

論 文 要 旨

Molecular basis for the expression of major vault protein induced by hyperosmotic stress in SW620 human colon cancer cells

ヒト大腸癌細胞 SW620 において高浸透圧によって
誘導される major vault protein の発現亢進機序

田實 裕介

【序論および目的】

Vault は、major vault protein (MVP)、telomerase-associated protein 1 (TEP1)および vault poly (ADP-ribose) polymerase (VPARP) の3種類のタンパク質と数種類の RNA 分子から構成されている細胞内小器官の一つであり、既知の RNA タンパク質複合体の中では最大である。Vault は、特徴的な構造を持つにもかかわらず、多くの真核生物から精製され、その構造は高度に保存されている。ヒトの生体内においても、vault が副腎皮質、心筋、気管支、大腸、前立腺及び精巣など広範な正常組織で発現がみられることから、vault/MVP が生理的になんらかの重要な役割を果たしていると考えられる。

Vault の細胞内局在は主に細胞質に、約 5%が核膜または核膜孔に存在しているが、その構造が核膜孔複合体に類似していることから、vault が核-細胞質間輸送に関与しているとも考えられた。また、vault は、多くの多剤耐性癌細胞株において発現が亢進しているという報告がある。さらに、MVP が P-糖タンパク質を発現していない多剤耐性肺癌細胞株に発現している多剤耐性に関与すると考えられた lung resistance-related protein (LRP)と同一分子であるという報告や、癌細胞において、MVP が種々の抗癌剤により直接的に発現が誘導されるという報告、分化誘導剤として知られる酪酸ナトリウム(SB)により誘導される MVP が ADM の核からの排泄を促進するという報告から、vault/MVP が抗癌剤耐性に関与することも示唆されている。

しかしながら、MVP cDNA をトランスフェクトした細胞は多剤耐性にならず、また、MVP 遺伝子の欠損は、マウス由来線維芽細胞(MEF) の細胞内 ADM 蓄積及び排泄率に影響しなかったという報告があり、さらに最近の知見では、膀胱癌細胞において MVP のノックダウンにより ADM の核から細胞質への排出が阻害されるが、その阻害の程度は小さく、MVP 単独では多剤耐性の獲得に十分ではないとの報告があり、vault/MVP の抗癌剤耐性への関与は、議論の分かれるところである。このように、vault/MVP の機能には未だ不明な点が多く存在する。

一方、MVP の発現が UV 照射、DNA 傷害性薬剤および高熱など様々なストレスによって上昇することが報告されている。また、近年の研究から、MVP が老化した細胞における酸化ストレスによるアポトーシスを抑制することや、MVP ノックアウトマウスを用いた実験から MVP が気道上皮における緑膿菌感染の抵抗性に関与することなどが報告されている。このことから、MVP がストレス回避機構として機能する可能性が考えられる。細胞に加わるストレスの一つに高浸透圧があるが、これまで、当研究室では、高浸透圧ストレスによって誘導される MVP がアポトーシスを抑制することを報告し

ている。しかしながら、MVP の発現亢進機構の詳細については未だ不明である。そこで、本研究では、高浸透圧ストレスによる MVP の発現亢進機構の解明が高浸透圧を呈する病態の新たな機構の解明につながる可能性があると考え、高浸透圧による MVP の発現亢進機構の解明を行った。

【材料および方法】

ヒト大腸癌細胞株 SW620 に MVP プロモーター領域のうち p53、STAT、Sp1 の結合領域を含むプラスミドである pMVP78 を導入し、ルシフェラーゼアッセイを行った。また、ヒト大腸癌細胞株 SW620 に STAT1 siRNA、Sp1 siRNA を処理し、高浸透圧下における MVP の発現について immunoblot 法により解析を行った。Chromatin immunoprecipitation (ChIP)アッセイ解析により、高浸透圧下 Sp1 の MVP プロモーターへの結合について解析した。さらに、immunoblot 法により高浸透圧下における Sp1、JNK のタンパク質発現量を、RT-PCR 法により Sp1 mRNA 発現量の解析を行った。高浸透圧下における Sp1 のユビキチン化については In vitro ubiquitination assay を用いて解析した。

【結果】

SW620 細胞では高浸透圧により pMVP78 のルシフェラーゼ活性が上昇した。このことから、高浸透圧下 MVP の発現誘導には p53、STAT、Sp1 のいずれかの結合領域が重要であることが示唆されたが、SW620 細胞は変異型 p53 を含む細胞であることから、STAT、Sp1 に結合する転写因子が重要であると考えられた。高浸透圧下 Sp1 siRNA は MVP の発現誘導を抑制したが、STAT1 siRNA では発現誘導に変化が見られなかった。また、ChIP アッセイを用いた解析の結果、高浸透圧により Sp1 の MVP プロモーターへの結合は増加した。

さらに、高浸透圧下、Sp1 のタンパク質発現量および mRNA 発現量について調べたところ、タンパク質発現量の増加は認められたが、mRNA 発現量の変化は認められなかった。高浸透圧による Sp1 タンパク質の発現誘導はタンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドにより抑制されなかった。また、SW620 細胞にプロテアソーム阻害剤 MG132 を処理すると Sp1 発現量の増加がみとめられた。In vitro ubiquitination assay の結果から高浸透圧により Sp1 のユビキチン化の低下が認められた。

SW620 細胞において高浸透圧により c-jun N terminal kinase (JNK)のリン酸化が亢進した。さらに、JNK の特異的阻害剤 SP600125 により高浸透圧による Sp1 および MVP の発現誘導が抑制された。

【結論及び考察】

本研究により、高浸透圧によって誘導される MVP の発現亢進機構に Sp1 および JNK が関与することが証明された。その発現機構として、高浸透圧ストレスが JNK を活性化し、それにより Sp1 のユビキチン化が抑制され、Sp1 タンパク質が蓄積し、Sp1 による MVP の転写が活性化されることが示唆された。

臨床上高浸透圧を呈する病態として高 Na 血症や糖尿病などが考えられるが、これらの病態では細胞障害、組織障害が起こり得る。糖尿病の合併症として糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、糖尿病性神経障害があり、この発症のメカニズムには血管障害などが関与していることが知られている。MVP は神経細胞や網膜神経細胞においても発現が見られるとの報告や生体内においては腎臓で発現が高いことなどが報告されている。本研究では、高浸透圧ストレスによって誘導される MVP がアポトーシスを抑制することを報告しており、今回、高浸透圧によって誘導される MVP の発現機構についての新知見を得たが、この解明により糖尿病や高 Na 血症時の細胞障害の新たな機構の解明につながるかもしれない。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 240 号	学位申請者	田實 裕介	
審査委員	主査	宮田 篤郎	学位	博士 (医学)
	副査	有馬 直道	副査	小澤 政之
	副査	中川 昌之	副査	徳田 雅行

Molecular basis for the expression of major vault protein induced by hyperosmotic stress in SW620 human colon cancer cells

(ヒト大腸癌細胞SW620において高浸透圧によって誘導される major vault protein の発現亢進機序)

Vault は、major vault protein (MVP)、telomerase-associated protein 1 (TEP1) および vault poly (ADP-ribose) polymerase (VPARP) の 3 種類のタンパク質と数分子の vault RNA から構成される既存の中では最大の RNA タンパク質複合体である。Vault は中空で樽状の特徴的な構造をとっているが、この構造は多くの真核生物において確認されており、生体内において重要な機能を有すると考えられている。しかしながら、その機能については未だ不明な点が多い。Vault の主要な構成成分である MVP は、抗がん剤や低酸素など様々なストレスによって発現量が増加することが報告されており、細胞のストレス応答反応に重要であると考えられている。これまでに、薬物動態制御学分野では、高浸透圧により MVP が発現上昇し、MVP が高浸透圧によって誘導されるアポトーシスを抑制することを報告している。しかしながら、高浸透圧によって MVP が発現上昇する機序については未だ不明である。そこで、学位申請者は、高浸透圧によって誘導される MVP の発現亢進機序の解明を目的として研究を行った。

具体的には、ヒト大腸癌細胞株 SW620 を用いた immunoblot 法、RT-PCR 法、luciferase assay、クロマチン免疫沈降アッセイ (ChIP assay) およびアフリカミドリザル腎臓由来細胞株 COS-7 を用いた ubiquitination assay により解析を行い、以下の知見が明らかにされた。

- 1) 高浸透圧による MVP の発現亢進には転写因子 Sp1 による MVP 転写活性の上昇が関与することが判明した。
- 2) 高浸透圧は Sp1 の新規合成に影響を及ぼすことなく、Sp1 タンパク質の発現量を増加させた。
- 3) 高浸透圧は Sp1 のユビキチン化を抑制した。
- 4) 高浸透圧による Sp1 タンパク質の安定化には c-Jun N 末端キナーゼ (JNK) による Sp1 タンパク質のリン酸化が関与することが判明した。

今回の結果から、高浸透圧によって誘導される MVP の発現亢進機序には、高浸透圧によって活性化される JNK が Sp1 をリン酸化し、Sp1 のユビキチン化が回避されることによる Sp1 タンパク質の安定化が関与することが明らかとなった。本研究は高浸透圧による MVP の発現亢進機序を明らかにし、高浸透圧に対する細胞のストレス応答反応の一部を解明した点で興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 240 号		学位申請者	田實 裕介
審査委員	主査	宮田 篤郎	学位	博士 (医学)
	副査	有馬 直道	副査	小澤 政之
	副査	中川 昌之	副査	徳田 雅行
<p>主査および副査の5名は、平成25年2月20日、学位申請者 田實 裕介君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) Fig.1Cに示してあるSTAT1のノックダウンは、MVPの発現に影響していないのか？</p> <p>(回答) STAT1ノックダウンによりMVPの発現が軽度上昇しているようにも見えるが、定量化したデータはなく、また、Sp1ノックダウンによりMVPの発現亢進が顕著に抑制されていることから、高浸透圧によるMVPの発現上昇にはSp1が重要であると考えている。</p> <p>質問2) 100 mMのsucroseは、どの程度のOsm値か？また、この濃度で24時間後の細胞生存率はどれくらいか？</p> <p>(回答) 論文上での100 mMの表記が約400 mOsm程度である。24時間後の生存率については調べていないが、72時間後の生存率は80%程度である。</p> <p>質問3) Sucrose以外の条件で実験を行ったか？例えば、NaClなどを用いて実験を行ったか？</p> <p>(回答) 高浸透圧がMVPの発現に及ぼす影響については、高浸透圧刺激以外にイオン強度の上昇による影響の可能性を考えて、電離するNaClと電離しないsucroseを処理する2つの条件で行っており、いずれの条件においてもMVPの発現上昇が認められている。その後の解析については、主にsucroseを用いて行った。NaCl処理によりMVPの他、Sp1タンパク質の発現上昇も確認している。</p> <p>質問4) 多剤耐性因子としてのMVPの役割についてどのように考えるか？</p> <p>(回答) MVPは多剤耐性肺癌細胞株に発現しているlung resistance-related protein (LRP)と同一分子であることや、MVPがアドリアマイシン (ADM) の核からの排泄を促進するという報告、その他、上皮成長因子受容体 (EGFR) 阻害剤耐性やビンクリスチン耐性等様々な抗がん剤の耐性に関するという報告がある。しかしながら、MVP遺伝子欠損 (KO) マウス由来細胞の細胞内ADM蓄積率、排泄率および感受性は、野生型マウス由来細胞と比較して差は見られなかったという報告もあり、vault/MVPの多剤耐性因子としての働きは様々な因子との関わり合いにより現れると考えているが、不明な点が多く、今後さらなる検討が必要と考えている。</p> <p>質問5) SW620細胞を使用しているが、他の細胞での再現はとれているか？</p> <p>(回答) MVPの発現亢進についてはSW620細胞以外にヒト咽頭癌細胞株KB3-1、ヒト小細胞肺癌細胞株S1、ヒト子宮頸癌細胞株Yumoto、ヒト白血病細胞株U937においても認められている。また、S1細胞においてはSp1タンパク質の発現上昇も確認している。</p> <p>質問6) MVPプロモーターには7つの転写因子の結合サイトが存在するとのことだが、そのうちの一つであるY-boxには、YB-1が結合することが判明している。これまでにYB-1がMVPの発現に関与するという報告はあるか？</p> <p>(回答) 5-FUによるMVPの発現誘導にYB-1が関与するという報告がある。</p> <p>質問7) Vault/MVPは、ほとんどが細胞質に存在し、一部核膜に存在するとのことだが、vault/MVPが細胞質に局在することが細胞のストレス応答に有益なのか？</p> <p>(回答) 細胞質におけるvault/MVPの機能に関して、MVPが癌抑制遺伝子として知られるPTENと結合して、PTENを核へ輸送することや癌遺伝子として知られるSrcと結合することによりSrcを介するシグナルを抑制すること、転写因</p>				

子である HIF-1 α と結合することによりその分解を促進することなどの報告がある。このように MVP は細胞内の輸送やシグナル制御、タンパク質分解など細胞質で様々な役割を有していることが報告されており、細胞の様々なストレス応答反応において vault/MVP の細胞質での機能が重要であると考えられる。

質問 8) 正常組織において MVP の発現が認められているということであったが、vault/MVP の生理機能としてどのようなことが考えられるか？

(回答) これまでのところ、生理条件下においては MVPKO マウスでは表現型が認められていない。一方で、MVPKO マウスの気道上皮細胞に緑膿菌を感染させると、野生型マウスへの感染と比較して緑膿菌のクリアランスが低下するという報告があり、生体がストレスにさらされた場合に、その回避反応に関与すると考えている。

質問 9) Sp1 サイトに mutation を入れたコンストラクトを用いて実験を行っていないのか？

(回答) Sp1、p53、STAT の結合サイトを含むコンストラクトの Sp1 サイトに mutation を入れたルシフェラーゼベクターの作製も行っていたが、論文投稿までにそのコンストラクトの作製が間に合わなかったために、それを用いたルシフェラーゼアッセイは行っていない。

質問 10) なぜ強制発現系の実験のみ COS-7 細胞を用いたのか？

(回答) COS-7 細胞は導入効率のよい細胞として広く知られていたため、実験に用いた。論文には示していないが、SW620 細胞においてユビキチンを強制発現させずに、Sp1 の免疫沈降を行い、抗ユビキチン抗体を用いて高浸透圧が Sp1 のユビキチン化に及ぼす影響について解析したところ、SW620 細胞においても COS-7 細胞と同様に高浸透圧により Sp1 のユビキチン化が抑制されることを確認している。

質問 11) JNK が Sp1 をリン酸化して、プロテアソームによる分解を抑制するということがあったが、JNK が Sp1 以外のタンパク質の分解を抑制するという報告があるか？

(回答) JNK による c-Jun の 73 番目のセリン残基のリン酸化により c-Jun のユビキチン化が抑制されるといった報告や JNK が ATF2 のユビキチン化を抑制するといった報告がある。

質問 12) JNK による Sp1 のユビキチン化の抑制に関与するスレオニン残基のリン酸化サイトは同定されているか？

(回答) Sp1 の 278 番目と 739 番目のスレオニン残基が JNK1 によりリン酸化されることにより、Sp1 の E3 ユビキチンリガーゼである RNF4 の Sp1 への結合が低下することが報告されている。Sp1 の Thr278、Thr739 をアスパラギン酸置換したリン酸化変異体では Sp1 が安定化することも示されている。

質問 13) 高浸透圧によって MVP 以外の vault の成分も増加するか？

(回答) Immunoblot 法により高浸透圧による VPARP の発現上昇を確認している。また、MVP はほぼすべてが vault に取り込まれるといわれているため、コントロールのサンプルおよび sucrose を添加したサンプルについて、vault が超遠心により分離できる 60,000 G の分画を採取し、MVP の発現を確認したところ、sucrose 添加により MVP の発現量が増加していたため、高浸透圧により MVP 以外の vault の成分も増加し、vault 自体が増加していると考えている。

質問 14) MVP プロモーターの転写因子結合サイトのうち p53、Sp1、STAT の結合サイトは、ヒトとマウス、ラット等の動物間で相同性が認められているか？

(回答) ヒトおよびマウスの MVP プロモーターについての報告があり、Sp1 の結合サイトのみ相同性がある。

質問 15) 実験を高浸透圧処理後 24 時間で行っている場合と 48、72 時間の比較的長い時間で行っている場合があるが、なぜか？

(回答) MVP はほとんどすべてが vault に取り込まれるが、vault に取り込まれた MVP の半減期は少なくとも 3 日間はあるともいわれていることから、MVP のタンパク質発現解析は、MVP が vault に取り込まれた後、より安定化した状態で行うために、高浸透圧刺激後比較的長い時間で行った。Sp1 の発現解析については高浸透圧処理後 0~24 時間で行ったが、これは高浸透圧刺激後 12 時間後において、Sp1 タンパク質の発現が最も上昇していたため、MVP のタンパク質発現解析よりも短い時間で行っている。ルシフェラーゼアッセイは高浸透圧刺激後 48 時間のデータしか論文には載せていないが、24 時間後においても 48 時間後と同様の結果が得られている。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。