

副甲状腺

癌抑制因子パラフィブロミンは SV40 large T 抗原存在下では 細胞増殖促進に働く

岩田 武男* 水澤 典子* Hossain Md. Golam* 吉本 勝彦*

* 徳島大学大学院 ヘルスバイオサイエンス研究部 分子薬理学分野

要 旨

パラフィブロミンは副甲状腺機能亢進症—顎腫瘍症候群の原因遺伝子 *HRPT2* がコードする 531 アミノ酸残基からなる蛋白質である。4 種の異なる細胞株を用いてパラフィブロミンを過剰発現させた際の細胞増殖効果を調べたところ、HEK293 細胞、NIH3T3 細胞でのパラフィブロミン過剰発現は細胞増殖の抑制を示した。一方、SV40 large T 抗原 (LT) 発現細胞株である 293FT 細胞と COS7 細胞では、パラフィブロミンの過剰発現は細胞増殖の促進を示した。293FT 細胞ではパラフィブロミンと LT は相互作用を示し、パラフィブロミンの過剰発現は S 期の細胞数を増加させた。これらの結果より、癌抑制蛋白質であるパラフィブロミンは LT 存在下では細胞増殖を促進させる癌蛋白質としての作用を有することが示唆された。

1. 背 景

副甲状腺機能亢進症は副甲状腺の腫瘍化および過形成により副甲状腺ホルモンが過剰分泌する疾患である。この疾患は、遺伝性ではない孤発性の発症がほとんどを占めるが、ごく稀に遺伝性の副甲状腺機能亢進症も存在する。遺伝性の副甲状腺機

能亢進症は、多発性内分泌腫瘍症 1 型および 2A 型、家族性副甲状腺機能亢進症、副甲状腺機能亢進症—顎腫瘍症候群 (HPT-JT) が知られている。HPT-JT は副甲状腺腫瘍と顎線維腫を生じ、他の孤発性および遺伝性副甲状腺機能亢進症の腫瘍がほとんど良性であるのに対し、副甲状腺癌の頻度が高い点に特色を有する。HPT-JT や孤発性副甲状腺癌では 1 番染色体上に位置する *HRPT2* の胚細胞性あるいは体細胞性変異が高頻度に検出されること¹⁾ および *HRPT2* は癌抑制遺伝子として作用していることが明らかにされている。パラフィブロミンは *HRPT2* がコードする 531 残基のアミノ酸より構成される核蛋白質であり、その C 末端は酵母 Cdc73 蛋白と相同性を有する。Cdc73 蛋白は Paf1, Leol, Ctr9, Rtf1 と酵母 Paf1 複合体を形成し、RNA ポリメラーゼ II の転写調節に関与していることから、パラフィブロミンは酵母 Cdc73 蛋白のヒトホモログであり、ヒト Paf1 複合体の構成蛋白質である可能性が示唆されている。実際にパラフィブロミンは酵母 Paf1, Leol, Ctr9, Rtf1 のヒトホモログと相互作用することが報告されているが²⁻⁴⁾、ヒト Paf1 複合体の生理作用およびパラフィブロミンが関わる癌抑制機序に関しては現時点では不明である。

パラフィブロミンが細胞増殖に与える影響を調べる目的で、HEK293, 293FT, COS7, NIH3T3 の各細胞株にパラフィブロミンを過剰発現させた際の細胞増殖に対する影響を検討したところ、予想通り HEK293 と NIH3T3 の細胞株でのパラフィブロミン過剰発現は細胞増殖を抑制したことから、パラフィブロミンが細胞増殖抑制能を示す癌抑制蛋白質であることが示唆された。一方、驚くべきことに 293FT と COS7 の細胞株でのパラフィブロミンの過剰発現は逆に細胞増殖を促進させた。293FT と COS7 はともに Simian virus 40 (SV40) の large T 抗原 (LT) により形質転換されている細胞株である。SV40 は感染した宿主で癌蛋白質である LT を産生し、宿主の様々な転写因子や DNA 複製に関わる因子と LT が相互作用し、宿主の遺伝子発現や増殖を変化させる⁵⁾。特に p53 や pRb のような細胞周期を調節する癌抑制蛋白質と相互作用することはよく知られている⁶⁾。LT がヒトの癌化に直接関与する可能性は少ないが、細胞を用いた基礎研究の分野では LT は形質転換の有益なツールとしてよく用いられている。我々は、293FT や COS7 細胞株でのパラフィブロミン過剰発現による細胞増殖促進は LT とパラフィブロミンの相互作用により引き起こされると仮説を立てた。その仮説を立証すべくパラフィブロミンと LT の相互作用を検討した。

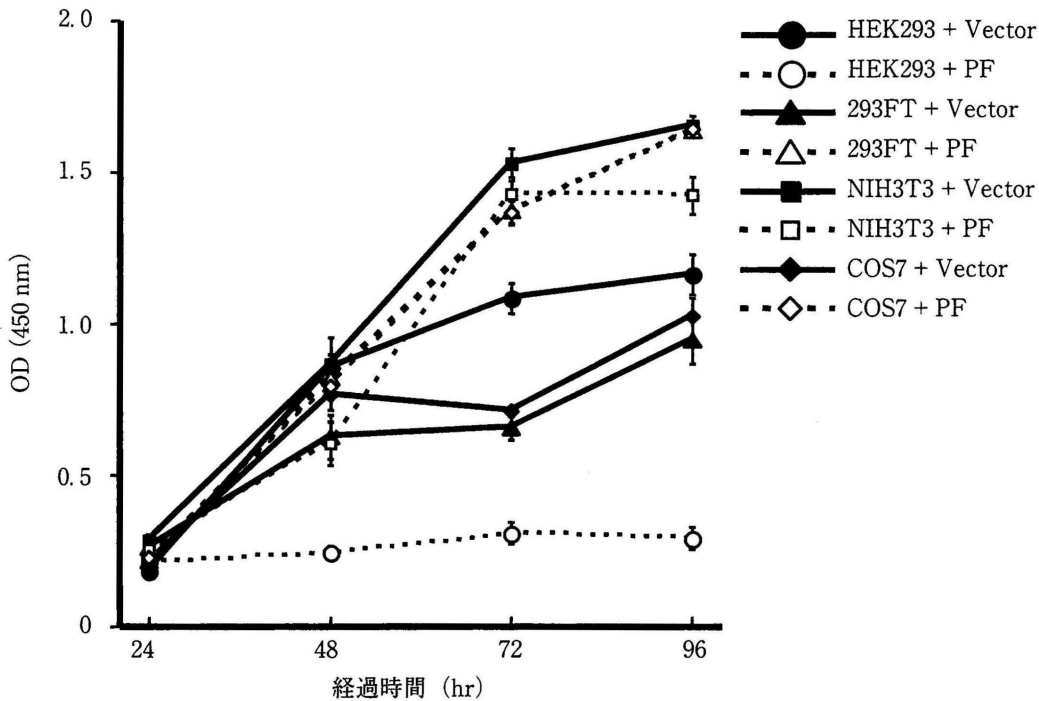


図1 パラフィブロミン (PF) を過剰発現させた各細胞の増殖曲線
細胞導入時から 24, 48, 72, 96 時間後の細胞数を Cell Counting Kit-8 (DOJINDO 社) を用いて測定した。

2. 結 果

1) パラフィブロミンは LT 発現細胞株の細胞増殖を促進する

パラフィブロミンの癌抑制蛋白質としての機能を調べるために、HEK293, 293FT, COS7, NIH3T3 の各細胞株にパラフィブロミンを過剰発現させた際の細胞数の増減を調べた (図1)。HEK293, 293FT, COS7, NIH3T3 の各細胞株に対する遺伝子導入効率を GFP 発現ベクターの導入により検討したところ、それぞれ 80, 80, 80, 20%であった。HEK293 細胞では、パラフィブロミン過剰発現細胞は対照とした空ベクター導入細胞と比べ、細胞増殖が有意に抑制された。また NIH3T3 細胞でも遺伝子導入効率が悪いにもかかわらず、パラフィブロミン過剰発現により細胞増殖の抑制が認められた。一方、293FT や COS7 の細胞株にパラフィブロミンを過剰発現させたところ、細胞増殖が逆に促進された。293FT や COS7 は LT 発現細胞株であることから、この効果はパラフィブロミンと LT の相互作用によるものと仮説を立てた。

表1 パラフィブロミン過剰発現 293FT 細胞の各細胞周期の細胞数の割合

	G1期 (%)	S期 (%)	G2/M期 (%)
293FT + vector	36.9	44.8	14.8
293FT + PF	26.4	49.4	21.5

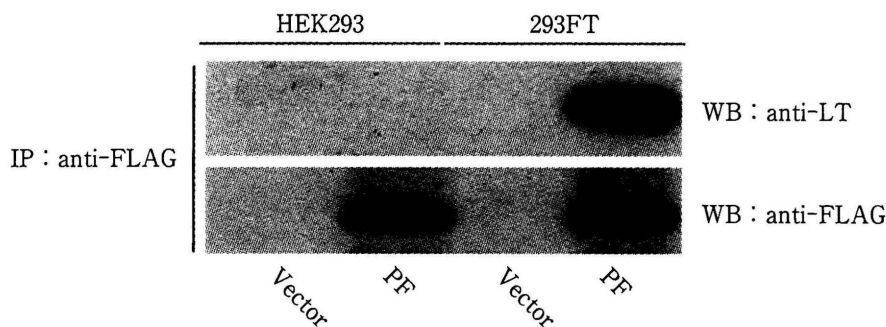


図2 パラフィブロミン (PF) と LT の相互作用

次にパラフィブロミンの過剰発現が細胞周期に与える影響を調べるために、パラフィブロミン過剰発現 293FT 細胞の各細胞周期の細胞数の割合をフローサイトメトリーにより測定した (表 1)。対照とした空ベクター導入 293FT 細胞の各細胞周期のパラメーターと比較して、パラフィブロミン過剰発現 293FT 細胞は S 期や G2/M 期の細胞数の増加が観察されたことから、パラフィブロミンは LT 発現細胞では S 期への移行を促進することが示唆された。このことから、LT 発現細胞株ではパラフィブロミン過剰発現は細胞増殖を促進することが確認された。

2) パラフィブロミンは LT と相互作用する

パラフィブロミンと LT の相互作用を調べるために、FLAG タグを付加したパラフィブロミンを発現させた HEK293 および 293FT 細胞の抽出物を抗 FLAG 抗体により免疫沈降し、免疫沈降画分の抗 LT 抗体によるウエスタンブロッティングを行った。LT 発現細胞株である 293FT 細胞で LT とパラフィブロミンの相互作用が検出された (図 2)。一方、LT 非発現細胞株である HEK293 細胞では相互作用は検出されなかった。また 293FT 細胞で抗 LT 抗体を用いた免疫沈降、および抗パラフィブロミン抗体によるウエスタンブロッティングにより内因性のパラフィブロミンと LT との相互作用が確認された。

パラフィブロミンは Paf1, Leol, Ctr9 のヒトホモログとヒト Paf1 複合体を形成する。前述したパラフィブロミンと LT との相互作用は、ヒト Paf1 複合体と LT の相互作用であるのか、パラフィブロミン単独と LT の相互作用であるのか調べる

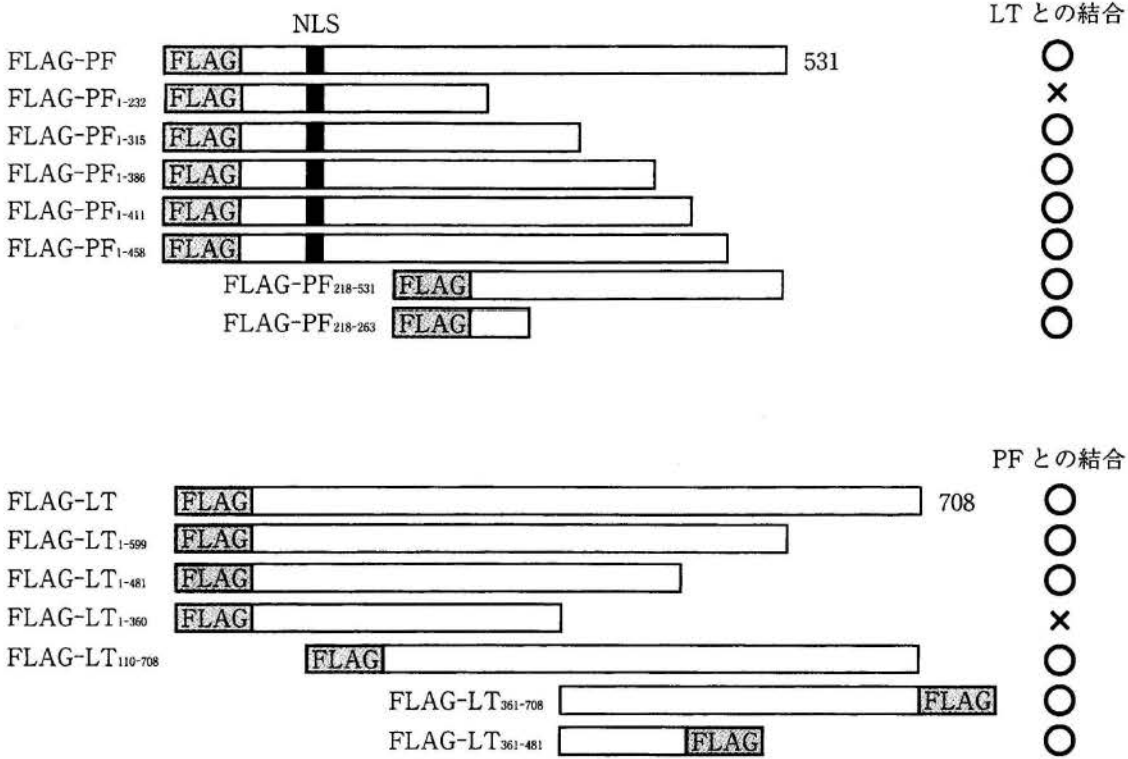


図3 パラフィブロミン (PF) と LT の結合領域の同定
 実験に用いた PF と LT の各欠損変異体の模式図と相互作用の有無を示す。

ために、HA タグを付加した各ヒト Paf1 複合体構成蛋白質を発現させた 293FT 細胞の抽出物を抗 HA 抗体で免疫沈降し、抗 LT 抗体によるウエスタンブロッティングを行ったところ、すべてのヒト Paf1 複合体構成蛋白質と LT の相互作用が確認された。このことから、LT は細胞内でヒト Paf1 複合体と相互作用していることが示唆された。

LT と直接相互作用するヒト Paf1 複合体の構成蛋白質を同定するため、*in vitro* での翻訳系を用いて LT およびヒト Paf1 複合体の構成蛋白質を合成し、LT—各ヒト Paf1 複合体構成蛋白質間の相互作用を検討したところ、パラフィブロミン、Rtf1 のヒトホモログと LT の相互作用が確認されたが、その他のヒト Paf1 複合体の構成蛋白質とは相互作用が認められなかった。Rtf1 は酵母 Paf1 複合体の構成蛋白質であるが、ヒトではその他の Paf1 複合体構成蛋白質との結合は非常に弱く、免疫沈降およびウエスタンブロッティングの検出系ではその相互作用は確認できない。このため、LT—ヒト Rtf1 ホモログ間の相互作用はヒト Paf1 複合体以外の作用である可能性がある。この結果により LT はパラフィブロミンと直接相互作用していることが明らかになった。

次にパラフィブロミンと LT のそれぞれの結合部位の同定を試みた。N 末端あるいは、C 末端に FLAG タグを付加した数種のパラフィブロミンおよび LT の欠損変異体の発現ベクターを構築した。各パラフィブロミン欠損変異体発現 293FT 細胞の抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降および抗 LT 抗体によるウエスタンブロッティングにより、パラフィブロミンの LT との相互作用に必要な部位を同定した。パラフィブロミンの 218-263 アミノ酸配列の間で LT と相互作用していることが確認された。同様に LT のパラフィブロミン結合部位は 361-481 アミノ酸間であることが示された (図 3)。

3. 考 察

パラフィブロミンは癌抑制蛋白質と考えられている。多くの癌抑制蛋白質は、変異、欠失、メチル化などによる不活化の結果、細胞周期のチェックポイント機構が正常に機能しなくなり、その結果、細胞増殖促進を引き起こすと考えられている。実際に、パラフィブロミンは細胞周期促進因子である cyclin D1 の発現を抑制することにより、細胞増殖を抑制するという報告がある⁷⁾。本研究で、我々はパラフィブロミンを HEK293 や NIH3T3 細胞株に過剰発現させることにより、細胞増殖が抑制されるということを再確認したが、LT 発現細胞株である 293FT や COS7 の細胞株では逆にパラフィブロミン過剰発現は細胞増殖を促進することを見出した。

LT 発現細胞株ではパラフィブロミンの過剰発現はパラフィブロミンの細胞増殖抑制能を打ち消しているのではなく、むしろ細胞増殖促進の方向に向かわせる。癌抑制蛋白質が特定の状況下では逆に癌蛋白質としての作用を示す例として、Krüppel-like factor (KLF) family のメンバーである KLF4 は癌抑制蛋白質としての作用を示すが、特定の条件下では癌蛋白質として作用することが報告されている⁸⁾。また多発性内分泌腫瘍症 1 型の原因遺伝子産物として同定された MENIN は癌抑制蛋白質の性質を有するが、転座により白血病を引き起こす癌蛋白質である Mixed-Lineage Leukemia (MLL) に結合し、MLL による癌化機構に必須な因子でもあることが報告されている⁹⁾。これらの例のように、本来癌抑制蛋白質であるパラフィブロミンも LT 発現細胞では癌蛋白質としての作用を示すと考えられる。

パラフィブロミンは酵母 Cdc73 と 32% の相同性を有している。Cdc73 は Paf1, Leo1, Ctr9, Rtf1 とともに酵母 Paf1 複合体の構成蛋白質として RNA ポリメラーゼ II の転写活性を調節している。パラフィブロミンはこれらの酵母ホモログとヒト Paf1 複合体を形成し、ヒストン H3 のメチル化を行い、転写反応を調節していると

考えられる。ヒト Paf1 ホモログの過剰発現は細胞増殖を引き起こすという報告があることから¹⁰⁾、ヒト Paf1 複合体はパラフィブロミンが有する細胞増殖抑制能とヒト Paf1 ホモログが有する細胞増殖促進能で均衡状態にあり、LT との相互作用によりパラフィブロミンの細胞増殖抑制能が消失する結果、その均衡が崩れ、細胞増殖促進に働くという可能性がある。一方、ヒト Paf1 ホモログやパラフィブロミンがヒト Paf1 複合体とは関係なく、独自に細胞増殖に関与する可能性も否定できないため、さらなる研究が今後必要である。

最近、パラフィブロミンは Wnt シグナルの β カテニンと相互作用し、Wnt シグナルをまさに調節しているという報告がなされた¹¹⁾。Wnt シグナルは様々な腫瘍化に関与しており、パラフィブロミンは LT 発現細胞では Wnt シグナルを増強する役割があるのかもしれない。パラフィブロミンの不活化によりその発現が亢進することが知られている cyclin D1 は Wnt シグナルの標的遺伝子であることから、LT 存在下でパラフィブロミンは cyclin D1 の発現上昇を引き起こす可能性がある。そこでパラフィブロミン過剰発現 293FT 細胞で cyclin D1 遺伝子発現を検討したが、mRNA レベルでの変動は認められなかった。今後はパラフィブロミンが他の Wnt シグナルの標的遺伝子発現に影響を及ぼすか調べる必要がある。

LT は SV40 が感染した宿主細胞の蛋白質と相互作用することで、その蛋白質の機能を消失させることが知られている。特に p53 や pRb との相互作用により、細胞周期、DNA 損傷のチェックポイント機構に傷害を生じさせることはよく知られている。LT のアミノ酸配列 103-107 間にある LxCxE モチーフは pRB ファミリーと結合することが知られているが¹²⁾、今回、我々が同定したパラフィブロミン結合領域はアミノ酸配列 361-481 間にあり、LT とパラフィブロミンの相互作用は pRB を介さないことが示唆される (図 4)。また LT の C 末端側のアミノ酸配列 351-450 および 533-626 間に p53 結合領域が存在するが¹³⁾、パラフィブロミン結合領域はその一つと一致する。しかしパラフィブロミンと LT は直接結合することが *in vitro* の実験で確認されていることから、パラフィブロミンとの結合が p53 を介している可能性は低い。

LT 存在下でパラフィブロミンが細胞増殖促進させ、LT とパラフィブロミンの相互作用が認められるという事実は、その相互作用が細胞増殖促進を引き起こしている可能性が高いことを意味する。実際、LT 結合部位を欠損させたパラフィブロミンを LT 発現細胞株に過剰発現させても、細胞増殖の促進は認められなかった。しかしこの変異体はパラフィブロミンが本来有する機能をも失っている可能性も否定できないため、パラフィブロミンと LT の相互作用が細胞増殖促進に必要な条件

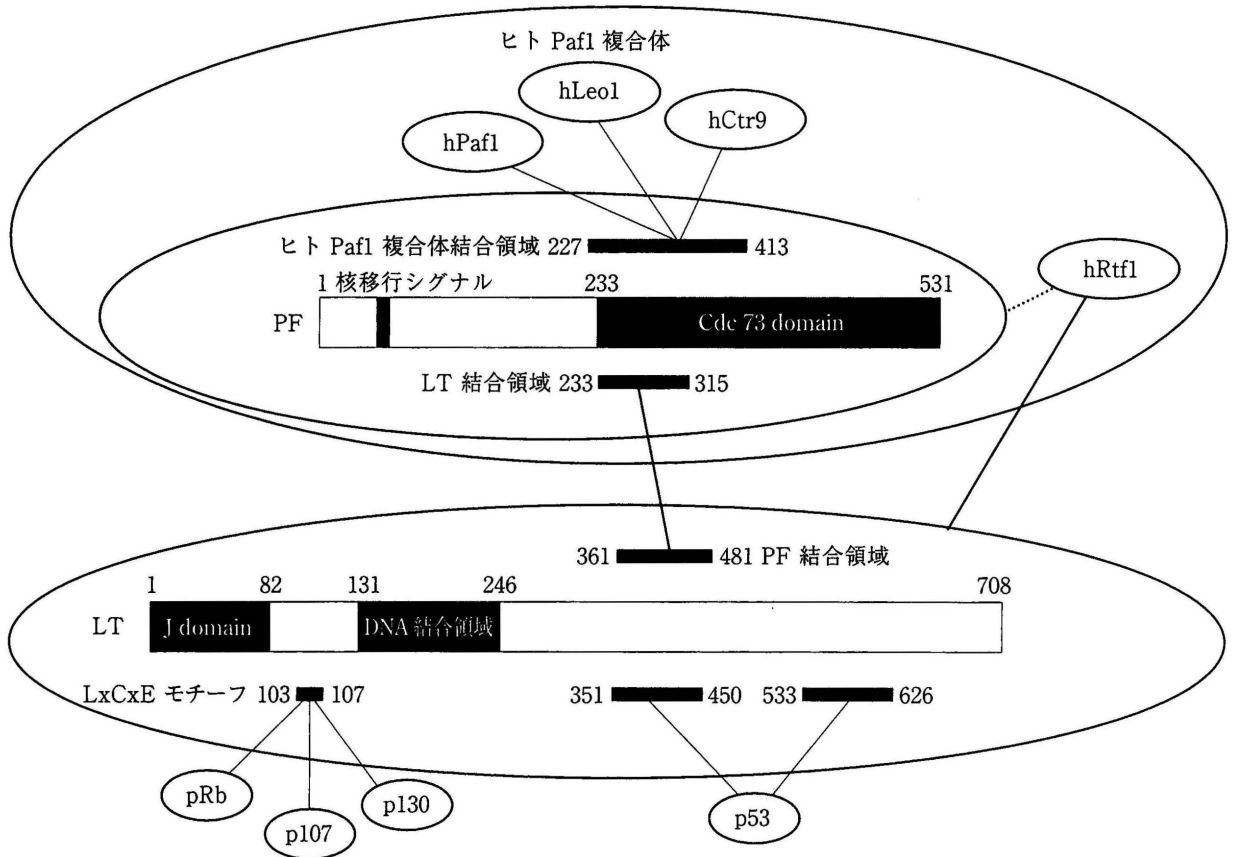


図4 パラフィブロミン (PF) と LT の機能部位
 ヒト Paf1 ホモログ (hPaf1), ヒト Leo1 ホモログ (hLeo1), ヒト Ctr9 ホモログ (hCtr9), ヒト Rtf1 ホモログ (hRtf1) と PF はヒト Paf1 複合体を形成する。

であるか否かは今後の課題である。

我々はパラフィブロミンの LT 結合部位がアミノ酸配列 218-263 に存在することを示したが、この部位はパラフィブロミンの β カテニン結合部位と一致する¹¹⁾。このことは、パラフィブロミンのアミノ酸配列 218-263 は転写活性調節因子と結合する共通モチーフである可能性を示唆する。パラフィブロミンは LT や β カテニンの標的遺伝子の転写活性を増強することで、細胞増殖を制御していることも充分考えられることである。

以上より、パラフィブロミンは異なる 2 つの経路で細胞増殖を制御していると考えられる。1 つは *HRPT2* の変異によるパラフィブロミンの不活化により細胞増殖抑制能が消失し、細胞増殖を促進させる機構で、パラフィブロミンの癌抑制蛋白質としての機能によるものである。もう 1 つは今回示したように、LT 存在下でパラフィブロミンは細胞増殖を促進させるというパラフィブロミンの癌蛋白質としての

作用によるものである。今後はLT以外にパラフィブロミンを癌蛋白質として作用させる因子の同定, またLT存在下でのパラフィブロミンによる細胞増殖促進に関わる分子の同定などを行う必要がある。

文献

- 1) Mizusawa N, et al : Clin Endocrinol (Oxf) 65 : 9-16, 2006.
- 2) Rozenblatt-Rosen O, et al : Mol Cell Biol 25 : 612-620, 2005.
- 3) Yart A, et al : Mol Cell Biol 25 : 5052-5060, 2005.
- 4) Zhu B, et al : Gene Dev 19 : 1668-1673, 2005.
- 5) Simmons DT : Adv Virus Res 55 : 75-134, 2000.
- 6) Ali SH, DeCaprio JA : Semin Cancer Biol 11 : 15-23, 2001.
- 7) Woodard GE, et al : Oncogene 24 : 1272-1276, 2004.
- 8) Rowland BD, Peeper DS : Nat Rev Cancer 6 : 293-303, 2006.
- 9) Yokoyama A, et al : Cell 123 : 207-218, 2005.
- 10) Moniaux N, et al : Oncogene 25 : 3247-3257, 2006.
- 11) Mosimann C, et al : Cell 125 : 327-341, 2006.
- 12) Chen S, Paucha E : J Virol 54 : 3350-3357, 1990.
- 13) Kierstead TD, Tevethia MJ : J Virol 67 : 1817-1829, 1993.