

生 化 学 講 座

教授：吉田 清嗣 分子腫瘍学，病態医化学
 准教授：高田 耕司 分子細胞生物学，病態生化学
 准教授：朝倉 正 がんの生化学，病態医化学

教育・研究概要

I. がんの生化学

1. DYRK2による細胞周期制御とその破綻による発癌機構

c-Junとc-Mycは細胞周期G1/S期の進行に重要な転写因子である。c-Junとc-Mycの発現は細胞周期を通して厳しく制御されており，その制御機構の破綻は癌化を引き起こすと考えられている。c-Junとc-MycはS期を過ぎるとすみやかに分解されるが，この分解にはリン酸化やユビキチン化などの翻訳後修飾が関わっていると考えられている。本年度，我々はDYRK2キナーゼがGSK3 β キナーゼと共にc-Junとc-Mycの分解を引き起こすことを明らかにした。DYRK2キナーゼをノックダウンした癌細胞では，上記の分解機構の破綻によるc-Junとc-Mycの高発現が生じ，腫瘍形成能が上昇することが明らかとなった。また，臨床検体を用いた病理解析によると，DYRK2キナーゼは浸潤性乳管癌組織で発現が低下していることが判明した。そして，同検体でc-Junとc-Mycの発現上昇が認められた。これらの結果より，DYRK2キナーゼの発現の低下は腫瘍化を引き起こすことが示唆された。

2. プロテアソーム阻害剤耐性細胞の上皮間葉転換誘発機構の解明とその治療法の確立

子宮がん細胞IshikawaにおけるE-Cadherinの発現は，プロテアソーム阻害剤Epoxomicinに対して耐性を獲得することで転写抑制因子ZEB1発現誘導を介してE-Cadherinの発現が消失した。また，この発現調節系にはdual specificity protein phosphatase 6 (DUSP6)の関与が確認された。

3. 癌細胞膜表面高発現糖タンパク質CD147を標的とした高分子ミセルによる化学療法の検討

高分子ミセルに抗CD147抗体(aCD147ab)を標識しGSH-DXRを内封したミセル製剤は，aCD147abの高発現しているヒト類表皮癌細胞A431およびヒト子宮癌細胞Ishikawaに特異的，かつ有効な抗腫瘍効果を示したので，担がんマウスでの*in vivo*治療効果検討の準備を進めている。

4. ヒト高分化型肝細胞癌株を用いたフィブリノーゲンの産生

2種類の無血清培地(ASF104N, IS-RPMI)とラジアルフロー型バイオリクターを組み合わせたFLC-7細胞の培養系を至適化することで効率的で経済的なフィブリノーゲン産生システムを確立した。安全なフィブリノーゲン製剤開発への応用が期待される。

II. 生体内ユビキチン化蛋白質の生物学的研究

1. カドミウムによる細胞毒性の機序解明

近位尿管由来HK-2細胞と選択的タンパク分解系に作用する各種薬剤を用いて，カドミウムの細胞毒性に対する作用を解析した。その結果，ユビキチン-プロテアソーム系がカドミウムの細胞毒性に対する保護作用を担うことが強く示唆された。

2. 絶望行動に関与する脱ユビキチン化酵素USP46の研究

ユビキチン特異的プロテアーゼ(USP)は脱ユビキチン化酵素であり，特定の標的タンパク質からユビキチンを切り離すことでそのタンパク質の安定性や局在を調節する，ユビキチン-プロテアソーム系の調節因子である。近年，マウスの尾懸垂実験によるスクリーニングから無動行動を起こさないCSマウスが見出され，その異常行動の原因遺伝子がUSP46の変異体をコードしていることが明らかになった。CSマウスのUSP46遺伝子には3塩基の欠失が存在し，その結果，タンパク質では92番目のアミノ酸であるリジンが欠失する。このアミノ酸の欠失がUSP46の酵素活性に及ぼす影響は不明であるため，我々はその酵素活性測定系の構築を目的として，哺乳類細胞でのUSP46タンパク質の安定発現系を作成した。HeLa細胞内で安定的に発現したUSP46のタンパク質量を他の培養細胞と比較したところ，その発現量はHEK293細胞の内在性USP46に及ばないことが明らかとなった。このことから，我々はUSP46が他のパートナータンパク質と脱ユビキチン化酵素複合体を形成することで安定に存在し，単独の発現では不安定であると考えた。この仮説をもとに，既知のUSP46結合タンパク質の中からUSP46タンパク質を安定化するものを検索したところ，USP12-WDR48脱ユビキチン化酵素複合体のサブユニットとして同定されていたWDR20がUSP46安定化因子として機能していることが明らかになった。

