

## 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24年 5月11日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790274

研究課題名（和文） 低酸素応答を制御する『酸素センサー』機構の分子メカニズム

研究課題名（英文） Characterization of the 'oxygen sensor' machinery regulating the hypoxia response

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・准教授

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、低酸素応答性の高次複合体（低酸素コンプレックス）を構成する分子 PRP19 に着目して、その発現が低酸素環境で抑制される機構と低酸素下での細胞死抑制に働く分子メカニズムを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Organisms regulate multiple physiological functions such as respiration and metabolism under hypoxic conditions to maintain homeostasis. It still remains to be understood what is the molecule playing a role as an 'oxygen sensor' in vivo. In the present study, we have focused on the hypoxia-dependent protein complex (hypoxia complex) and characterized one of its components, PRP19. We are able to demonstrate the molecular mechanism underlying i) the hypoxic cell death which is inhibited by PRP19 and ii) the transcriptional suppression which leads to the downregulation of PRP19.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1600000	480000	2080000
2011年度	1400000	420000	1820000
年度			
年度			
年度			
総計	3000000	900000	3900000

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、タンパク質複合体、転写制御

## 1. 研究開始当初の背景

低酸素応答は、造血・代謝などを調節して、低酸素下における恒常性の維持に働く。また、低酸素応答の働きは癌や虚血性疾患などの

病気にも関与している。Hypoxia Inducible Factor (HIF)は低酸素下で多数の遺伝子発現を調節し、細胞の増殖・分化・アポトーシスなどの細胞応答を制御する。HIFは、癌の増

殖や転移、造血幹細胞の維持・増殖にも働いている。HIF は低酸素下で様々な生理応答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、低酸素応答には HIF 経路とは独立した、mTOR 経路や小胞体ストレス応答経路などのシグナル経路も働くことが明らかにされてきた。これらの経路は『HIF 非依存的経路』と呼ばれ、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。HIF プロリン水酸化酵素 PHD3 の低酸素下における制御機構を解析した。ゲル濾過法を用いた解析より、PHD3 は低酸素環境に応答して巨大なタンパク質複合体 (**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は低酸素環境に応答して形成されて、通常酸素環境に戻ると解離する。このことから、酸素センサー分子の働きが介在していることが考えられる。この複合体に含まれるタンパク質の網羅的同定により、PRP19 を見出した。

## 2. 研究の目的

PRP19 はスプライシング制御に働き、DNA 損傷時の細胞死を抑制する機能を持つ。しかし、低酸素応答におけるその役割は未知である。

PRP19 は PHD3 と結合して、低酸素に依存した機能や発現の変化を示すことを明らかにしてきた。本研究では、これまでに得た知見に基づき、以下の二項目の解明をめざした。

① 細胞死に着目して、PRP19 の低酸素応答における生理的役割を明らかにする。

② 低酸素依存的に引き起こされる PRP19 の発現・活性変化の制御機構を解明する。

## 3. 研究の方法

### PRP19 の細胞死における役割の解析

PRP19 発現ベクター、または、siRNA を細

胞内にトランスフェクションした後、細胞を低酸素環境で 0-48 時間培養して、細胞の生死をトリパンブルー染色により計測した。同じサンプルからタンパク質を抽出して、ウェスタンブロット用により、カスパーゼの活性化を検出した。

### PRP19 の発現制御機構の解析

PRP19 mRNA の発現はノーザンブロットおよびリアルタイム PCR 法を用いて解析した。PRP19 プロモーター領域の解析は、ルシフェラーゼアッセイを用いて行った。PRP19 の転写開始点より上流約 3000bp のゲノム領域をクローニングして、ルシフェラーゼアッセイ用のベクターに組み込んだ。また、プロモーター領域を 300bp ずつ削除した deletion mutant を、PCR 法を用いて作製した。ベクターを細胞内にトランスフェクションした後、低酸素下で 24 時間培養して、ルミノメーターを用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

## 4. 研究成果

### ① PRP19 による細胞死抑制機構の解析

#### PRP19 は caspase の活性化を阻害して、細胞死を抑制する

私たちはこれまでに PRP19 の強制発現は低酸素環境下での細胞死を抑制して、逆に、PRP19 siRNA 細胞では細胞死が亢進することを明らかにしてきた。その分子機序を caspase 経路に着目して解析した。長期の低酸素培養により、HeLa 細胞では caspase 経路の活性化が認められる。PRP19 の発現を siRNA により抑制した細胞では、caspase 活性が亢進し、細胞死が顕著に増加した (図 1)。一方、PRP19 と PHD3 を同時に発現抑制した細胞では、caspase 経路の活性は野生型と同程度であった。このことから、PRP19 は caspase の活性化に働く PHD3 を抑制することで同経路を阻害して、細胞死抑制に働くことが明らかにな

った。

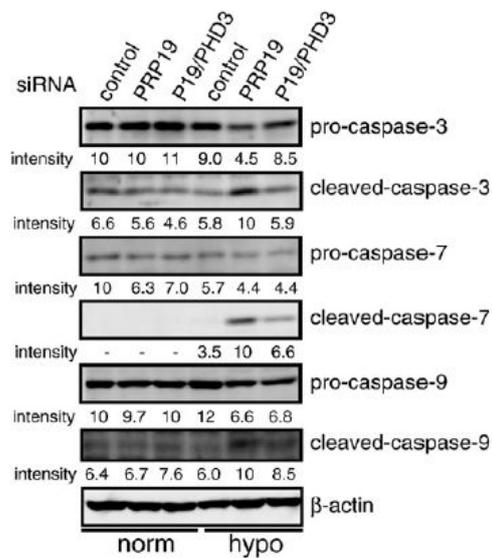


図 1 PRP19 ノックダウン細胞における低酸素下での caspase 活性の亢進

### PRP19 由来ペプチドは HIF の発現を減少させる

低酸素コンプレックスの構成タンパク質間のアミノ酸配列を比較したところ、約 30 アミノ酸からなるモチーフ配列が存在することが明らかになった。このモチーフを低酸素コンプレックス認識モチーフと名づけた。PRP19 の配列に基づき、低酸素コンプレックス認識モチーフを含む約 70 アミノ酸からなるペプチドを発現するベクターを構築した。このベクターを HeLa 細胞にトランスフェクションしてその発現を検証したところ、安定した発現が認められた。ペプチドが HIF 経路に与える影響を検討した。乳がん由来 MCF7 細胞にペプチドを強制発現させた後に、低酸素下で 5 時間培養して、HIF-1 $\alpha$ 、2 $\alpha$  の発現をウェスタンブロッティングにより検討

した。低用量のペプチドの発現ではこれらの分子への効果は認められなかったが、ペプチドの発現量を増加させることにより、HIF-1 $\alpha$ 、2 $\alpha$  の発現が共に抑制されることが判明した (図 2)。

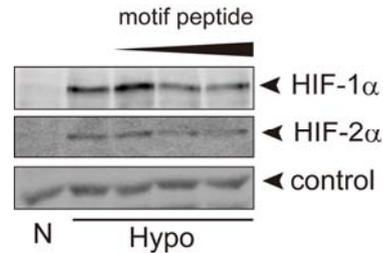


図 2 阻害ペプチドは低酸素下での HIF-1 $\alpha$ 、2 $\alpha$  の発現を抑制する

### ② PRP19 の発現抑制機構の解析

#### PRP19 の発現は低酸素下で減少する

PRP19 の低酸素環境下における発現をノーザンブロッティング法に解析した。その結果、PRP19 は低酸素環境下において発現が減少することが明らかになった (図 3)。このことは、長期の低酸素環境において細胞死が亢進することと対応している。PRP19 siRNA 細胞で認められた細胞死の亢進は、低酸素環境における PRP19 の発現減少を模倣していると考えられる。一方で、HIF-1 $\alpha$  の発現を siRNA によって抑制した細胞においても同様の発現抑制が認められたことから、この発現抑制は HIF には依存しないシグナル経路で引き起こされることが示唆された。

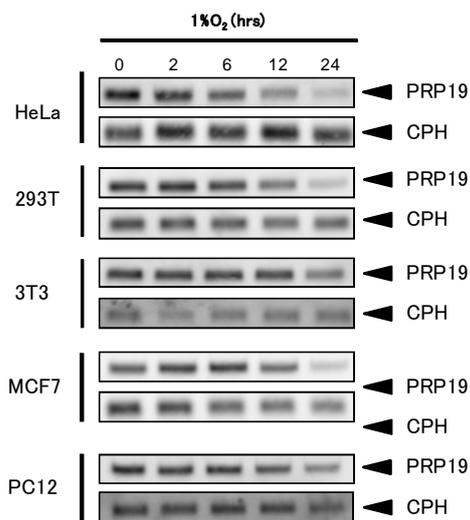


図3 低酸素下における *PRP19* mRNA の発現抑制

*PRP19* の発現抑制にはプロモーター上の-130 - +1 の領域が必要である

*PRP19* の発現を負に制御する機構を明らかにするためにルシフェラーゼアッセイを用いたプロモーター領域の解析を進めた。*PRP19* の開始コドンより上流 3 kb および 1.5 kb の領域を用いて、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、開始コドンより上流 1.5 kb までの領域に発現抑制に必要な領域が存在することが明らかになった。この領域に多数存在する E-box 配列の寄与を明らかにするために、同領域に存在する 6 個の E-box 配列を欠失したレポーターを作製した。その結果、野生型と同様の活性が認められ、E-box 配列は必要ではないことが明らかになった。転写抑制に働く最少領域を決定するために、プロモーター領域を段階的に削除したところ、転写開始点の上流 130bp までの領域に転写抑制部位が存在することが示唆された (図4)。その領域に結合しうる転写因子をデータベースと照合して探索したところ、STAT、GATA、Elk などが同定された。

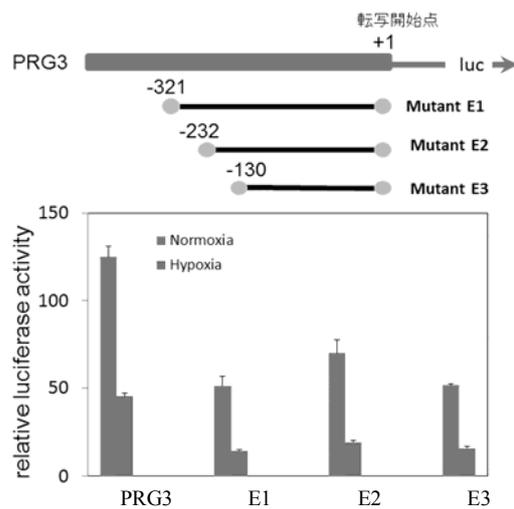


図4 低酸素処理による *PRP19* プロモーター活性の抑制

### 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. Sato M., Sakota M., and Nakayama K.\* Human PRP19 interacts with prolyl-hydroxylase PHD3 and inhibits cell death in hypoxia. *Exp. Cell Res.*, 査読あり, 318, (2010) 2871-2882.

2. Nakayama K. Growth and progression of melanoma and non-melanoma skin cancers regulated by ubiquitination. *Pigment Cell Melanoma Res.*, 査読あり, 23, (2010) 338-351.

[学会発表] (計 4 件)

1. 中山 恒、他二名

Pre-mRNA processing factor (PRP)19 はプロリン水酸化酵素 PHD3 と結合して低酸素下での細胞死を抑制する

BMB2010 2010年12月8日 神戸国際会議場

2. 中山 恒

低酸素環境における Pre-mRNA processing factor (PRP)19 による遺伝子発現制御機構

第84回日本生化学会大会 2011年9月22日 京都国際会館

3. 中山 恒

Regulation of matrix metalloproteinase *MMP1* gene expression under prolonged hypoxic conditions 第 34 回日本分子生物学会年会  
2011 年 12 月 15 日 パシフィコ横浜

4. Koh Nakayama

Regulation of matrix metalloproteinase *MMP1* expression by NF- $\kappa$ B pathway during prolonged hypoxic conditions.

Keystone Symposia: Advances in hypoxic signaling, 2012 年 2 月 14 日

Banff Fairmont Springs Conference Center

[図書] (計 2 件)

1. 中山 恒 (2011) がんにおける低酸素応答シグナル伝達 実験医学増刊号 がん幹細胞 Vol.29(20) 141-147、(羊土社)

2. 中山 恒 (2011) 低酸素応答におけるエネルギー代謝調節 The Lung Perspectives Vol.19 63-67、(メディカルレビュー社)

[その他]

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/section/advanced/oxy/index.html>

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・准教授

研究者番号：10451923

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし