

平成22年 5月 5日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790223

研究課題名（和文） 細胞の酸素センシング機構の解析

研究課題名（英文） Characterization of the cellular oxygen sensing machinery

研究代表者

中山 恒 (NAKAYAMA KOH)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任講師

研究者番号：10451923

研究成果の概要（和文）：

私達の体は高地などの低酸素環境において、低酸素応答により呼吸や代謝を調節し、恒常性を維持する。しかし、生体が環境の酸素濃度変化を感知する‘酸素センサー’機構は、未知な部分が多い。本研究では、プロリン水酸化酵素 PHD3 が形成する低酸素コンプレックスを解析し、酸素感知に働き得る候補分子を同定した。これらの分子のうち、PDH はエネルギー代謝調節に、PRP19 は細胞死の抑制に働くことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Organisms respond to hypoxia condition by regulating respiration and metabolism to maintain homeostasis. It is not clear yet what is the ‘oxygen sensor’ molecule in vivo. In the present study, we have characterized the hypoxia complex which is formed by prolyl-hydroxylase PHD3. As a result, we identified several different molecules which would play roles in oxygen sensing. PDH regulated the metabolism, while PRP19 suppressed the cell death in hypoxia treated cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子細胞生物学、生化学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：生体分子医学、低酸素応答、細胞死、エネルギー代謝、タンパク質複合体

1. 研究開始当初の背景

低酸素応答は、細胞の増殖、分化、アポトーシスなど、多様な生命現象に関与する。

Hypoxia Inducible Factor (HIF)-1 α は低酸

素環境下で、血管新生、造血、代謝などに関わる遺伝子群の発現を調節し、低酸素応答を制御する。さらに、HIF-1 α の発現は酸素濃度に依存し、低酸素環境下で安定的に発現する。

HIF-1 α は低酸素応答に関与する様々な生理現象を制御することから、低酸素応答の中心分子として、国内外の多数のグループにより研究が進められてきた。一方で、近年、HIFに依存しない経路の重要性を示唆する結果も得られており、低酸素応答制御の新しい展望として世界的に注目されている。

私はこれまでに、低酸素応答のシグナル伝達機構を HIF プロリン水酸化酵素 PHD3 に着目して解析してきた。ゲル濾過法を用いた解析より、PHD3 は低酸素環境に反応して巨大複合体（**低酸素コンプレックス**）を形成することを明らかにした。低酸素コンプレックスの形成は、PHD3 の低酸素条件下での酵素活性抑制に働くことが判明した。

2. 研究の目的

生体は大気中の酸素を利用して効率的なエネルギー産生を行い、様々な生命活動に利用する。生物は酸素の供給が限定される環境において低酸素応答を引き起こし、代謝活動の抑制や効率の良い酸素運搬により適応する。低酸素応答は、低酸素環境における個体の恒常性の維持に必須の機構である。しかしながら、細胞がどのように酸素濃度の変化を検知しているのかは、依然未知な部分が多い。そこで本研究では、細胞内における低酸素応答の入り口ともいえる「酸素センサー分子」を同定し、細胞の酸素センシング機構を解明することをめざす。低酸素環境に反応して形成されるプロリン水酸化酵素 PHD3 の高次複合体に酸素センサーとして働く分子が含まれることを仮説として、複合体構成タンパク質の同定と機能解析により、酸素センサーの特定を試みる。

3. 研究の方法

(1) 低酸素コンプレックス構成タンパク質の同定

通常酸素濃度、および、低酸素濃度で処理した細胞の抽出液をゲルろ過法により分離する。得られた分画より免疫沈降法により複合体を精製し、通常酸素濃度下で存在する小

さな複合体（約 160 kDa）と低酸素コンプレックス（約 1000 kDa）の構成タンパク質を、マスマスペクトロメトリーを用いて同定する。大小の複合体を構成するタンパク質を比較し、低酸素コンプレックス形成を促進する分子（群）の同定を試みる。

(2) 酸素センシング機構の解析

複合体に含まれる分子の細胞内における生理的役割を明らかにするために、培養細胞を用いて、各複合体構成タンパク質の発現量を、外来的導入や RNAi により増減させた時の複合体形成能、および、低酸素応答について検証する。これらのタンパク質が酸素を感知する分子機構（酵素活性、構造、他のタンパク質との親和性の変化等）を明らかにし、酸素センサーの同定を試みる。

4. 研究成果

(1) 低酸素応答で形成される低酸素コンプレックスの構成分子の同定

低酸素応答のシグナル伝達機構の解析を、プロリン水酸化酵素 PHD3 が形成する低酸素コンプレックスに着目して進めた。培養細胞に PHD3 を外来的に発現させ、免疫沈降法により低酸素コンプレックスを精製した。精製したコンプレックスを二次元電気泳動で展開し、質量分析法により構成タンパク質の決定を行った。一連の解析（11回の試行）で108のタンパク質スポットを決定した。これらのスポットの情報をデータベースと照合し、タンパク質の機能に基づき分類した（図1）。繰り返し得られるもの、異なるアプローチで同様に得られるものを指標として、二つの分子を主たる解析対象として絞り込んだ。

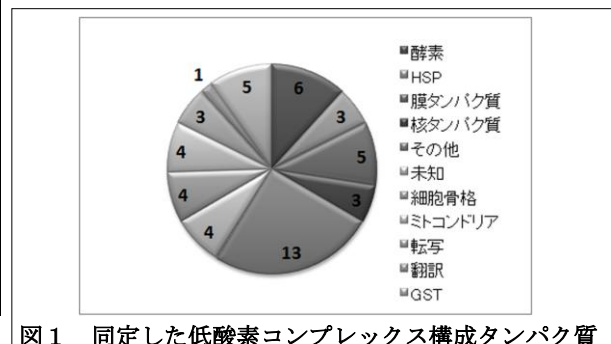


図1 同定した低酸素コンプレックス構成タンパク質

(2) 酸素センシング機構に働くタンパク質

① ピルビン酸脱水素酵素 (PDH)

候補タンパク質の一つ、ピルビン酸脱水素酵素 PDH に着目して解析を進めたところ、PHD3 と PDH が *in vitro* および *in vivo* において相互作用することが明らかになった (図 2)。

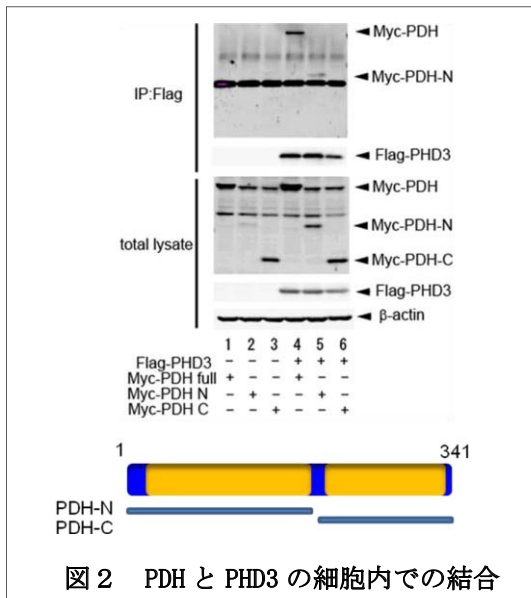


図 2 PDH と PHD3 の細胞内での結合

また両タンパク質はゲル濾過クロマトグラフィにおいて、同等の分子量の画分でピークの一つを形成した。さらに PDH の活性を *in vitro* アッセイを用いて測定したところ、PDH 活性が PHD3 の発現抑制により有意に減少していることが明らかになった。このことから低酸素コンプレックスの役割の一つは、生体内のエネルギー代謝調節であることが考えられる。低酸素コンプレックスがエネルギー代謝調節に働く分子機序を解明するために研究を継続している。

② 低酸素下で細胞死を抑制する分子 PRP19

Pre-mRNA processing factor (PRP19) は、低酸素コンプレックスを構成する分子として絞り込んだものの一つである。本研究より PHD3 と PRP19 が *in vitro* および *in vivo* において相互作用することが明らかになった。さらに、両タンパク質間の相互作用は低酸素環境で増強されることが判明した。また、低酸素環境において PRP19 の N 末部位と C 末部位の結合が認められた。この分子内の結合が

PHD3 によって促進されることを、FRET を用いたアッセイにより証明した。

長期にわたる低酸素環境での培養は細胞死を引き起こす。PRP19 の強制発現はこの細胞死を有意に抑制し、逆に siRNA を用いた PRP19 の発現抑制は細胞死を促進した (図 3)。

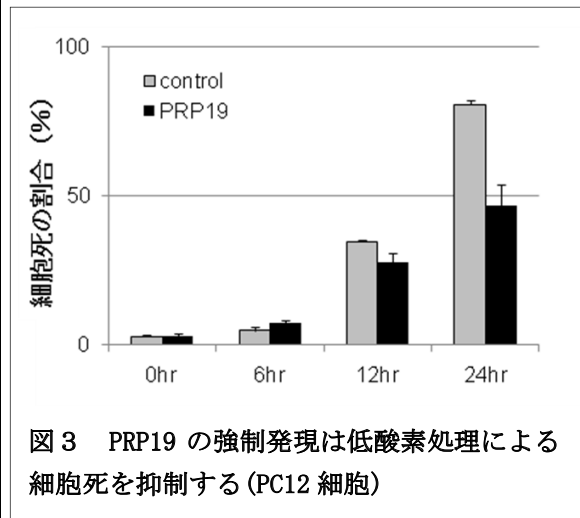


図 3 PRP19 の強制発現は低酸素処理による細胞死を抑制する (PC12 細胞)

一方で、PRP19 siRNA により誘導される細胞死は、PHD3 を同時に siRNA することにより抑制された。このことから、PRP19 は細胞死の促進に働く PHD3 と結合してその活性を抑制することが、低酸素応答における細胞死を抑制するメカニズムであることが予測された。癌は低酸素環境に耐性を示し、増殖能を維持する。この時に、細胞死を抑制する分子が活性化されていることが予想される。PRP19-PHD3 の相互作用を効果的に抑制することは癌の低酸素耐性を打ち消すために有効な手段となり得るかもしれない。低酸素コンプレックスが細胞死に関わるどのようなシグナル伝達経路を制御し、癌細胞でどのような働きを担うのかを今後の解析で明らかにしたい。

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 2 件)

① Nakayama K. Cellular signal transduction of the hypoxia response. *J. Biochem.*、査読あり、146, (2009) 757-765

② Nakayama K., Qi J., Ronai Z. The ubiquitin ligase Siah2 and the hypoxia response. *Mol. Cancer Res.*、査読あり、7, (2009) 443-451

〔学会発表〕(計3件)

① 中山 恒 HIF プロリン水酸化酵素 PHD3 によるエネルギー代謝調節機構、BMB2008 学会、2008 年 12 月 11 日 神戸国際会議場

② 中山 恒 (他2名) Molecular mechanism of ubiquitin ligase PRP19 activation by prolyl-hydroxylase PHD3 during hypoxia response、第32回 日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 11 日 パシフィコ横浜

③ Koh Nakayama (他2名) Prolyl-hydroxylase PHD3 promotes the PRP19 intramolecular interaction and alters PRP19 activity during hypoxia response、Keystone Symposia:Hypoxia、2010 年 1 月 21 日、Keystone, CO, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 恒 (NAKAYAMA KOH)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・特任講師

研究者番号：10451923

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし