

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658244

研究課題名(和文) 過塩素酸可溶性蛋白質を標的とした新規抗がん剤開発の基礎研究

研究課題名(英文) Fundamental studies for development of a novel anti-tumor drug based on perchloric acid-soluble protein

研究代表者

叶内 宏明 (KANOCHI, HIROAKI)

鹿児島大学・獣医学部・准教授

研究者番号：10351884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：過塩素酸可溶性蛋白質(PSP)は細胞増殖を抑制する。しかしPSPは増殖中の細胞にも存在しており、矛盾がある。ラット肝部分切除後に起こる細胞増殖の過程で3量体の割合が減少した。肝重量が切除前にまで戻ると再び3量体の割合が増えた。増殖時のPSPは高次構造が変化し、3量体でないPSPは細胞増殖を抑制する性質を持たない可能性が推測された。3量体を形成していない時期にPSPと結合する蛋白質を見いだした。PSPの転写開始および調節に必要な配列を明らかにし、PSPの発現を誘導する2種類の化合物を見いだした。これらの化合物は新規な抗がん剤の候補となった。

研究成果の概要(英文)：Perchloric acid-soluble protein (PSP) has an anti-proliferating activity. Its activity seems to be suppressed in cells, because the PSP exists in proliferating cells. Crystal structural analysis of PSP shows that PSP exist as a homo-trimer. Our preliminary experiment, however, suggested PSP existed not only trimer but also monomer or dimer. To elucidate that changing higher-order protein structure of PSP is related to cell proliferation, we evaluated the state of higher-order protein structure of PSP during liver regeneration after partial hepatectomy in rats. As a result, PSP existed as trimer in normal liver, but the ratio of trimer of PSP decreased after hepatectomy and the ration of monomer or dimer of PSP increased until liver weight returned to the intact weight. It is suspected monomer or dimer PSP not to suppress cell proliferation. Additionally, we identified the DNA position for expression and regulation of PSP mRNA. We identified two molecules to induce PSP expression.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：ガン細胞 細胞増殖 タンパク質高次構造変化

1. 研究開始当初の背景

近年、有効な抗がん剤がいくつか開発され、臨床で奏功している。しかし、効果が認められない患者や、効果が認められてもその効果が徐々に弱くなるなどの問題が依然として残っているため、現在も抗がん剤開発は盛んに進められている。過塩素酸可溶性タンパク質 (PSP) は分子量約 14K の生理機能未知な蛋白質として同定された。PSP 遺伝子はバクテリアからヒトに至るまで様々な生物種に保存されている。これまで、正常組織に比べてがん組織で PSP 発現が顕著に低いこと、PSP を培養細胞に過剰発現させると増殖が抑制されること、ニワトリ胚に PSP 中和抗体を注入すると、胚細胞の過増殖が起こり胎生致死となること等を明かにし、PSP が細胞増殖抑制作用を持つことを報告してきた。PSP の細胞増殖抑制作用はこれまでに報告例のないリボヌクレアーゼ活性によることが明かにされており、新たな抗がん剤開発の標的になるのではないかとこの発想に至った。注目すべきは、株化細胞は PSP を発現しているにも関わらず増殖するため、PSP の細胞増殖抑制作用は蛋白質レベルで調節されている可能性である。結晶構造解析から PSP は三量体を形成することが報告されているが、培養細胞では単量体として存在することを見出している。PSP は異常プリオンと非常に良く似た高次構造をしており、プリオン蛋白質のように劇的な構造変化が細胞内で起こっている可能性、PSP 構造変化が細胞増殖の調節に関わっている可能性がある。国外では原核生物の PSP 機能の研究が盛んに行われ、PSP が分岐鎖アミノ酸合成途中の分子と結合することが明かにされているが、哺乳動物の PSP 研究は進んでいない。

2. 研究の目的

過塩素酸可溶性タンパク質 (PSP) を標的とした抗がん剤の開発を目的としている。肝臓や腎臓の正常組織で発現が高いが、それら腫瘍組織での発現は極めて低い。肝臓がん株化細胞に PSP を強制発現させると増殖の抑制が起こるため、PSP は増殖抑制作用を持つと示唆されている。しかし、正常株化細胞では PSP を発現しているにもかかわらず増殖する矛盾があるため、PSP の増殖抑制活性は蛋白質レベルで活性調節が行われていると推測されている。目的を達成するため、本研究では以下の3つを目標とした。

- 1) PSP 高次構造と細胞増殖抑制活性の関係
- 2) PSP の高次構造変化に関わる分子の探索
- 3) PSP の発現を誘導する分子の探索

3. 研究の方法

(1) 高次構造と細胞増殖抑制の関係

イソフルレン吸引による麻酔下、12匹の6週齢雄 SD ラットから 2/3 の肝臓を部分切除し、術後 0、1、2、4、7 日に屠殺し肝臓を採材した。また、偽処置を施したラットも同様

に準備した。肝臓重量を測定した後、液体窒素で凍結した。肝臓はプロテアーゼ阻害剤カクテル (complete Mini, Roche) およびフォスファターゼ阻害剤 (PhosSTOP, Roche) を含む 10 倍量 RIPA buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5%NP40, 1% sodium deoxycholate, 0.1%SDS, 1 mM EDTA pH 8) 中でポリトロンを用いてホモゲナイズし、10,000g で 30 分間遠心した上清を肝ホモジネートとし、以降の実験に用いた。

肝ホモジネートは SephadexTM G-100 (Amersham Biosciences, 7 x 310 mm) カラムを用いて分画し 280 nm の吸光度をグラフ化した。各画分をウェスタンブロッティングに供して PSP を検出した。各画分の分子量の推定は native PAGE 用第一マーカのピークから、また、肝ホモジネートにミオグロビン (17K) とオボアルブミン (44K) を添加したサンプルをカラムに供した。それら蛋白質をウェスタンブロッティングで検出し、各画分が含む分子量を推定した。

(2) PSP の高次構造変化に関わる分子の探索

100 μ M サルファグアニジン (Sigma) を 96 well dish に播種 (4×10^3 cells/well) したラット正常肝臓細胞株 RLN-10 に添加し、24、48 および 72 時間後の細胞数を MTT assay で評価した。

肝ホモジネートに 100 μ M サルファグアニジンを添加し 30 分間室温で放置した。その溶液をショ糖密度勾配 (0、5、15、25、35%) の上に重層し、70,000 rpm で 2 時間遠心した (CS120GXL, Hitachi)。下層から 500 mL ずつ回収し、それぞれをトリクロロ酢酸で蛋白質を沈殿させ、ウェスタンブロッティングで PSP を検出した。

肝ホモジネートをサンプルとし抗 PSP 抗体で免疫沈降 (Dynabeads、ベリタス) を行った。得られたサンプルは Mini-PROTEAN TGX 4-20% Precast Gel で分離した。銀染色で得られたバンドを切出し、In gel digestion (trypsin, プロメガ) を行った。得られたペプチドは LC-MS/MS (HCT、ブルカーダルトニクス) で質量を測定し、Mascot を用いて質量データから蛋白質を同定した。

抗 glucose-6-phosphate isomerase、抗 cytochrome P450 2D4 (CYP2D4) 抗体はそれぞれ Santa Cruz から購入した。

(3) PSP 発現を誘導する分子の探索

マウス肝臓から total RNA を抽出し、直ちに GeneRacer kit (Life Technologies) を用いて完全長の cDNA を作製した。PSP mRNA の 5' 領域の配列を DNA シーケンサーで読取した。pGL4.10 vector (Promega)、pGL4.73HSV-TK vector (Promega) は JM109 (TAKARA) に導入し、大腸菌からの vector 精製は Mini Kit もしくは Midi Kit (キアゲン) を用いた。pGL4.10 vector への遺伝子組換えは In-fusion HD cloning Kit (TAKARA) を用いた。ベクター

を EcoRV で切断し、EcoRV を含むプライマーで増幅した様々なサイズの PSP 上流配列を vector に組込んだ。転写開始点から上流 2000bp の配列を組込んだ pGL4.0 ベクターを 96well に 1×10^5 cells/well となるように播種したマウス肝 Hepa1-6 細胞に TransIT-X2 (Mirus) 導入した。導入翌日に理化学研究所から購入した「標準化合物ライブラリー」各化合物を $1 \mu\text{M}$ になるよう添加し、22 時間培養した。終濃度 10% となるように AlamerBlue (Thermo) を添加して 2 時間培養した後に 600nm および 550nm の吸光度を測定した。Well から培養液を取り除いた後、細胞を融解し、ホタルルシフェラーゼ活性およびウミホタルルシフェラーゼ活性を Dual-Glo Luciferase Assay System (Promega) を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) 細胞増殖期および増殖停止期における PSP 高次構造

ラット部分肝切除モデルを用いて、生体内における細胞増殖期での PSP の高次構造変化を検証した。図 1 左上に摘出後の肝臓重量変化を示した。術後 4 日目にはほぼ術前の肝臓重量に回復していた。0、1、2、4 および 7 日目の肝臓ホモジネートを作製し、ゲル濾過クロマトグラフィーで分画後の画分に含まれる PSP をウェスタンブロッティングにて検出した (図 1 左下)。術前において PSP は単量体が含まれる画分 (17k 以下) にバンドは認められず、二量体以上の多量体で存在していることが示唆された。術後 1 日目以降細胞増殖がほぼ停止したと思われる 4 日目まで、単量体が含まれる画分に PSP が検出された。各バンドの濃さを数値化シグラフ化した (図 1 右)。術後 1 および 2 日目では 44K 以上の高分子量 PSP の割合が減少していた。これらの結果は増殖が停止している状態において PSP は二量体以上の高分子を形成していること、増殖が盛んな細胞では単量体として存在することを示唆している。高次構造変化に PSP のリン酸化が関与するかを検討したが、いずれの状態においてもリン酸化は認められなかった。また、PSP 蛋白質の免疫組織化学的検討を行ったが、核内への移行などの細胞内局在に変化は認められなかった。

(2) PSP に結合するサルファグアニジンが高次構造に及ぼす影響

The Molecular Operating Environment の分子表面解析機能および低分子ドッキングシミュレーション機能を用いて PSP に結合しうる分子を探索し、サルファグアニジンを見いだしている。RLN 細胞にサルファグアニジンを添加した場合、コンフルエント時の細胞密度が有意に高くなる。すなわち、サルファグアニジンは細胞接着による細胞増殖停止を抑制する性質を持つことを見いだした。サルファグアニジンが PSP の高次構造に影響を

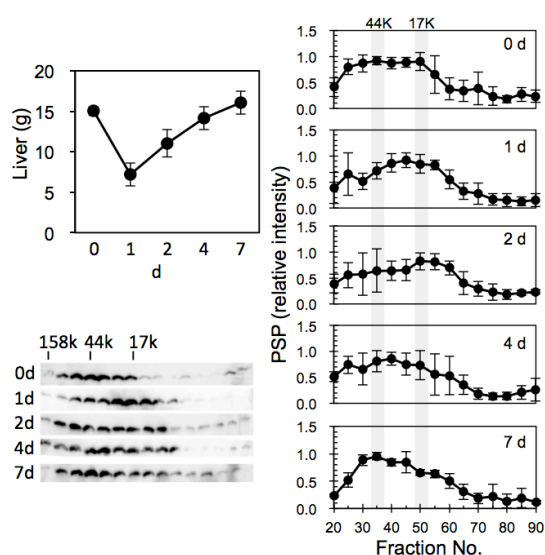


図 1 肝再生時における PSP の高次構造変化

与えるかを検討するため、増殖期 (肝摘出後 2 日目) および増殖停止期 (未処置) の肝臓ホモジネートに $100 \mu\text{M}$ サルファグアニジンを添加した後に PSP が単量体もしくは多量体へ変化するか検討した。しかし、PSP 分子量のパターンに変化は全く認められなかった。

(3) PSP と相互作用する分子の探索

3 量体を形成した PSP は非常に安定で他の蛋白質と相互作用を起こさない可能性が酵母 two hybrid スクリーニングの結果から示唆されていたため、肝切除後に起こる 3 量体を形成していない状態の PSP にフォーカスした。肝細胞増殖中のホモジネートをサンプルとし抗 PSP 抗体で免疫沈降を行い、SDS-PAGE で分離、銀染色にて現れた 2 つのバンドを切出した。トリプシンを用いたゲル内消化およびゲル片から抽出したペプチドを LC-MS/MS で質量を測定した。得られた質量データから、それぞれの蛋白質は glucose-6-phosphate isomerase (GPI) および chytochrome P450 2D4 (CYP2D4) であることが推測された。肝切除後 0、1、2、4 および 7 日目のホモジネートについて抗 PSP 抗体による免疫沈降を行い、それぞれの抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った (図 2)。GPI は肝切除後 1 日目および 2 日目に CYP2D4 は切除後 2 日目から 4 日目に PSP と相互作用していることが示唆された。これらの蛋白質が PSP の高次構造に影響を与えているか、もしくは PSP の生理作用に関係するかの検討は今後の課題である。

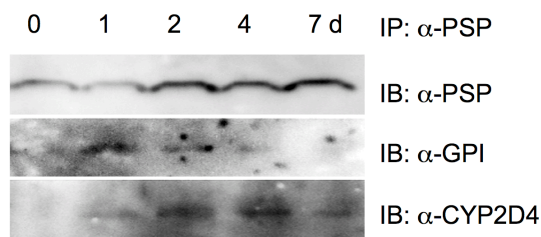


図 2 PSP と相互作用する蛋白質

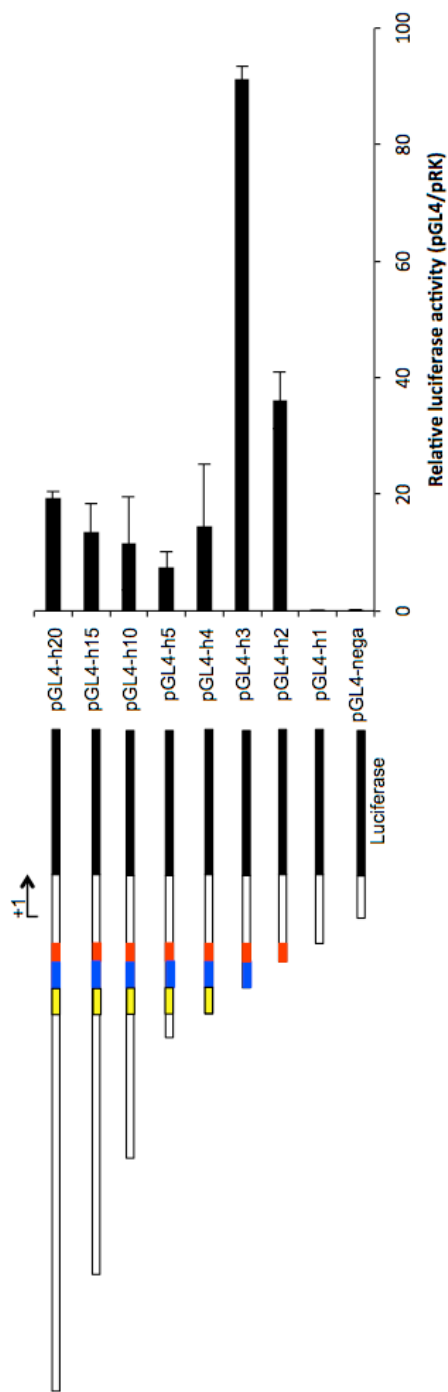


図3 PSPの発現を調節する転写調節領域

(4) PSP発現を誘導する分子の探索

PSP発現を評価するためのレポーターベクターを作製するため、まずはPSP遺伝子の転写開始点を検討した。その結果、翻訳開始点から73塩基上流であることを明らかにした。そこで転写開始点から上流側に100、200、300、400、500、1000、1500もしくは2000塩基対を組込んだpGL4ベクターおよびnegative controlとして転写開始点からの配列を組込んだpGL4ベクターを作製した。ウミシイタケルシフェラーゼを発現するコントロールベクターに対する比活性を図3に示した。その結果、転写開始点上流側100-200塩基がPSP発現に重要なコア領域であることを明らか

にした。また-200~-300 bpにPSP発現を増強する配列、-300~-400bpにPSP発現を抑制する配列が存在することが示唆された。細胞密度が高くなるとPSP発現が誘導されることが明らかとなっている。レポーターアッセイにおいても同様な結果が認められた。転写開始点から500bp以上上流配列を含む全てにおいて、細胞密度上昇に伴い活性が高くなったため、200-500塩基までに細胞密度に応答した発現に関わる領域が存在すると推測される。

転写開始点から2000塩基上流までを含むレポーター遺伝子を導入した細胞に理化学研究所から購入したauthentic libraryをそれぞれ1 μ M添加し、24時間後のルシフェラーゼ活性を測定した。また、細胞毒性が認められる化合物が存在することから、pGL4.73HSV-TKの活性を対照にするだけでなく、AlamerBlue assayによって得られた細胞数も対照とした。その結果、2倍および1.5倍に活性が増大する分子をそれぞれ1つずつ見いだしている。一方、発現を抑制する物質として、staurosporineおよびamiodaroneを見いだした。これらの物質によるPSP発現への影響の詳細およびin vivoにおいてがん細胞の増殖抑制効果について今後検証が必要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

① Kanouchi H. Low pyridoxine concentrations enhance lipopolysaccharide-stimulated gene expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in RAW264.7 cells. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 59(6):548-51 (2013) (査読有)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24477252>

② Fujiki Y, Hirashima Y, Seshimo S, Okamoto T, Sugimoto Y, Matsumoto M, Oka T, Kanouchi H. Homocysteine induced SH-SY5Y apoptosis through activation of NADPH oxidase in U251-MG cells. *Neurosci. Res.*, 72(1):9-15 (2012) (査読有)
doi: 10.1016/j.neures.2011.09.010

③ Nakari M, Kanouchi H, Oka T. High Dose of Pyridoxine Induces IGFBP-1 mRNA Expression in MCF-7 Cells and Its Induction is Inhibited by the p53-specific Inhibitor Pifithrin- α . *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 57(4):280-284 (2011) (査読有)
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22041910>

[その他]

ホームページ

<http://www.vet.kagoshima-u.ac.jp/kadai/V-Mol/bunshibyoutai01/Welcom.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

叶内 宏明 (KANOUCHI, Hiroaki)
鹿児島大学・共同獣医学部・准教授
研究者番号：10351884

(2) 研究分担者

藤木 誠 (FUJIKI, Makoto)
鹿児島大学・共同獣医学部・准教授
研究者番号：60305167

(3) 連携研究者

刀祢 重信 (TONE, Shigenobu)
川崎医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70211399