

マスター転写因子 Runx2 の活性が上昇する。Runx2 は OGT の基質である。よって、Runx2 の転写活性が O-GlcNAc 修飾により制御される可能性が示唆されている。これを確証づけるためにはより詳細な解析が必要であるが、骨芽細胞分化においては O-GlcNAc 修飾が正の制御作用を示すようである。

4. お わ り に

本稿では、細胞分化と O-GlcNAc 修飾について、間葉系細胞株の脂肪／筋／骨芽細胞分化についての解析例を紹介した。3 系統への分化について共通していることは、分化に伴い細胞当りの O-GlcNAc 修飾量が明確に変動することである。これは、分化にしたがってエネルギー代謝が変化することと、O-GlcNAc 修飾のドナーが UDP-GlcNAc であることを合わせて考えると十分に予測されることであるが、変動する方向が脂肪／骨分化と筋分化で異なる。脂肪／骨分化では O-GlcNAc 修飾量が増加するのに対し、筋分化では減少する。このことは、脂肪／骨分化と筋分化では必要とされる UDP-GlcNAc 量が異なっていることを示しており、分化に伴う UDP-GlcNAc 量の変動が O-GlcNAc 修飾量に反映されているのかもしれない。しかしながら、単に細胞内 UDP-GlcNAc 量を反映するばかりではなく、各々の分化に固有のタンパク質が O-GlcNAc 修飾により制御されている可能性を見出した。O-GlcNAc 修飾の生理機能は、Ser/Thr リン酸化と拮抗、または協調することにより、タンパク質の安定性や生理活性を制御することにあると我々は考えている^{12,13)}。今後の研究課題として、各々の細胞分化の鍵となるタンパク質が O-GlcNAc 修飾／リン酸化による厳密な制御下で本来の生理活性を発揮していることを検証したい。最近、O-GlcNAc 修飾はエピジェネティックコードとしても注目され始めたが^{14,15)}、ますます O-GlcNAc 修飾の重要度が認知され、その生理機能の本質が明らかになることを期待している。

- W., Chui, D., Hart, G.W., & Marth, J.D. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 5735–5739.
- 6) O'Donnell, N., Zachara, N.E., Hart, G.W., & Marth, J.D. (2004) *Mol. Cell. Biol.*, 24, 1680–1690.
- 7) Ishihara, K., Takahashi, I., Tsuchiya, Y., Hasegawa, M., & Kamemura, K. (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 398, 489–494.
- 8) Ogawa, M., Mizofuchi, H., Kobayashi, Y., Tsuzuki, G., Yamamoto, M., Wada, S., & Kamemura, K. (2012) *Biochim. Biophys. Acta*, 1820, 24–32.
- 9) Franke, W.W., Hergt, M., & Grund, C. (1987) *Cell*, 49, 131–141.
- 10) Ordóñez, J.L., Osuna, D., Herrero, D., de Álava, E., & Madoz-Gúrpide, J. (2009) *Cancer Res.*, 69, 7140–7150.
- 11) Kim, S.-H., Kim, Y.-H., Song, M., An, S.H., Byun, H.-Y., Heo, K., Lim, S., Oh, Y.-S., Ryu, S. H., & Suh, P.-G. (2007) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 362, 325–329.
- 12) Kamemura, K., Hayes, B.K., Comer, F.I., & Hart, G.W. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 19229–19235.
- 13) Kamemura, K. & Hart, G.W. (2003) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 73, 107–136.
- 14) Fujiki, R., Chikanishi, T., Hashiba, W., Ito, H., Takada, I., Roeder, R.G., Kitagawa, H., & Kato, S. (2009) *Nature*, 459, 455–459.
- 15) Slawson, C. & Hart, G.W. (2011) *Nat. Rev. Cancer*, 11, 678–684.

亀村 和生, 小川 光貴
(長浜バイオ大学バイオサイエンス学部)

O-GlcNAc glycosylation as a controller of differentiation
Kazuo Kamemura and Mitsutaka Ogawa (Department of Bioscience, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, 1266 Tamura, Nagahama, Shiga 526-0829, Japan)
投稿受付：2011 年 11 月 11 日

胃がん発がんにおけるがん抑制遺伝子 RUNX3 の働き

1. は じ め に

転写因子 RUNX3 (Runt related transcription factor 3) は、プロモーター領域のメチル化によるサイレンシングとタンパクの細胞質への偏在により、80% 以上のヒト胃がんにおいて、その不活性化が観察されるがん抑制遺伝子産物である^{1,2)}。RUNX3 は、TGFβ シグナル伝達系の下流で SMADs (Sma and Mad related proteins) と相互作用し、細胞増殖抑制因子 p21 とアポトーシス誘導因子 Bim の発現を亢進することが知られている^{3,4)}。さらに最近になって、

- 1) Hart, G.W., Slawson, C., Ramirez-Correa, G., & Lagerlof, O. (2011) *Annu. Rev. Biochem.*, 80, 825–858.
- 2) Matsuura, A., Ito, M., Sakaidani, Y., Kondo, T., Murakami, K., Furukawa, K., Nadano, D., Matsuda, T., & Okajima, T. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 35486–35495.
- 3) Ogawa, M., Adachi, T., Ikegami, S., Kato, K.H., Yamamoto, A., & Kamemura, K. (2011) *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75, 358–361.
- 4) Olszewski, N.E., West, C.M., Sassi, S.O., & Hartweck, L.M. (2010) *Biochim. Biophys. Acta*, 1800, 49–56.
- 5) Shafi, R., Iyer, S.P.N., Ellies, L.G., O'Donnell, N., Marek, K.

細胞接着因子のひとつ Claudin-1 の発現も、胃上皮細胞において RUNX3 によって正に制御されることを我々は報告した⁵⁾。このように RUNX3 は、がん化抑制の要である、細胞増殖抑制、アポトーシスの誘導、細胞接着の制御のそれぞれを、p21, Bim, Claudin-1 を介して実行するがん抑制遺伝子産物である。

一方で大腸がんの解析から、RUNX3 は Wnt によるがん化シグナルを負に調節していることが判明した。すなわち RUNX3 は、 β -catenin および TCFs (T cell factors) と直接結合し、その 2 量体の DNA 結合能を阻害することによって、Wnt のがん化シグナルを負に制御している⁶⁾。

このように、多くのヒトがんにおいて共通してみられる発がんの作用点、「がん抑制シグナル伝達系」である TGF- β / BMP シグナルと、「がん化シグナル伝達系」である Wnt シグナルとの接点で、RUNX3 ががん抑制遺伝子として機能していることが明らかになりつつある (図 1)。さらにこれらのメジャーなシグナル伝達系は、消化管上皮の幹細胞およびがん幹細胞の維持と出現に深く関与していることが示唆されているので、胃がんの発がんメカニズムの解明には、RUNX3 の「胃がん幹細胞」あるいは「胃がんのイニシエーティング細胞」におけるがん抑制遺伝子産物としての機能の解明こそが急務と思われる。

そこで我々は、*Runx3* 遺伝子欠損マウスと、それから

樹立された胃上皮細胞株を用いて、この課題に取り組んだ。

2. *Runx3* 欠損胃上皮における前がん病変

C57BL/6 マウスラインで作出した *Runx3* ホモ欠損 (*Runx3*^{-/-}) マウスは、生後すぐに死亡してしまうため、これまで成体マウスの胃における胃がん発がん過程を観察することができなかった。そこで BALB/c マウスラインで *Runx3*^{-/-} マウスを作出したところ、生存期間が 1 年にまで延び⁶⁾、その成体マウスの胃上皮のがん化過程を観察することが可能になった。正常胃上皮は、図 2A に示すような腺管構造を持つ。

Runx3^{-/-} マウスの胃を経時的に観察すると、主に胃上皮腺管下部の変化が顕著だった。6 ヶ月齢を越えた個体において、そこに SPEM (Spasmodic Polypeptide/TFF2-Expressing Metaplasia) と呼ばれる特徴的な前がん病変⁷⁾が出現していた (図 2B)⁸⁾。これは、ピロリ菌に感染した胃上皮や炎症を起こした胃上皮において特徴的に観察される病変である。しかしながら、*Runx3*^{-/-} マウスの寿命内に胃がんの発症が観察されなかったため、化学発がん剤である *N*-methyl-*N*-nitrosourea (MNU) を低濃度で投与した。野生型 (WT) のマウスにはがんが観察されなかったが、*Runx3*^{-/-} マウスでは SPEM を呈する腺底部の一部の細胞ががん化して、粘膜筋板を越えて粘膜下層に浸潤した (図

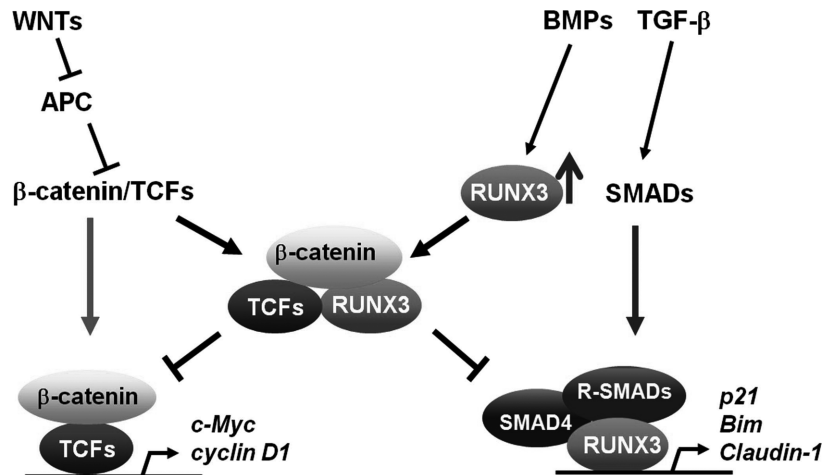


図 1 RUNX3 は β -catenin/TCFs と 3 量体形成を形成する。

「がん抑制シグナル伝達系」と呼ばれる TGF- β /BMP シグナル伝達系の下流で機能する転写因子 RUNX3 は、「がん化シグナル伝達系」である Wnt シグナルの下流で機能する転写因子複合体 β -catenin/TCFs と直接結合する。TCFs と RUNX3 の結合は DNA 結合ドメイン同士の相互作用で、これにより双方の DNA 結合能が減弱される。すなわち RUNX3 は、Wnt のがん化シグナルに対しては「ブレーキ」として作用する。この 3 量体の形成が二つのシグナル伝達系の「接点」となり、二つのシグナル伝達系は拮抗する。

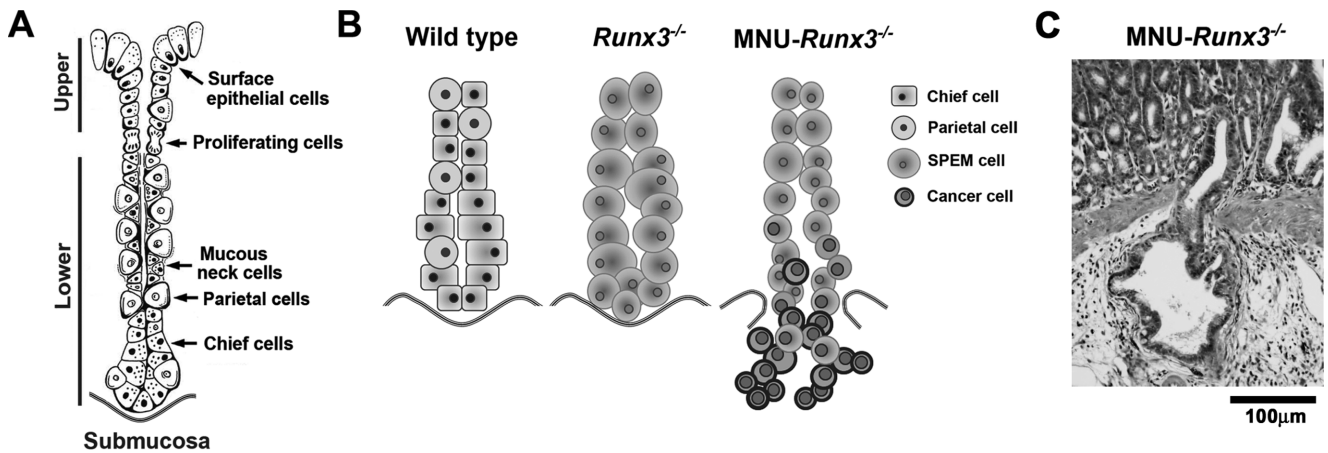


図2 $Runx3^{-/-}$ マウスの胃上皮腺管における発がん。

(A) 胃上皮の腺構造を示す。細胞増殖帯 (proliferating cell zone) を境に、上部 (upper) と下部 (lower) に分けることができる。上部には主に表層粘液細胞 (surface epithelial cell) が存在し、下部には壁細胞 (parietal cell) と主細胞 (chief cell) と、主細胞の前駆細胞とされる副細胞 (mucous neck cell) が存在する。RUNX3 の発現はほとんどすべての胃上皮細胞で観察されるが、壁細胞において弱く、主細胞において強い^{2,13)}。

(B) $Runx3^{-/-}$ マウスの胃上皮腺管の下部は、前がん病変とされる SPEM を呈する。化学発がん剤 MNU を投与すると、SPEM の底部から胃がん細胞が出現し、粘膜下層 (submucosa) に浸潤した。

(C) MNU 投与 $Runx3^{-/-}$ マウスの胃で観察された胃がん発がん。SPEM を呈した $Runx3^{-/-}$ 胃上皮腺管の一部ががん化して、粘膜下層へ浸潤した。この胃がんは進展して、さらに粘膜下層から筋層へと浸潤した。

2B, C)⁸⁾。さらにその浸潤性の胃がんから、分化型腺がんおよび低分化型がんの代表例である印環細胞がんが出現し、ヒト胃がんの発がん過程とその多様性を、マウスの胃において忠実に再現することができた。

これらの観察から、 $Runx3$ 遺伝子欠損マウスが貴重な胃がんマウスモデルであることが判明した。

3. $Runx3$ 欠損胃上皮における Wnt シグナルの亢進と腸型化、そしてがん化

$Runx3^{-/-}$ 胃上皮の前がん病変、およびそこから出現した胃がん細胞を解析した結果、以下のような事実が判明した⁸⁾。

1. $Runx3^{-/-}$ 胃上皮腺底部の細胞では、本来胃上皮には発現のない腸上皮細胞の分化におけるマスターレギュレーターのひとつ Cdx2 (Caudal related homeobox 2) の発現が観察される。それによって腸上皮マーカーのひとつ Muc2 (Mucin 2) が発現し、腸型表現型が観察される (図3)。

2. MNU 投与 $Runx3$ 遺伝子欠損マウス (MNU- $Runx3^{-/-}$) に発達した浸潤性の胃がん細胞も、Cdx2-Muc2 陽性の腸型表現型を示す (図3)。

3. $Runx3^{-/-}$ 胃上皮腺底部の細胞および MNU 投与 $Runx3$ 遺伝子欠損マウス (MNU- $Runx3^{-/-}$) の浸潤性の胃がん細胞は、c-Myc や CD44 を発現し、Wnt のがん化シグ

ナルが亢進している。

これらの分子機構をさらに詳細に解析するため、 $Runx3$ 遺伝子欠損マウスの胃上皮から樹立した胃上皮細胞¹⁾を用いて検討した結果、以下の事実が判明した⁸⁾。

1. Cdx2 のプロモーターには Tcfs 結合部位が存在し、Wnt の活性化により β -catenin/Tcfs 依存的に Cdx2 の発現が誘導される。

2. $Runx3$ は、 β -catenin/Tcfs の DNA 結合能を阻害することによって、間接的に Cdx2 の発現を抑制する。

3. $Runx3^{-/-}$ 胃上皮細胞は、ヌードマウス皮下において造腫瘍性を有するが、その造腫瘍性は、異所的に発現亢進した Cdx2 には依存しない。

4. $Runx3^{-/-}$ 胃上皮細胞の造腫瘍性は、Wnt のがん化シグナルに依存する。

これらの解析結果を総合すると、 $Runx3$ の不活性化による前がん病変の出現とそこからの胃がん発がん過程には、 $Runx3$ の不活性化によって惹起される Wnt のがん化シグナルが関与しており、その過程で Cdx2 の発現が誘導され、胃上皮細胞に腸型化がもたらされるものと結論づけられた (図3)⁸⁾。

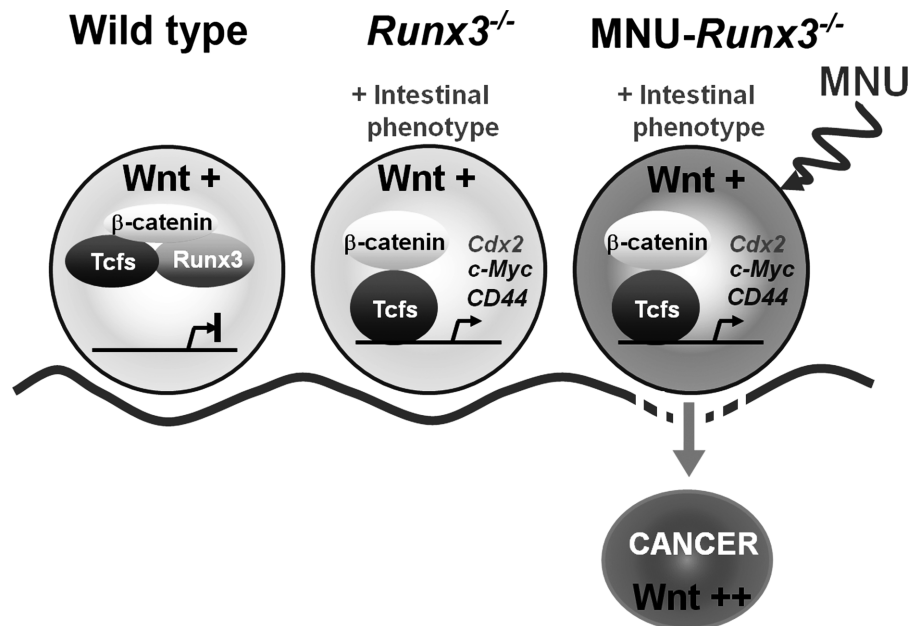


図3 *Runx3*^{-/-}マウスの胃がん発がんにおける Wnt がん化シグナルの活性化。

Runx3 は胃上皮細胞において、β-catenin/Tcfs と相互作用しその DNA 結合を阻害している (図1 参照)。しかし *Runx3* が不活性化されると、β-catenin/Tcfs によって、がん化をもたらすターゲット因子 (c-Myc や CD44 など) とともに *Cdx2* の発現が亢進し、腸型表現型 (intestinal phenotype) が誘導される。さらに発がん剤やそれに伴う炎症が加わり、Wnt のがん化シグナルが活性化されると、浸潤性の胃がん細胞へ悪性化する。

4. RUNX3 の点変異体 RUNX3 (R122C) の意義

ヒト胃癌検体から RUNX3 の点変異；RUNX3 (R122C)¹⁾ も同定されていたが、これまでその意義は明確ではなかった。上述のように胃上皮細胞においても、RUNX3 は Wnt のがん化シグナルを抑制することが示されたわけだが、興味深いことに、この RUNX3 の点変異体 RUNX3 (R122C) が、β-catenin/TCFs と相互作用できず、Wnt のがん化シグナルを抑制することのできない変異体であることが判明した⁸⁾。この点変異体の存在は、この系における RUNX3 のがん抑制遺伝子としての機能の重要性を明確に物語っている。

5. おわりに

最近になって TFF2 (Trefoil factor 2) 発現細胞が、胃上皮腺の下部を構成する細胞群 (図 2A) の前駆細胞もしくは幹細胞を含むことが示され⁹⁾、さらに RUNX3 がピロリ菌感染によって不活性化される¹⁰⁾ことを考えると、1) ピロリ菌感染による RUNX3 の不活性化、2) TFF2 発現細胞の異常増加と化生 (前がん病変；SPEM の出現)、3) Wnt

のがん化シグナルの活性化による浸潤性胃がんの発症、という胃がん発がんにおけるひとつのシナリオが浮かび上がる。

現状ではいまだに、明確な胃上皮細胞の幹細胞の同定や、胃がん幹細胞あるいはイニシエーティング細胞の明確なマーカーの特定には至っていない。しかし、これまでに挙げられている幹細胞およびがん幹細胞マーカーの候補のほとんどが、Wnt のターゲットになっていることを考えても、RUNX3 のがん抑制遺伝子としての機能が胃がん幹細胞あるいはイニシエーティング細胞の出現と維持に果たす役割は大きいと考える。

また RUNX3 は、上皮細胞そのもののがん化制御のみにとどまらず、リンパ球にも発現している¹¹⁾、がん関連の炎症反応に深く関与することが示唆されている¹²⁾。RUNX3 の機能を基軸にして、がん微小環境の解析がよりいっそう進展することを期待している。

謝辞：本稿で紹介した内容は、シンガポールおよび日本の多くの方々との共同研究の成果であり、ここにあらためまして深謝申し上げます。

- 1) Li, Q.L., Ito, K., Sakakura, C., Fukamachi, H., Inoue, K., Chi, X.Z., Lee, K.Y., