Izumo K, Horiuchi M, Kanekura T, Furukawa T, [Ozawa M](#). Snail modulates cell metabolism in MDCK cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;432(4):618-25 doi: 10.1016/j.bbrc.2013.02.035. 査読有
2. Shimokawa M, [Haraguchi M](#), Kobayashi W, Higashi Y, Matsushita S, Kawai K, Kanekura T, [Ozawa M](#). The transcription factor Snail expressed in cutaneous squamous cell carcinoma induces epithelial-mesenchymal transition and down-regulates COX-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013; 430(3):1078-82. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.035 査読有
3. Kume K, [Haraguchi M](#), Hijioka H, Ishida T, Miyawaki A, Nakamura N, [Ozawa M](#) The transcription factor Snail enhanced the degradation of E-cadherin and desmoglein 2 in oral squamous cell carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;430(3):889-94 doi: 10.1016/j.bbrc.2012.12.060. 査読有
4. Tabata S, Ikeda R, Yamamoto M, Furukawa T, Kuramoto T, Takeda Y, Yamada K, [Haraguchi M](#), Nishioka Y, Sone S, Akiyama S. Thymidine phosphorylase enhances reactive oxygen species generation and interleukin-8 expression in human cancer cells. *Oncol Rep.* 2012;28(3):895-902. doi: 10.3892/or.2012.1887 査読有

[学会発表] (計3件)

1. Misako Haraguchi, Masayuki Ozawa. Snail reduces oxidative phosphorylation in MDCK cells. Keystone Symposia Conference Canada Banff, 2012, 2, 14

Snailによる細胞内代謝調節機構

原口みさ子、小澤政之，生化学会 2011, 9, 23 京都

Snailによる細胞内代謝の新規調節機構

原口みさ子、小澤政之，生化学会 2012, 12, 15 福岡

〔図書〕（計0件）

〔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  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

原口みさ子 (HARAGUCHI MISAKO)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・  
准教授  
研究者番号：10244229

### (2) 研究分担者

小澤政之 (OZAWA MASAYUKI)  
鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・  
教授  
研究者番号：90136854