

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：「基盤研究 (C)」

研究期間：2007～2008 年

課題番号：19590074

研究課題名 (和文) 核小体型グルタチオンペルオキシダーゼ (PHGPx) による細胞増殖抑制機構の解明

研究課題名 (英文) Mechanism of the suppression of cell cycle by the overexpression of nucleolar phospholipids hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx)

研究代表者

中川 靖一 (NAKAGAWA YASUHITO)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：00119603

研究成果の概要：

リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ (PHGPx) は脂質ヒドロペルオキシドを直接還元できる細胞内唯一の酵素である。Thymidine 同調培養時で核小体型 PHGPx 高発現株である N63 細胞、N120 細胞では、G<sub>1</sub> 期で停止した。核小体型 PHGPx による細胞増殖抑制のメカニズムについて詳細な解析を行った。G<sub>1</sub> 期から S 期への移行に必要な Rb の Ser780 のリン酸化は核小体型 PHGPx 高発現株では、S1 細胞と比較して、Rb の Ser780 のリン酸化が抑制されていた。Rb のリン酸化に関わるサイクリン D1-CDK4 の発現について検討したところ、CDK4 の発現には変化はないが、サイクリン D1 の mRNA、およびタンパク質の発現、活性が N63 細胞、N120 細胞で著しく抑制されていた。サイクリン D1 の発現低下のメカニズムについて検討した。

核小体型 PHGPx が癌形成を抑制するのかどうかについて検討した。in vitro において、癌細胞で特徴的な足場非依存性増殖能の解析を行ったところ、核小体型 PHGPx 高発現株のみでコロニー形成が抑制され、そこで次に、ヌードマウスに核小体型 PHGPx 高発現株を皮下注射し、腫瘍形成能について検討した。その結果、核小体型 PHGPx 高発現株では S1 細胞に比べて著しく腫瘍形成を抑制した。また、核小体型 PHGPx の腫瘍形成抑制能は、癌細胞の Thymidine の前処理の有無に関わらず観察された。

交付額

(金額単位：円)

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 19 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 20 年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度    |           |         |           |
| 年度    |           |         |           |
| 年度    |           |         |           |
| 総計    | 2,900,000 | 870,000 | 3,770,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：グルタチオンペルオキシダーゼ、細胞周期、サイクリン、RB タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

近年、バイオシグナルである活性酸素産生を制御する抗酸化酵素は活性酸素毒性を消去するだけでなく、生理機能を制御する因子としても捉えられている。リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチオンペルオキシダーゼ (PHGPx) は脂質過酸化物を消去できる細胞内の唯一の抗酸化酵素である。PHGPx はアポトーシス、発生、精子形成などに係るなど、他の抗酸化酵素とは見られないさまざまな生理機能を示すことが明らかになってきており、今日では、抗酸化酵素の中でも PHGPx 研究は注目を集めている。

申請者らは一つの PHGPx 遺伝子から非ミトコンドリア型、ミトコンドリア型、核小体型の3つの PHGPx サブタイプが生成し、それぞれのサブタイプは異なった生理機能を持つことが明らかとなった。非ミトコンドリア型 PHGPx はプロスタグランジンやロイコトリエン、血小板活性化因子などの脂質性メディエーター産生を制御すること (J. Bio. Chem. 273, 1990 (1998) :275, 40028 (2000) : J. Bio. Chem. 277, 5043 (2002))、また、ミトコンドリア型 PHGPx はミトコンドリア特有の脂質の過酸化を阻止し、アポトーシスを抑制することを明らかとした (Biochem. J. 371, 799 (2003))。さらに、重度の男性不妊患者の約30%は精子中の PHGPx の発現が著しく低下し、精子数が極めて少ないことから、精子形成への PHGPx の関与が示された (Biology reproduction 64, 674 (2001))。PHGPx をノックアウト (KO) すると、多くの抗酸化酵素とは異なり、胎生致死と

なった。 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 305, 278 (2003))。最近、申請者らは核小体型 PHGPx 高発現株の増殖が親株に比較して、著しく遅くなり、同調培養をすることにより、G1で停止していることを見いだした。このような現象は他の PHGPx サブタイプでは見られない。これらのことは核小体型 PHGPx が細胞の分化、発生、増殖に関与していることを示唆している。こうした背景から、発生、分化、増殖の基本となる細胞分裂と PHGPx について検討することとした。

## 2. 研究の目的

- ① 核小体型 PHGPx 高発現細胞での、増殖抑制の分子機構について明らかにするため、G1 期停止に深く係る RB タンパク質やサイクリン D<sub>1</sub>などを主な標的分子として活性に対する影響について検討する。
- ② 増殖系、非増殖系での核小体型 PHGPx と細胞周期制御因子の発現変動との相関

精子、血球細胞などの分化、老化、発ガンの過程での核小体型 PHGPx の発現と細胞増殖との関連を調べ、核小体型 PHGPx の生理的意義を明らかにする。ガン増殖と核小体型 PHGPx 発現との関連が見られれば、ガン細胞を移植したヌードマウスに PHGPx を注入し、増殖への影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) 核小体型 PHGPx 高発現細胞の増殖抑制機構の解析

細胞周期の制御に關与するサイクリン D<sub>1</sub> D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>の発現や図 1 に示したような細胞周期関連タンパク質の発現変動について調べる。細胞周期の制御因子の mRNA の転写レベルでの制御するユビキチン・プロテアソームタンパク質分解系、核と細胞質のオルガネラ輸送系についても検討する。よるプロット法、ユビキチンリガーゼ活性を測定する。

(2) 同調培養時の核小体型PHGPxのRB蛋白質リン酸化の抑制機構の解析

RB 蛋白質の活性制御はサイクリン D-CDK4/6 複合体で行われる。この活性は図 1 に示す 4 つの経路で主に調節されている。同調培養時に核小体型 PHGPx がこれらのどの経路を抑制して RB のリン酸化による活性制御しているのかについて検討する。

- I) p 16INK および p 21 によるサイクリン D-CDK4/6 複合体活性抑制経路 (経路①、②)
- ii) Clip/Kip ( p 27 ) によるサイクリン D-CDK4/6 複合体安定化 (経路③)、iii) サイクリン D の分解系、発現制御 (経路④)、上記 3 つの経路については主に關連する抗体による発現量の変化について解析する。iv) サイクリン D-CDK4/6 複合体そのものの活性変動について、抗 CDK4 抗体による核蛋白質の免疫沈降により沈降させたサイクリン D-CDK4/6 複合体の RB リン酸化活性を測定する。

4. 研究成果

(1) 核小体型 PHGPx による細胞周期停止時期の分子解析

① 核小体型 PHGPx における Thymidine 同調後の細胞周期停止時期の解析

核小体型 PHGPx の高発現株である N63 細胞を Thymidine 処理により同調培養を行う

と、細胞増殖が抑制される。PHGPx 高発現細胞は 3 時間で S 期へ移行し、6 時間で G<sub>2</sub>/M 期、9 時間で G<sub>1</sub> 期へ戻ったが、15 時間では S 期へ移行しなかった。さらに 18 時間から 24 時間目まで G<sub>1</sub> 期で停止した。N63 細胞は細胞周期を一周した後、細胞の集団が G<sub>1</sub> 期で停止していることが明らかとなった。この S 期停止は核の細胞質に PHGPx が高く発

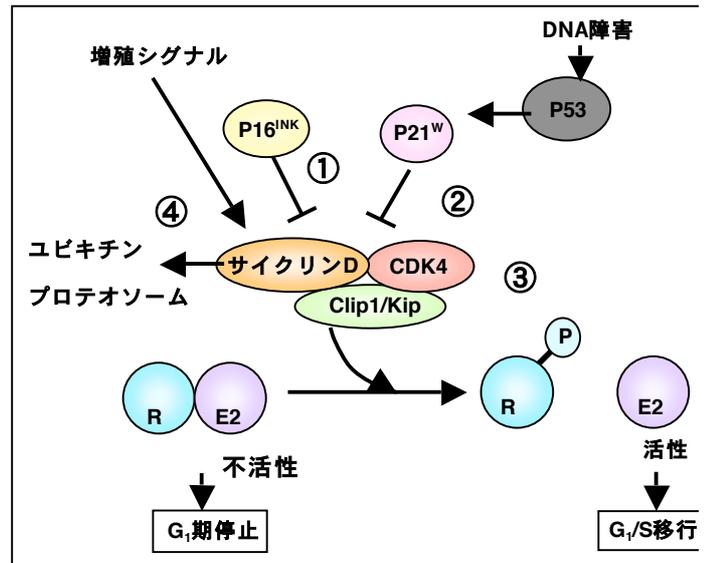


図1 G<sub>1</sub>/S移行期におけるRBタンパク質のリン酸化機構

現している非ミトコンドリア型 PHGPx の高発現株である L9 細胞やミトコンドリアに PHGPx を高発現させた M15 細胞では観察されなかった。

②サイクリン D および CDK6 に関する解析

外界からの増殖刺激を受けて G<sub>1</sub> 期の最初に誘導されてくる G<sub>1</sub> サイクリンのサイクリン D には、これまでに 3 つの分子種が知られている。S 期への移行に關与しているのがサイクリン D1 である。これらの分子種の核内における発現変動について、Thymidine 処理後の同調培養の時間経過に伴って検討した。PHGPx を高発現していない S1 細胞ではサイクリン D1 は細胞周期にそって、S 期直前

に相当する 2~4 時間、9 時間、21 時間と増加が見られたが、サイクリン D2 およびサイクリン D3 では初めの 2~6 時間での顕著な増加が確認されたが、それ以外は減少した。一方、N63 細胞はサイクリン D1 の発現が非常に低くなっていた。一方、サイクリン D3 は S1 細胞と比較して発現が上昇しており、細胞増殖の停止した 15 時間以降さらに増大した。サイクリン D と複合体を形成しキナーゼ活性を示す CDK6 については、S1 および N63 細胞間で発現の変動は見られなかった。

### ③ pRb のリン酸化体の解析

細胞周期の G<sub>1</sub> 期から S 期への移行の際に、サイクリン D1-CDK4/6 複合体により pRb の Ser780 がリン酸化されることが知られている(図 1)。S1 細胞ではサイクリン D1-CDK4/6 複合体によりリン酸化される、Ser780 のリン酸化体は S 期より前にリン酸化が起きることが確認された。N63 細胞では未処理では Ser780 はリン酸化されていたが、G<sub>1</sub> 期で停止した後、リン酸化の亢進は見られなかった。このことは pRb のリン酸化の抑制により、N63 細胞では G<sub>1</sub> 期から S 期への移行が停止していることを示唆している。

### ④ p16 の発現の解析

p16<sup>INK4a</sup> はストレスや老化などの際に誘導されて、CDK4/6 と結合することによりサイクリン D1 を遊離させ、CDK4/6 による pRb のリン酸化活性を低下させ増殖を抑制することが報告されている。核小体型 PHGPx の高発現株による G<sub>1</sub> 期停止に、p16<sup>INK4a</sup> の発現変動が関与について検討したが、S1 細胞および N63 細胞の p16<sup>INK4a</sup> の発現は非常に低く、しかも、発現の差は見られなかった。このことから、核小体型 PHGPx による pRb の Ser780 のリン酸化抑制機構には p16<sup>INK4a</sup> は

関与していないことが示された。

### ⑤ p53 のリン酸化体の解析

p53 の転写活性化により誘導された p21 は、サイクリン E-CDK2 およびサイクリン D1-CDK4/6 を阻害することで、細胞周期を G<sub>1</sub> 期に停止させることが知られている。p53 の活性化について検討するために、p53 のリン酸化体 (Ser15) について、解析を行った。DNA 障害時に p53 の Ser15 はリン酸化され、活性化される。S1 細胞では 2 時間後からリン酸化が起こり、4 時間をピークに減少した。N63 細胞でも同様のリン酸化のパターンを示し、有意な相違は見られなかった。

### ⑥ p21、p19<sup>ARF</sup> の発現の解析

p53 によって転写活性化される p21 は S1 細胞、N63 細胞共に検出できなかった。また、INK ファミリー蛋白質の 1 つである p19<sup>ARF</sup> のイムノブロットを試みたが検出できなかった。MDM2 と結合し、p53 のユビキチン化を阻害し、p53 を安定化させる、核小体に存在する蛋白質である p19<sup>ARF</sup> の発現破検出されなかった。これらの結果は核小体型 PHGPx の G<sub>1</sub> 期抑制機構には、p53 経路は関与していないことを示している。

以上の結果より、核小体型 PHGPx はサイクリン D1 プロモーターを抑制し、サイクリン D1 蛋白質発現の低下、CDK4 活性の抑制、RbSer780 のリン酸化の抑制により細胞増殖が抑制されていることが明らかとなった。同調培養を行わない核小体型 PHGPx 高発現株の細胞でも観察された。

### (2) 核小体型 PHGPx 高発現株細胞の主要系性能の解析

#### ① 非同調培養時での核小体型 PHGPx 高発現

#### 株の足場非依存性増殖能の解析

in vitro における腫瘍抑制能を調べる方法として、軟寒天培地における培養を行った。核小体型 PHGPx を高発現させた N63 細胞、N120 細胞、非ミトコンドリア型 PHGPx 高発現株である L9 細胞を用いて、コントロール細胞である S1 細胞と軟寒天培地上でのコロニー形成能を比較した。培養 12 日目のコロニーの大きさを測定したところ、S1 細胞に比べて N63 細胞、N120 細胞では、コロニーの大きさが約 30%抑制された。

#### ② 同調培養時における核小体型 PHGPx 高発現株の足場非依存性増殖能の解析

Thymidine 同調後の S1 細胞では同調しない培養時と同様にコロニーを形成するのに対して、N63 細胞、N120 細胞ではほとんどコロニーの増大は見られなかった。コロニーの大きさを比較すると、核小体型 PHGPx 高発現株では、S1 細胞に比べて、約 70% コロニー形成が抑制されていた。非ミトコンドリア型 PHGPx 高発現株である L9 細胞も、S1 細胞に比べて著しくコロニー形成能が上がっていた。足場非依存性増殖能の解析から、in vitro において、核小体型 PHGPx が、特に Thymidine 同調培養後に癌形成を著しく抑制することが示された。

#### ③ Thymidine 同調培養した癌細胞を用いたヌードマウスにおける in vivo での腫瘍形成能の解析

Thymidine 同調培養後の細胞を用いて、ヌードマウスによる腫瘍形成の解析を行なった。腫瘍形成能は、ヌードマウス 7 匹を用いて、腫瘍容積と重量で評価した。細胞をマウスに移植した後、7 日目より測定を行った。腫瘍の容積は 15 日で、腫瘍容積に差が見られるようになった。21 日目には、核小体型

PHGPx 高発現株 N63 細胞、N120 細胞では、コントロール細胞である S1 細胞に比較して腫瘍形成が抑制されているのが確認され、N120 細胞でその抑制効果が顕著であった。また、非ミトコンドリア型 PHGPx 高発現株 L9 細胞、ミトコンドリア型 PHGPx 高発現株 M15 細胞では S1 細胞に比較して腫瘍形成が亢進されていた (図 2)。24 日目では、L9 細胞を移植したマウスで 1 匹、M15 細胞を移植したマウスで 2 匹、死亡が確認された。全てのヌードマウスの腫瘍を摘出し、重量を測定した。その結果、核小体型 PHGPx 高発現株である N63 細胞、N120 細胞を移植したマウスのみで、腫瘍重量の増加の抑制がみられた。

#### ④ 同調培養を行わない癌細胞のヌードマウスにおける in vivo での腫瘍形成能の解析

同調培養を行わないコントロール細胞である S1 細胞、核小体型 PHGPx 高発現株 N63 細胞、N120 細胞、非ミトコンドリア型 PHGPx 高発現株 L9 細胞およびミトコンドリア型 PHGPx 高発現株 M15 細胞を用いて、ヌードマウスに移植した。ヌードマウスに各細胞を移植した後、7 日ほどで腫瘍がみられるようになった。10 日目には S1 細胞と N63 細胞、N120 細胞に差が見られた。21 日目には S1 細胞を移植したマウスで 1 匹死亡が確認されたため、この時点で全てのヌードマウスの腫瘍を摘出し、重量を測定した。その結果、核小体型 PHGPx 高発現株 N63 細胞、N120 細胞を移植したマウスのみで、腫瘍形成が抑制されていた。また、非ミトコンドリア型 PHGPx 高発現株 L9 細胞をインジェクションしたマウスでは、同調培養時とは異なり、腫瘍形成は S1 細胞と変わらず、ミトコンドリア型 PHGPx 高発現株 M15 細胞をインジェクションしたマウスでは、腫瘍形成が著しく亢進していた。核小体型

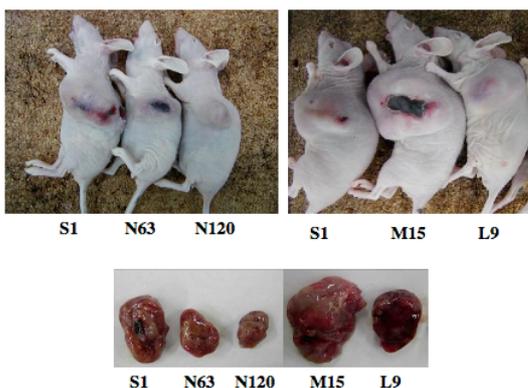


図2 PHGPx 高発現細胞を移植したヌードマウスでの腫瘍形成

PHGPx はヌードマウスを用いた *in vivo* 解析から、Thymidine による同調の有無に関係なく腫瘍形成を抑制できることが明らかとなった。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 喜来望、核小体型 PHGPX の高発現はがん細胞の増殖を抑制する、第 30 回日本分子生物学会・第 80 回日本生化学会合同学会、2007. 12. 14、横浜
- ② 喜来望、核小体型 PHGPX の細胞の増殖抑制機構の解析、日本薬学会 128 年会、2008. 3. 28、横浜
- ③ 鈴木里枝子、核小体型 PHGPX の高発現による細胞の増殖抑制機構の解析、第 31 回日本分子生物学会・第 81 回日本生化学会合同学会、2008. 12. 12、神戸

[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]

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

中川 靖一 (NAKAGAWA YASUHITO)  
北里大学・大学院薬学研究科・教授  
研究者番号：00119603

##### (2) 研究分担者

今井 浩孝 (IMAI HIROTAKA)  
北里大学・大学院薬学研究科・准教授  
研究者番号：50255361

##### (3) 連携研究者