「点検・評価」

1. 研究

本年度より講座担当教授として吉田清嗣が着任し、発がん機構の解明とがん治療への応用を主たる研究テーマとする講座へとリニューアルされた。一方これまでに講座で行われてきた研究も引き続き進行しており、新規と既存の研究課題が有機的に連携することで、相乗効果が期待される。特記すべき事項としては、まず DYRK2 キナーゼの機能解析から、新たな癌の浸潤・進展機構が解明され、癌治療の標的分子となる可能性を提示することができた。また3次元ラジアルフローバイオリクターを利用したヒトアルブミン・フィブリノーゲンの安全大量産生法の開発をスタートさせ、高産生系の確立が期待されている。また多剤耐性をクリアーするための作用機序の検討が重点的に行われ、臨床応用の可能性が充分手応えとして得られた。

2. 教育

主に医学科2年生そして3年生の一部の教育に携わっている。2年生前期の基礎医科学I「分子から生命へ」では、講義・演習・実習を分子生物学講座と密接に連携しながら担当している。演習や実習では、少人数による「議論を通じて考えて理解する」能動的な学習を促すよう周到な準備のもと実施しており、多大な教員の負担はあるものの、充分それに見合う教育効果が得られていると考えている。

研究業績

I. 原著論文

- 1) Suzuki K, Dashzeveg N, Lu ZG, Taira N, Miki Y, Yoshida K. Programmed cell death 6, a novel p53-responsive gene, targets to the nucleus in the apoptotic response to DNA damage. *Cancer Sci* 2012; 103(10): 1788-94.
- 2) Ueda K, Yamada K, Kiyokawa T, Iida Y, Nagata C, Hamada T, Saito M, Aoki K, Yanaihara N, Takakura S, Okamoto A, Ochiai K, Ohkawa K, Tanaka T. Pilot study of CD147 protein expression in epithelial ovarian cancer using monoclonal antibody 12C3. *J Obstet Gynaecol Res* 2012; 38(9): 1211-9.

II. 総説

- 1) Taira N, Yoshida K. Post-translational modifications of p53 tumor suppressor: determinants of its functional targets. *Histol Histopathol* 2012; 27(4): 437-43.
- 2) 平 直江, 吉田清嗣. *Current Topics: 抗腫瘍性キ*

ナーゼによる細胞周期制御とがんの進展. *実験医* 2012; 30(11): 1786-9.

III. 学会発表

- 1) 平 直江, 三本 麗, 倉田盛人, 北川昌伸, 三木義男, 吉田清嗣. DYRK2の発現欠失によるc-Jun/c-Mycの制御異常は細胞の腫瘍化を引き起こす. 第71回日本癌学会学術総会. 札幌, 9月.
- 2) 朝倉 正, 横山昌幸, 白石貢一, 青木勝彦, 大川 清, 吉田清嗣. 癌細胞に高発現の膜タンパク質CD147を標的とした新規ミセルによる化学療法の見直し. 第71回日本癌学会学術総会. 札幌, 9月.
- 3) 三本 麗, 山口乃里子, 平 直江, 鷹橋浩幸, 三木義男, 吉田清嗣. DYRK2はsnailをリン酸化し乳がんの浸潤・転移を制御する. 第71回日本癌学会学術総会. 札幌, 9月.
- 4) ダシゼウエグ・ヌルマ, 木村純子, 平 直江, 三木義男, 吉田清嗣. The comprehensive search of p53 target genes that promote apoptosis. 第71回日本癌学会学術総会. 札幌, 9月.
- 5) 松本倫典, 松浦知和, 青木勝彦, 矢永勝彦, 大川 清, 吉田清嗣, 高田耕司. ヒト高分化型肝細胞癌株を用いたフィブリノーゲンの効率的産生システムの検討. 第85回日本生化学会大会. 福岡, 12月.
- 6) 高田耕司, 湯川豊一, 青木勝彦, 吉田清嗣. カドミウムの細胞毒性に対するユビキチン-プロテアソーム系の保護作用. 第85回日本生化学会大会. 福岡, 12月.
- 7) 青木勝彦, 宮野千草, 梅村翔也, 朝倉 正, 吉田清嗣, 海老原史樹文, 高田耕司. 絶望行動を制御する脱ユビキチン化酵素 USP46 と相互作用するタンパク質の検索. 第85回日本生化学会大会. 福岡, 12月.
- 8) Mimoto R, Imawari Y, Kamio M, Kato K, Nogi H, Toriumi Y, Takeyama H, Yoshida K, Uchida K. DYRK2 regulates breast cancer invasion via Snail/E-cadherin pathway. *CTRC-AACR San Antonio Breast Cancer Symposium*. San Antonio, Dec.
- 9) Yoshida K. DYRK2 phosphorylation of c-Jun/c-Myc controls tumor progression by monitoring G1/S transition. *1st International Symposium on Protein Modifications in Pathogenic Dysregulation of Signaling*. Tokyo, Feb.
- 10) Taira N, Miki Y, Yoshida K. Identification of a novel mechanism for apoptosis and microRNA metabolism in response to genotoxic stress. *9th Joint Conference of the American Association for Cancer Research and the Japanese Cancer Association*. Maui, Feb.
- 11) Dashzeveg N, Taira N, Miki Y, Yoshida K. The comprehensive study for the target genes of the Ser-

ine 46 phosphorylation of the p53. 9th Joint Conference of the American Association for Cancer Research (AACR) and the Japanese Cancer Association (JCA). Maui, Feb.

分子生物学講座

教授：松藤 千弥 生化学・分子生物学
講師：小黒 明広 分子生物学
講師：村井 法之 生化学・分子生物学

教育・研究概要

ポリアミン（プトレッシン，スベルミジン，スベルミン）は全ての細胞中に多量に存在する低分子生理活性物質で，主に核酸に結合し，遺伝子発現や細胞の増殖・分化に重要な役割を果たしている。ポリアミンは増殖の盛んな細胞内で増加するため，がんのバイオマーカーとしても有用である。ポリアミンはアミノ酸を材料とする生合成と細胞外からの取り込みによって供給されるが，その両方がアンチザイム（AZ）により負に調節される。AZの発現には翻訳フレームシフトが必要であり，その効率は細胞内のポリアミン濃度により規定され，この負のフィードバックシステムにより細胞内ポリアミン量が調節されている。AZは哺乳類ではAZ1～3の3種類が存在し，さらにAZは2種類のアンチザイムインヒビター（Azin1, 2）により機能阻害される。我々はポリアミンの調節系の生物学的意義と分子機構を解明し，さらにそれらを利用した研究および診断ツールの開発を目指している。

I. AZ2によるc-Mycの分解機構とその意義

我々はこれまでにAZ2が哺乳動物培養細胞においてc-MYCの分解を促進することを見出した。c-MYCは低酸素（ $< 1\% O_2$ ）・低栄養（グルコースフリー）環境下において，通常培養時より速やかに分解されることが報告されている。そこでこの条件下においてsiRNAによるAZ2のノックダウンによりc-MYCの分解が阻害されるかを解析したところ，明らかなc-MYC分解の抑制が確認された。またこの低酸素および低栄養環境においてAZ2のフレームシフトが促進していることが確認された。c-MYCは核質だけでなく核小体にも局在しリボソームRNA遺伝子の転写を促進していることが知られている。c-MYCの核小体局在はプロテアソーム阻害剤存在下で確認できる。そこで同条件下でAZ2の局在を蛍光抗体を用いて解析したところ，明らかな核小体局在を示した。さらにAZ2とc-Mycは核小体に共局在することが確認された。このことからAZ2は核質だけでなく核小体においてもc-MYCと相互作用していることが明らかになった。