

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590759

研究課題名（和文） 膵臓がん細胞の低酸素応答における CDR2 とアンチザイム 2 の関与とその機序の解析

研究課題名（英文） Significance of the interaction between antizyme 2 and CDR2 under hypoxia in cancer cells

研究代表者

村井 法之 (MURAI NORIYUKI)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：60300927

研究成果の概要（和文）：

我々は膵臓がん細胞において、細胞増殖に必須の生理活性物質“ポリアミン”を細胞内濃度を制御しているアンチザイム2というタンパク質が、がん遺伝子 *c-Myc* にコードされている c-MYC タンパク質のプロテアソームによる分解をユビキチン非依存的に促進することを発見した。これまでユビキチン化により c-MYC タンパク質が分解されることは知られていたが、この発見により細胞内における c-MYC の分解には、ユビキチンが関与せずアンチザイムを介する経路があることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

c-myc is known as the most famous oncogene and encodes c-MYC oncoprotein. c-MYC contributes to cell proliferation, ribosomal biosynthesis, glycolysis and apoptosis. It has been reported that regulation of c-MYC degradation is mediated by ubiquitin-proteasome pathway. However we found that antizyme 2 protein which regulates cellular polyamine level accelerates degradation of c-MYC by the proteasome ubiquitin-independently. In this study, we showed that novel ubiquitin independent c-MYC degradation pathway exist in the cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生化学、分子生物学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：アンチザイム、ポリアミン、がん、c-Myc、低酸素

1. 研究開始当初の背景

(1) CDR2 とは

CDR2 は傍腫瘍性小脳変性疾患の抗原タンパク質として発見され、通常は脳にしか認められないとされているが、この疾患では患者の腫瘍から生成されるようになり、その結果としてキラーT細胞が腫瘍だけでなく神経系をも攻撃するようになることで傍腫瘍性小脳変性症が生じると推測されている (Darnell RB, et al. *N Eng J Med* 2003)。CDR2 はロイシンジッパーモチーフを有し c-Myc と相互作用することが報告されているが (Okano HJ, et al. *Gene & Dev.* 1999) 機能は全くわかっていなかった。しかしごく最近 CDR2 が腫瘍細胞に強く発現しており、酸素濃度センサー PHD1 と相互作用し低酸素に応答し誘導される低酸素誘導転写因子 HIF1 α の蓄積を減少させ転写因子活性を減弱させるということが報告された (Balamurugan K. et al. *Oncogene* 2009)。また PHD1 ノックアウトマウスの解析から、この遺伝子の欠損は酸化ストレスの発生を減少させ低酸素耐性を誘導することが報告された (Aragones J et al. *Nat Genet* 2008)。

(2) アンチザイムの研究背景

アンチザイム (AZ) は、細胞増殖に必要なポリアミンの細胞内濃度調節を行うタンパク質である。AZ は細胞内のポリアミン濃度が高くなると誘導され、ポリアミン合成の律速酵素であるオルニチン脱炭酸酵素 (ODC) に結合し 26S プロテアソームによるユビキチン非依存的分解を促進する。つまり AZ は細胞内ポリアミン濃度を負に制御している。がん細胞ではポリアミンが高値となる

ことが知られており、またがん患者の尿中の濃度も高くなることがわかっており、実際検査キットも利用されている。さらに低酸素下では ODC の発現やポリアミンの取り込みが上昇し、結果として細胞内ポリアミン濃度も上昇することが知られている (Svensson K J et al. *Cancer Res* 2008; 68: 9291-301)。

哺乳動物では、AZ1、AZ2、AZ3 の 3 つのファミリーが存在し、AZ3 は精巣特異的であるが、AZ1、AZ2 は全身に普遍的に存在するため AZ2 は AZ1 のバックアップのような存在と考えられてきた。しかし申請者らは AZ1 とは異なり AZ2 は、細胞内局在が主に核であること、またリン酸化されることなどを見出し特異的機能の存在を示唆した (Murai N, et al. *J Biol Chem* 2003, Murai N, et al. *J Cell Biochem* 2009)。そこで酵母 Two-hybrid 法を用いてマウス脳および腎臓の cDNA ライブラリーから AZ2 特異的な相互作用分子の探索を行った。その結果どちらの cDNA ライブラリーからも CDR2 の強陽性クローンを複数得た。この相互作用は動物細胞の Two-hybrid 法、培養細胞の pull down 法および細胞内共局在によっても確認した。さらに AZ2 ノックアウト (AZ2-KO) マウスと野生型マウスの解析から、これまで脳と精巣にのみ発現するとされてきた CDR2 が少なくとも心臓、膵臓、肝臓にも発現していた。

このような背景から申請者は、「ポリアミンが高値な膵臓がんは CDR2、AZ2 や酸素センサーの PHD1 が発現している環境にあり、CDR2、AZ2 や PHD1 などが相互作用し酸化ストレスを抑制する方向に働き、がんの低酸素耐

性獲得を抑制しているのではないか」という仮説を立てた。

本研究は、前述の研究概要に示した5つの項目について研究を行うことによりこの仮説を検証し、さらに膵臓がん治療における新規な標的分子を同定し基礎医学に貢献することが目的である。

2. 研究の目的

本研究は、細胞内ポリアミン調節タンパク質 “アンチザイム 2 (AZ2)” と酸素濃度センサー PHD1 を介して低酸素誘導転写因子 HIF1 $\cdot\cdot$ の活性を抑制するタンパク質 “CDR2” が相互作用することを申請者が見出したことから、膵臓がん細胞の低酸素耐性におけるこれらのタンパク質の役割を明らかにし、膵臓がん治療の標的分子の探索のための研究基盤を確立することが目的である。

3. 研究の方法

(1) CDR2とAZ2の結合様式の解析

タグタンパク質 (HA, FLAG) と CDR2 または AZ2 およびそれらの部分配列の融合タンパク質を作製しプルダウン法などにより解析する。

(2) AZ2 ノックアウトマウスと野生型マウスの膵臓における AZ2 及び CDR2 の局在との mRNA および発現レベルの比較解析

①蛍光タンパク質に AZ2 及び CDR2 を融合し培養細胞に発現させ、それらの局在を蛍光顕微鏡で解析する。

②siRNA による遺伝子のノックダウン解析と AZ2-KO マウス膵臓の初代培養細胞を用いたタンパク質の発

現解析を行うことにより AZ2 と CDR2 の膵臓における役割を明らかにする。

(3) AZ2-KO マウスと野生型マウスの膵臓における発現タンパク質の網羅的解析と相互作用

①AZ2-KO マウスの膵臓のプロテオーム解析

AZ2-KO マウスと野生型マウスの膵臓におけるタンパク質の2次元電気泳動法による網羅的解析発現行い、発現が変化しているタンパク質スポットを研究室現有の質量分析装置および解析ソフトを用いてタンパク質の同定を行う。CDR2 のように発現が AZ2 に依存するようなタンパク質を同定し、それらのタンパク質が膵臓機能、低酸素環境、がんなどに関連するかデータベース等で解析する。発現が変化しているタンパク質が見つからなかった場合は CDR2、AZ2、PHD1 やそれらの既知の相互作用分子の解析を進める。

②発現変化した遺伝子の相互作用

①において同定されたタンパク質が CDR2、AZ2 や PHD1 などと相互作用するか、HA や FLAG タグを付加した融合タンパク質を作成し膵臓の細胞株に発現させ、プルダウンによる相互作用を確認する。

(4) 膵臓がん細胞の低酸素下におけるポリアミン、AZ2 及び CDR2 の関連因子の発現解析。

膵臓がん細胞株を低酸素下 (0.2~0.5% 程度) で培養し、細胞内ポリアミン濃度や AZ2、CDR2、PHD1、HIF α などの細胞内の挙動がどのように

変化するかRT-PCR法やウエスタンブロットリング法などにより解析する。また低酸素下の条件により、網羅的解析により同定されたタンパク質の挙動も同様に解析し、それらのタンパク質と膀胱がん細胞の低酸素下との関連を明らかにする。

4. 研究成果

(1) CDR2とAZ2の結合様式の解析

CDR2とAZ2各々の結合領域を決定するためCDR2は部分領域に対する完全長AZ2を、AZ2は相同性のあるAZ1とのキメラを作製し酵母Two-Hybrid法で解析した。その結果CDR2はロイジンジッパー領域を含むアミノ酸101～300番を、AZ2はC末端側のアミノ酸135～189番を互いの結合領域に決定した。さらにAZ2のアミノ酸135～189の領域内でAZ1と異なる8つアミノ酸の部位特異的変異導入解析を行ったところ、R140又はV174をAに置換するとCDR2へほとんど結合しなくなった。さらに興味あることに、AZ1においてこの2つの残基に相当するP177とA211の両残基をAZ2と同様にするとCDR2に強く結合することがわかった。両残基は構造的に非常に近い位置に存在していることからCDR2への結合に非常に重要な残基であると考えられる。

(2) 膀胱がん細胞におけるAZ2、CDR2、PHD1の相互作用と機能の関連。

ヒト膀胱腺癌細胞Panc-1などを用いて、細胞内でのAZ2、CDR2、c-Myc、PHD1/2などの相互作用を、HAやFLAGのタグ抗体を用いたプルダウンアッセイにより解析している中で、新たにAZ2がc-Mycと相互作用することを発見した。ポリアミンの律速酵素であるODCはc-Mycのターゲットである。

ポリアミンで発現が誘導されたAZ2はODCに結合しプロテアソームによるユビキチン非依存的分解を促進するが、これと同様にAZ2はc-Mycをユビキチン非依存的に分解促進させる可能性が考えられた。またAZ2とc-Mycが相互作用することはポリアミン代謝や細胞増殖および癌において非常に興味深く重要と考えられた。そこで当初の研究目的からは若干それるが、これらの相互作用についてc-Mycの分解に焦点を絞り解析した。その結果AZ2は細胞内においてc-Mycの分解を促進することが明らかとなった。この分解はc-Mycのユビキチン依存的分解に重要なc-Myc上の2つのリン酸化部位(T58およびS62)をアラニンに置換したc-Mycも分解促進した。また、ユビキチン活性化酵素E1の阻害剤を添加してもAZ2による内在性c-Mycの分解は阻害されなかった。さらにポリアミンによるc-Mycの分解促進は、siRNAによりAZ2をノックダウンした細胞では明らかに抑制された。これらのことから、AZ2によるc-Mycの分解促進はユビキチン非依存的であることが明らかとなった。

(3) 低酸素・低栄養環境下のc-MYCダウンレギュレーションに対するアンチザイム2の関与

固形がんにおいては、ほとんどのがん細胞は低酸素や低栄養の状態にあることが報告されている。c-MYCはこれらの環境下においてダウンレギュレーションされることがわかっている。加えてこれらの環境は細胞内のポリアミン濃度を上昇させることも知られている。そこで我々はアンチザイム2が低酸素や低栄養におけるc-Mycのダウンレギュレーションに関与しているかAZ2の

ノックダウンを行った細胞を解析した。AZ2を siRNA でノックダウンした細胞を低酸素 (O_2 1%以下)および低栄養(グルコースフリー)下に置き c-MYC タンパク質レベルをコントロール siRNA と比較した。その結果、低酸素 (O_2 1%以下)および低栄養下における c-MYC のダウンレギュレーションが AZ2 のダウンレギュレーションで明らかに抑制された。これらのことは、低酸素・低栄養により細胞内のポリアミンが上昇し、これに伴って誘導された AZ2 が c-MYC のダウンレギュレーションに関与していることを示唆している。現在これらの成果について論文投稿の準備を行っている。

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. Murai N, Murakami Y, Matsufuji S. Protocols for studying antizyme expression and function. *Methods Mol Biol.* 2011; **720**: 237-67. 査読有

[学会発表] (計 7 件)

口頭発表

1. 村井法之. 動物細胞におけるポリアミン恒常性の維持機構-アンチザイムを中心に-. 日本農芸化学会 2013 年度大会 (シンポジウム) 2013 年 3 月, 仙台 [抄録集 4SY05-3]
2. 村井法之・村上安子・松藤千弥
アンチザイム 2 による c-Myc の分解促進機構とその意義 日本ポリアミン学会 第 4 回年会 2013 年 1 月 松島
3. 村井法之・村上安子・松藤千弥
アンチザイム 2 は細胞内で c-Myc の分解

を促進する 日本ポリアミン学会 第 2 回年会 2011 年 1 月 宇都宮

ポスター発表

1. 村井法之, 村上安子, 松藤千弥.
アンチザイム 2 による c-Myc の分解促進
2012 第 85 回日本生化学会大会 福岡
12 月
2. 村井法之, 村上安子, 松藤千弥.
アンチザイム 2 による c-Myc の分解促進
2011 第 84 回日本生化学会大会 京都
12 月
3. Murai N, Murakami Y, Matsufuji S.
Regulation of c-Myc by antizyme 2 and its biological significance.
Gordon Research Conference Polyamine
2011 June Waterville Valley, NH, USA
4. 村井法之、清水昭博、村上安子、
松藤千弥 Antizyme 2 accelerates
c-Myc degradation in the cells 2010
International polyamine conference
御殿場 6 月

[図書] (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村井 法之 (MURAI NORIYUKI)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：60300927

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者