

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15130

研究課題名(和文) 微生物に由来する新規ガン抑制因子の作用機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of mechanism of a novel cancersuressor derived from microorganism

研究代表者

桑山 秀一 (KUWAYAMA, Hidekazu)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号：40397659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：1981年以降、先進国における死亡原因の第一位はガンであり、現在日本では人口の約30%がガンにより死亡している。細胞性粘菌から分離したガン細胞特異的に死滅させる因子(DdMRP4)を同定した。本研究では、その分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。まず、酵母ツーハイブリッド法によりDdMRP4と相互作用する遺伝子を4つ分離することに成功した。さらに、それらの遺伝子の分子機能解析により、それらがアポトーシス関連遺伝子であることや細胞性粘菌においては細胞の発生や分化に関連することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Since 1981, cancer is the top cause of death in developed countries. In Japan, about thirty percent of the overall population die from cancer. We isolated a protein factor, DdMRP4, which suppresses the growth of cancer. In this study, we aim at reveal the molecular mechanism. First of all, we succeeded the isolation of four protein coding genes which interact with DdMRP4. Furthermore, by the molecular genetic analyses, we found their functions are related to apoptosis and they are involved in the functions of development and cell differentiation in the model organism, Dictyostelium discoideum.

研究分野：分子生物学

キーワード：ガン抑制因子 細胞性粘菌

### 1. 研究開始当初の背景

細胞ガン化の多くは、増殖と分化の切換え機構における異常と考えられている (Pettersson et al., Cell Death and Differ., 18, 1231-1233, 2011)。生物の発生過程では細胞が分化を開始すると増殖能を調節する厳密な機構が存在するが、ガン細胞ではこの機構が破綻し、無秩序に細胞分裂を繰り返す。よって、増殖と分化の切換え機構の詳細な解明がガン細胞の増殖抑制に重要な知見をもたらすと考えられる。

申請者たちはこれまで、土壌微生物である細胞性粘菌 (*Dictyostelium discoideum*) を利用し、増殖と分化の切換え機構の解析を行ってきた (Kuwayama et al., PLoS One, 2013; Maeda et al., Science, 2004; Chida et al., BMC Genetics, 2008; Mayanagi et al., Dev. Genes Evol., 2004)。細胞性粘菌は土壌に生息するアメーバ細胞で、バクテリアを捕食し増殖する。この生物は、飢餓状態になると 10 万個程の細胞が走化性応答により集合し多細胞体を形成することにより、最終的にカビに良く似た淡黄色の子実体 (胞子塊と柄細胞より成る 1-2mm 程の構造体) を構築する。細胞性粘菌の生活環は短くわずか 24 時間であり、また寒天上で簡単に生活環を観察することができるため細胞学や発生学のモデル研究材料として利用されている。細胞性粘菌のゲノムサイズは小さい (約 34Mbp < ヒト約 3,000Mbp) が、ヒトと相同な機能遺伝子を数多く有しヒトのモデル生物として利用され (<http://www.nih.gov/science/models/>)、解析に必要な分子生物学的手法や簡便な培養法も確立されている (Williams, Genetics, 2010)。この生物の最大の利点のひとつは、遺伝子破壊効率が高く (Kuwayama and Nagasaki, J. Mol. Microbiol. Biotech., 2008)、半数体であるため遺伝的な掛け合わせ無しに、変異株の表現型形質の解析、多重遺伝子破壊株の作製が可能である点が挙げられる。また、遺伝子解析の基本となる全ゲノムデータや cDNA データも公表されている (<http://dictybase.org>)。

これまで増殖と分化の切換え機構に関わる分子同定のため、厳密な細胞周期同調培養系を確立し細胞が増殖から分化に移行するときに特異的に発現される遺伝子産物を同定した。それらのうちのひとつミトコンドリアリボソームタンパク質様遺伝子 S 4 (*Ddmp4*) 分子は、増殖の停止と分化の開始のカギとなる重要な機能を果たしていることを明らかにした (Maeda and Chida, Biomolecules, 2013)。この *DdMRP4* はそれまで知られていたりリボソームタンパク質と相同性が低く、ミトコンドリア内で合成されるものの分子内に核移行シグナルを有し、核内で増殖と分化の切換えに深く関わっていることが推測された (Maeda, Dev. Growth Differ., 2011)。

細胞性粘菌とヒトでは遺伝子レベルで多

くの共通点が存在するが、ヒトには *DdMRP4* と相同な遺伝子は無い。しかしながら、*Ddmp4* 遺伝子をヒト癌細胞 (A549, HeLa, HepG2, Caco-2 cells) に強制発現させ *Ddmp4* 遺伝子のガン細胞への影響を検討したところ、面白いことにアポトーシス (プログラムされた細胞死) が誘導されることにより増殖が抑制された。一方、非ガン由来の培養細胞 (HBMECs, HUVECs, hNHeps cells) の増殖にはほとんど影響を与えなかった。これらの研究成果は、*DdMRP4* がガン細胞特異的に作用する細胞死誘導因子として働くことを強く示すものであった。

### 2. 研究の目的

1981 年以降、先進国における死亡原因の第一位はガンであり、現在日本では人口の約 30% がガンにより死亡している。ガン治療薬の開発は精力的に進められてきたにも関わらず、ガン細胞のみを特異的に死滅させる根本的治療薬の開発には依然として成功していない。申請者たちは最近、微生物由来のリボソームタンパク質様遺伝子産物が、ガン細胞特異的に細胞死誘導を起こすことを発見した。本申請では、この遺伝子産物のガン細胞におけるターゲット分子を同定し、ガン細胞を特異的に死滅させる分子メカニズムを検証する。これにより、新規ガン細胞死誘導経路を解析し、この遺伝子産物の新規ガン治療薬としての潜在能力を追求する。

*DdMRP4* が見つかった細胞性粘菌は土壌に生息するアメーバ様真核微生物で、バクテリアを捕食し増殖する。この生物は、飢餓状態になると 10 万個程の細胞が走化性応答によって集合し多細胞体を形成することにより、最終的にカビに良く似た淡黄色の子実体 (胞子塊と柄細胞より成る 1-2mm 程の構造体) を構築する。細胞性粘菌では、飢餓により増殖と分化が明確に切換るため、増殖と分化の切換え機構の解析には優れたモデル生物である (<http://www.nih.gov/science/models/>)。我々はこれまで細胞周期の厳密な同調系を独自に開発することにより増殖と分化を切換える細胞周期上の特異点を決定し、特異点で特異的に発現する因子として *DdMRP4* を同定した。研究期間内においては、*DdMRP4* がアポトーシスを誘導するメカニズム解明のために、ガン細胞において発現している *DdMRP4* と特異的に相互作用する因子の同定と機能解析を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

申請者たちは、新規ガン増殖抑制因子として細胞性粘菌由来の遺伝子 *DdMRP4* を発見した。本申請では、以下の手順により *DdMRP4* の機能ドメインの同定と相互作用分子の同定によりガン増殖の抑制機構の解明を行った。

1) *DdMRP4* の機能ドメインの同定  
*DdMRP4* を予想機能ドメイン (4 つ) に分割し、

それぞれガン培養細胞に発現させた後、増殖抑制作用、アポトーシス誘導活性を測定することにより、最小限の機能ドメインを探索する。これにより DdMRP4 の機能についての今後の詳細な解析の足掛かりを得る。

#### 2) DdMRP4 の作用機序の解明

ガン細胞由来の cDNA や核抽出物から DdMRP4 に特異的に相互作用する分子を同定する。

#### 4. 研究成果

本研究では、1) DdMRP4 のガン細胞増殖抑制に機能するドメインの同定と 2) DdMRP4 遺伝子産物の標的分子を同定することにより、増殖抑制の作用機序の解明を行うことを目標とした。そのため以下の 1) 2) に関する研究を行った。

1) DdMRP4 遺伝子産物のガン増殖抑制作用に必要な最小領域を同定。

DdMRP4 のアポトーシス誘導に必要な最小領域を特定するために、高次構造から予想される 4 つのドメインに分断した遺伝子断片をそれぞれ培養ガン細胞に発現させ、アポトーシス誘導の検証を行う予定であった。しかしながら、この実験に必要な発現コンストラクトの作製の際、クローニングに問題(正しい DNA 断片がクローニングされてこない)が生じ、目的断片を有する発現ベクターの作製は叶わなかった。これはおそらく 4 つに分断することによってそれぞれのドメインをコードする遺伝子が腸菌内において不安定であったためであると推測された。今後はコドン配列を変更した人工遺伝子を利用して、遺伝子のクローニングを行う予定である。

2) DdMRP4 は核移行シグナルを有するものの、核内におけるガン増殖抑制機序は不明である。本研究課題では、ガン細胞において DdMRP4 と特異的に相互作用する遺伝子産物を分離し、DdMRP4 のガン増殖抑制の細胞内情報伝達機構を明らかにする。相互作用分子の同定は、酵母ツーハイブリッド (Y2H) 法を行った。

Y2H 法による相互作用遺伝子産物の同定

本研究では、DdMRP4 と相互作用する遺伝子産物を Y2H 法によりスクリーニングを行った。Y2H 法とは相互作用因子を遺伝子として直接分離する方法である。Y2H 法では、転写因子である GAL4 タンパク質を DNA 結合ドメイン (DNA-BD) と転写活性化ドメイン (AD) の 2 つのモジュールに分割し、DNA-BD には既知遺伝子産物である bait (おとり) 遺伝子を、AD ドメインには検索対象となる未知の prey (獲物) 遺伝子を、それぞれ融合遺伝子として発現させる。bait タンパク質と prey タンパク質の 2 つのタンパク質間で相互作用が行われる場合のみ、GAL4 タンパク質の機能が回復しレポーター遺伝子が活性化され相互作用が検出される。本研究における相互作用検出系は効率・感度が共に高い市販のキット (Takara-Clonetech 社の Matchmaker™ Gold 酵母ツーハイブリッド (Y2H) システム) を

使用し、相互作用が認められる候補クローンだけが選択培地上に生育する系で効率よく相互作用クローンを選別した。使用する発現遺伝子ライブラリーは、これまでの研究において利用したガン培養細胞 (HeLa 細胞) から調製した。Y2H 法による相互作用遺伝子探索の結果、4 つの遺伝子が同定された。そのうちの 1 つ *mrs2* について細胞性粘菌において相同遺伝子の機能を解析したところ、遺伝子破壊株の発生において遅延が見られることが分かった。このことは細胞性粘菌において、*Ddmp4* が発生の制御の一部はを *Ddmrs2* を介して行っていることを示唆すると共に、がん細胞の分化においても *mrs2* が何らかの役割をしていることを示唆するものであった。今後は同様な手法で他の 3 つの遺伝子の機能解析を進めるとともに、ヒト細胞におけるこれらの 4 つの遺伝子の分子機能の解析にも取り組んでいく計画である。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔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.biol.tsukuba.ac.jp/~hidekuwama/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

桑山 秀一 (KUWAYAMA, Hidekazu)

筑波大学・生命環境系・准教授

研究者番号: 40397659

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

前田 靖男 (MAEDA, Yasuo)

東北大学・生命科学研究所・名誉教授

研究者番号: 50025417

真柳 平 (MAYANAGI, Taira)  
岩手医科大学・医学部・講師  
研究者番号：20432544

千田 淳司 (CHIDA, Junji)  
徳島大学・疾患酵素学研究センター・助教  
研究者番号：20437651

(4)研究協力者  
無し