

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月11日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659335

研究課題名（和文）ナノ磁性ビーズによる癌抑制遺伝子 p21 の活性化に有用な
癌予防標的分子の同定研究課題名（英文）Identification of the cancer preventive targets useful for
activating the tumor suppressive gene p21

研究代表者

飯泉 陽介 (IIZUMI YOSUKE)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：20533178

研究成果の概要（和文）：

最も重要な癌抑制遺伝子の一つである p53 は、p21 の発現を増強することで発癌を抑制している。これまでの研究で、p53 が失活している癌細胞に対して、複数の食品成分が p21 の発現を増強することが明らかになっていた。本研究では、これらの食品成分に共通して結合する蛋白をナノ磁性ビーズと質量分析計を用いて同定し、p21 の発現との関係を調べた。残念ながら、共通で結合する蛋白は p21 の発現に関係していなかった。しかし、食品成分に共通で結合してくる蛋白の中に、癌で高頻度に活性化している Akt 蛋白の発現と癌細胞の増殖を制御している蛋白を見出すことに成功した。

研究成果の概要（英文）：

p53, one of the tumor suppressor genes, inhibits carcinogenesis by upregulating p21. Until now, we clarified that a few of compounds in food induced p21 in p53-mutated cancer cells. In the present study, we identified the proteins which bound to these compounds and examined whether the binding proteins were related to p21 expression. Unfortunately, there was not the relation between these proteins and p21 expression. However, we found that one of the binding proteins regulated the growth of cancer cells and Akt, which is frequently activated in cancer cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：癌予防、ケミカルバイオロジー

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：ケミカルバイオロジー、ナノ磁性ビーズ、癌予防、標的分子、p21

1. 研究開始当初の背景

ヒト悪性腫瘍の約半数において失活している代表的な癌抑制遺伝子 p53 は、p21 を発現誘導することで癌細胞の細胞周期を停止させ、増殖を抑制する。また、p21 ノックアウトマウスは、正常マウスに比べて癌に罹患しやすいことから (Cancer Res., 2001, 61, 6234)、p21 が発癌抑制、癌予防において重要

であることは明らかである。研究代表者が所属する教室では、このような p21 の重要性に着目し、p53 が失活している癌細胞に対して p21 を発現誘導し、癌の増殖を抑制できる食品成分を複数見出してきた。しかし、これらの食品成分が細胞内のどの分子を直接標的として、p21 を発現誘導しているかについては、明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

研究代表者が所属する教室で見出されてきた p21 を発現誘導できる食品成分アピゲニン (Int J Oncol., 2005, 26, 185)、フコキサンチン (Biochim Biophys Acta, 2005, 1726, 328)、アルテピリン C (Mol Carcinog., 2005, 44, 293) の癌細胞内での結合蛋白を探索することで、これらの食品成分が細胞内のどの分子を標的として、p21 を発現誘導できるのか明らかにする。これらの食品成分の結合蛋白は、薬剤結合蛋白精製用のナノ磁性ビーズを用いて精製し、質量分析計 (MALDI-TOF MS) を用いて同定する。そして、RNAi 法などの種々の分子生物学的手法を用いて、同定された結合蛋白と p21 の発現誘導との関係を精査し、食品成分が p21 を発現誘導するときに重要な標的分子を見出すことを目的とした (図 1)。

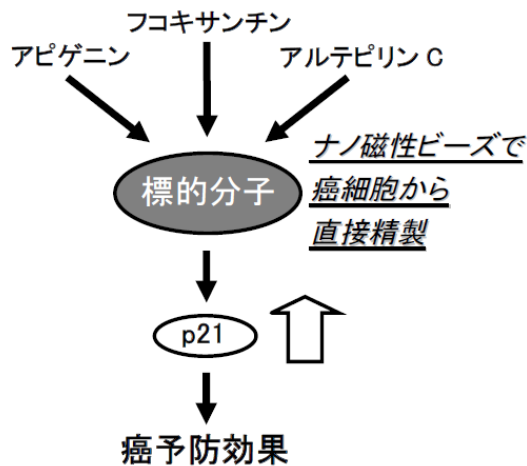


図1. ナノ磁性ビーズを用いた p21 発現誘導の要となる標的分子の精製、同定

3. 研究の方法

(1) 食品成分による p21 発現誘導の確認

大腸癌細胞株 HT-29 に食品成分であるアピゲニン、フコキサンチン、アルテピリン C それぞれを添加し、24 時間後に細胞を回収し、RIPA buffer を用いて細胞を溶解した。そして、Western blotting により p21 の発現を検出した。

(2) ナノ磁性ビーズへの食品成分の固定化と結合蛋白の精製

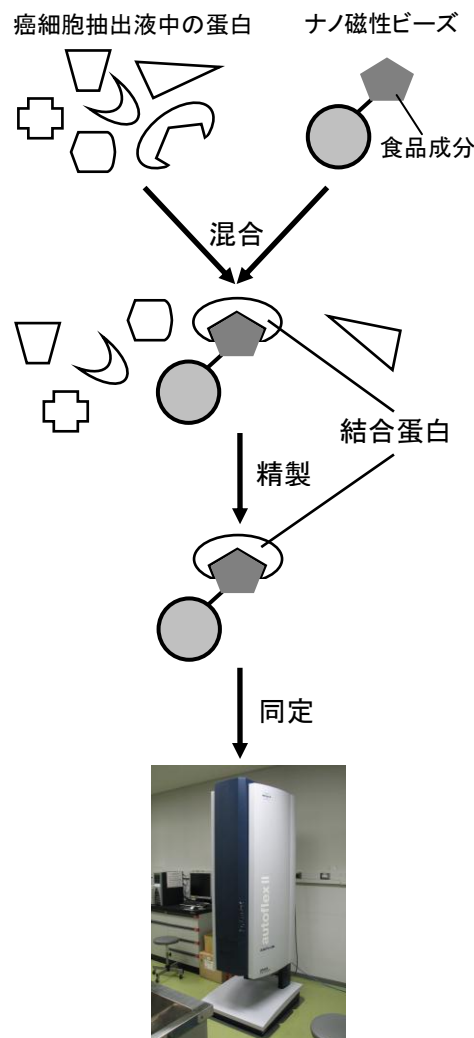
ナノ磁性ビーズへの固定化に関しては、各々の食品成分が有する官能基に適した固定化法を用いた。アピゲニンは、炭酸カリウムを触媒として、エポキシ基を有するナノ磁性ビーズ (多摩川精機株式会社) に、アピゲニンのフェノール性水酸基を介して固定化した。アルテピリン C は、HOBt とカルボジイミドを触媒として、アミノ基を有するナノ磁性

ビーズに、アルテピリン C のカルボキシル基を反応させて固定化した。フコキサンチンに関しては、独自で開発した固定化法 (unpublished data) を用いてナノ磁性ビーズに固定化した。

HT-29 細胞を lysis buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.0]、150 mM NaCl、1% NP-40、1 mM DTT、0.5 mM PMSF) に溶解し、HT-29 細胞抽出液を作製した。そして、この細胞抽出液と各々の食品成分を固定化したナノ磁性ビーズを混合し、4°C で 4 時間反応させた。そして、3 回 lysis buffer で洗浄したのち、SDS sample buffer により、これらのビーズに結合した蛋白を溶出した。

(3) 質量分析計 (MALDI-TOF MS) による食品成分結合蛋白の同定

(2) で溶出した結合蛋白を SDS-PAGE により分子量で分画し、銀染色にて検出した。



質量分析計 (MALDI-TOF MS)

図2. ナノ磁性ビーズを用いた食品成分結合蛋白の精製と同定

検出された蛋白を切り出し、脱色、乾燥した。その後、このゲル片を還元アルキル化したのち、修飾トリプシン(Promega)をゲル片にしみ込ませ、ゲル内消化を行った。消化されてきたペプチド断片を抽出し、ZipTip(Millipore)を用いて脱塩・濃縮し、AnchorChip(Bruker Daltonics)上で乾燥させた。そして、MALDI-TOF MS(Autoflex II, Bruker Daltonics)を用いて、ペプチド断片の分子量を測定した。その後、見出されたペプチド断片の情報より、結合蛋白を同定した(図2)。

(4) RNAi法を用いた食品成分結合蛋白と p21、Akt の発現の関係の検証

結合蛋白に対して特異的に設計された Stealth siRNA(Invitrogen)を RNAiMAX(Invitrogen)を用いて HT-29 細胞に導入した。導入後、48 時間または 72 時間後に細胞を回収し、RIPA buffer を用いて細胞を溶解した。そして、Western blotting により結合蛋白と p21、Akt の発現を検出した。

4. 研究成果

(1) 食品成分による p21 発現誘導の確認

HT-29 細胞に、アピゲニン、フコキサンチン、アルテピリン C それぞれを添加し、p21 の発現を Western blotting により検出した。すると、3 種の食品成分すべてで p21 の発現誘導が確認された。このことから、HT-29 細胞の中には、食品成分が直接標的とし p21 の発現誘導に必須となる蛋白が存在することが確認できた。

(2) 食品成分固定化ナノ磁性ビーズを用いた食品成分結合蛋白の精製と同定

アピゲニン、フコキサンチン、アルテピリン C を、それぞれが有する官能基に適した固定化法を用いて、ナノ磁性ビーズに固定化した。そして、(1) で目的とする標的蛋白の存在が明らかになった HT-29 細胞の細胞抽出液と、これらの食品成分固定化ビーズを混合して、食品成分結合蛋白を精製し、銀染色により検出した。

すると、アピゲニン、フコキサンチン、アルテピリン C の 3 種に共通する結合蛋白を 1 つ見出した。また、アピゲニンとフコキサンチンの 2 種に共通する結合蛋白として 3 つ見出された。これら 4 つの結合蛋白を、MALDI-TOF MS を用いて同定することに成功した。

(3) 結合蛋白と p21 の発現の関係

(2) で同定された 3 種の食品成分に共通する結合蛋白

(apigenin-fucoanthin-artepillin C

binding protein 1:AFCBP1) に特異的に設計された siRNA を HT-29 細胞に導入することで、この結合蛋白を発現抑制した。しかし、結合蛋白の発現が抑制されているのにも関わらず、p21 の発現に変動は見られなかった(図3)。このことは、本研究で見出された食品成分の結合蛋白が p21 の発現に影響を与えない蛋白であることを示している。

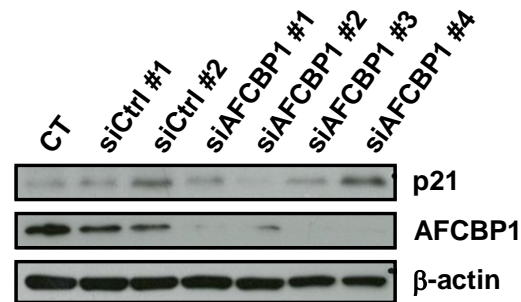


図3. AFCBP1 の発現抑制は p21 の発現に影響を与えない

(4) 結合蛋白と細胞増殖、Akt 経路の関係

4 つの結合蛋白の発現抑制を行っている過程で、アピゲニンとフコキサンチンの 2 種に共通で結合する蛋白 (apigenin-fucoanthin binding protein 1:AFCBP1) に関して、その発現抑制により HT-29 細胞の増殖が抑制されることがわかった。さらに、癌細胞の増殖に大きく関わっている蛋白を中心に発現量を Western blotting により解析した。すると、この結合蛋白のノックダウンにより、癌細胞で高頻度に活性化していることが知られている PI3K-Akt 経路の Akt 蛋白(リン酸化酵素)の発現が抑制されることが明らかになった(図4)。

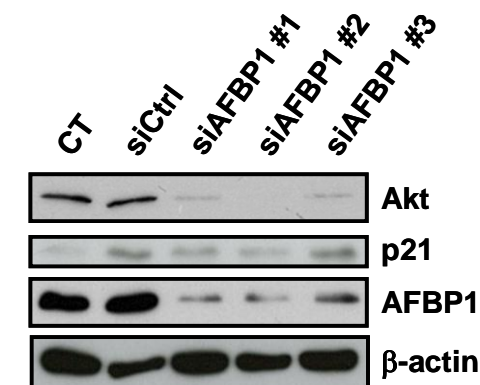


図4. AFCBP1 の発現抑制は Akt の発現を減少させる

(5) 本研究成果の意義

今回、当初目的としていた食品成分が p21 の発現を増強する上で要となる標的蛋白を

発見することができなかった。このことから、今回用いた食品成分にはそれぞれ異なる p21 の発現増強機構が存在し、それぞれ違う標的蛋白を介して p21 を発現誘導していることが考えられる。しかし、アピゲニンとフコキシサンチンが共に標的とする蛋白に対して、Akt 蛋白の発現を制御している活性を見出せたことは大きかった。今後の解析により、食品成分による PI3K-Akt 経路の阻害の詳細な分子機構が明らかになるかもしれない。

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 1 件)

1. Masakatsu Oishi*, Yosuke Iizumi*, Tomoyuki Taniguchi, Wakana Goi, Tsuneharu Miki, and Toshiyuki Sakai. (*Co-first author) "Apigenin sensitizes prostate cancer cells to Apo2L/TRAIL by targeting adenine nucleotide translocase-2." PLOS ONE, 8 (2), e55922, 2013. 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0055922

[学会発表] (計 0 件)

[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

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/pubmed/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯泉 陽介 (IIZUMI YOSUKE)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：20533178

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし