

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：34519

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670403

研究課題名(和文) Gタンパク質 サブユニットによる悪性中皮腫増殖制御経路の解明

研究課題名(英文) G protein alpha subunit-regulated suppression of malignant mesothelioma cell proliferation

研究代表者

西崎 知之(Nishizaki, Tomoyuki)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：00221474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Gi、Gqタンパク質に共役するA3アデノシン受容体は悪性中皮種細胞のアポトーシスを誘導する。本研究は、Gi、Gqサブユニットの新規エフェクターを同定し、悪性中皮腫の治療法戦略に応用することを目的として遂行された。

まず最初に、Gi、GqサブユニットのcDNAをクローニングし、それぞれのHisタグプラスミドを作製した。HisタグGi、Gqサブユニットプラスミドを悪性中皮種細胞に導入し、抗Hisタグ抗体を用いた免疫沈降を行った後、電気泳動にて結合タンパク質を分離した。Gi、Gqサブユニット結合タンパク質をMALDI-TFMSで解析したが、有望な標的タンパク質は同定できなかった。

研究成果の概要(英文)：A3 adenosine receptor linked to Gi and Gq proteins engages apoptosis of malignant pleural mesothelioma cells. The present study aimed at identifying new effector of Gi and Gq proteins involving apoptosis and developing a promising drug for treatment of malignant pleural mesothelioma.

We carried out cloning of cDNAs for Gi and Gq proteins and generated His-tag plasmid of Gi or Gq protein. The His-tag plasmid was transfected into malignant pleural mesothelioma cells. Then, cells were immunoprecipitated using an anti-His tag antibody and the immunoprecipitants were separated by electrophoresis. Each protein was identified in the MALDI-TFMS analysis, but we have not obtained the possible target protein as yet.

研究分野：統合生理学

キーワード：悪性中皮腫 アポトーシス Gタンパク質 Giサブユニット Gqサブユニット エフェクター

### 1. 研究開始当初の背景

従来の研究で当該研究代表者は、チロシンキナーゼ受容体(RTK)と関連した悪性中皮腫の増殖調節経路を明らかにしてきた:(1)悪性中皮腫から血小板由来増殖因子-D(PDGF-D)分泌 PDGFβ受容体活性化 Shc2 リン酸化 Shc2/Grb2/SOS (RasGEF)複合体形成 Ras活性化 Raf活性化 MAPキナーゼカスケードの活性化 細胞増殖。(2)PDGFβ受容体活性化 IRS1/2 リン酸化 PI3K活性化 PDK1活性化 Ak活性化 Cdc42/Rac1活性化 ROCK活性化 細胞増殖。RTKの経路以外に、最近の研究で、Gタンパク質共役型受容体Gαサブユニットを介した癌細胞アポトーシス経路が示唆されている。我々は、RTKの経路以外に、Gタンパク質共役型受容体の一つであるアデノシンA<sub>3</sub>受容体が悪性中皮腫アポトーシスを誘導することを明らかにしている。しかし、アデノシンA<sub>3</sub>受容体に共役するGαサブユニットによる悪性中皮腫細胞アポトーシス誘導機構は不明である。

### 2. 研究の目的

本研究は、悪性中皮腫の増殖制御に対するGタンパク質共役型受容体を介した新規細胞内情報伝達経路[Gタンパク質α subunit (Gα)の直接的結合による non-receptor tyrosine kinase Srcの活性化 Sch2/Grb2/SOS Ras Raf MAPKKK MAPKK MAPK(ERK1/2)細胞増殖、あるいはGαのRGS結合による LARG (RhoGEF)活性化 RhoA細胞増殖]を証明・確立し、悪性中皮腫の治療法戦略に応用することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)悪性中皮腫増殖制御にかかわるGαの種類を検索・同定

- ・ Gαi, Gαs, Gαq, Gα<sub>12,13</sub>, Gαo に対する siRNA 作製・細胞内導入
- ・ 細胞増殖/アポトーシス解析: 上記 Gα

siRNA 細胞内導入によるノックダウン・非ノックダウン細胞を用いて

- MTT assay: 細胞生存率解析
- TUNEL staining: 組織学的アポトーシス解析
- Apoptosis assay: propidium iodide と annexinV-FITC を用いた flow cytometry 解析
- Cell cycle analysis: propidium iodide を用いた flow cytometry 解析
- ・ 標的 Gα の cDNA クローニング
- ・ Gα 遺伝子導入による過度強制発現細胞の作製
- ・ 過度 Gα 強制発現細胞を用いた細胞増殖/アポトーシス解析
- (2) Gα/Src 結合判定
  - ・ 抗 Gα 抗体で免疫沈降し、抗 Src 抗体で Western blotting
- (3) Gα 依存性 Src 活性化判定
  - ・ Gα ノックダウン・非ノックダウン細胞を用いて
    - 抗 Srv 抗体で免疫沈降し、抗 Tyr416 リン酸化抗体で Western blotting
  - ・ 過度 G 強制発現細胞を用いて
    - 抗 Srv 抗体で免疫沈降し、抗 Tyr416 リン酸化抗体で Western blotting
- (4) Gα 依存性 Shc2 チロシンリン酸化判定
  - ・ Gα ノックダウン・非ノックダウン細胞、を用いて
    - 抗 Shc2 抗体で免疫沈降し、抗チロシンリン酸化抗体で Western blotting
  - ・ 過度 Gα 強制発現細胞を用いて
    - 抗 Shc2 抗体で免疫沈降し、抗チロシンリン酸化抗体で Western blotting
- (5) Gα 依存性 Sch2/Grb2/SOS 複合体形成判定
  - ・ Gα ノックダウン・非ノックダウン細胞を用いて
    - 抗 Shc2 抗体で免疫沈降し、抗 Grb2

- 抗体で Western blotting
- 抗 Shc2 抗体で免疫沈降し、抗 SOS 抗体で Western blotting
- ・過度 Gα強制発現細胞を用いて
- 抗 Shc2 抗体で免疫沈降し、抗 Grb2 抗体で Western blotting
- 抗 Shc2 抗体で免疫沈降し、抗 SOS 抗体で Western blotting
- (6) Gα依存性 MAPK 活性化判定
- ・Gαノックダウン・非ノックダウン細胞を用いて
- 抗 ERK1/2 抗体で免疫沈降し、抗セリン/スレオニンリン酸化抗体で Western blotting
- ・過度 Gα強制発現細胞を用いて
- 抗 ERK1/2 抗体で免疫沈降し、抗セリン/スレオニンリン酸化抗体で Western blotting
- (7) Gα/RGS 結合判定
- ・抗 Gα抗体で免疫沈降し、抗 RGS 抗体で Western blotting
- (8) Gα依存性 Gα/RGS/LARG 複合体形成判定
- ・Gαノックダウン・非ノックダウン細胞を用いて
- 抗 Gα抗体で免疫沈降し、抗 RGS 抗体で Western blotting
- 抗 Gα抗体で免疫沈降し、抗 LARG 抗体で Western blotting
- ・過度 Gα強制発現細胞を用いて
- 抗 G 抗体で免疫沈降し、抗 RGS 抗体で Western blotting
- 抗 Gα抗体で免疫沈降し、抗 LARG 抗体で Western blotting
- (9) Gα依存性 RhoA 活性化判定
- ・CFP/YFP-RhoA プラスミド作製
- ・Gα siRNA と CFP/YFP-RhoA プラスミドの同時細胞内導入
- ・Gα発現ベクターと CFP/YFP-RhoA プラスミドの同時細胞内導入

- ・FRET monitoring: Real-time RhoA 活性化の可視的測定
- (10) RhoA 依存性細胞増殖判定
- ・RhoA siRNA 作製・細胞内導入
- ・RhoA ノックダウン・非ノックダウン細胞を用いて
- MTT assay
- TUNEL staining
- Apoptosis assay
- Cell cycle analysis
- (11) Gαi、Gαq サブユニット結合タンパク質解析
- ・Gαi、Gαq サブユニット cDNA をクローニング
- ・His タグ結合 Gαi、Gαq サブユニットのプラスミド作製
- ・プラスミドを悪性中皮腫細胞に導入
- ・His タグで免疫沈降
- ・免疫沈降物を SDS-PAGE 銀染色
- ・Gαi、Gαq サブユニット結合タンパク質を一つずつ MALDI-TOFMS で解析
- 4 . 研究成果
- 本研究で、アデノシン A<sub>3</sub> 受容体 Gαサブユニットが悪性中皮腫細胞アポトーシス誘導に関与することが明らかとなった。30 種類以上の Gαi、Gαq サブユニット結合タンパク質は検出できたが、悪性中皮腫細胞アポトーシス誘導に関与する有望な標的タンパク質は同定できなかった。Gαi、Gαq サブユニット結合タンパク質解析は現在も継続して行われている。
- 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 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）

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：  
出願年月日：  
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

西崎 知之 (Nishizaki Tomoyuki)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：00221474

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：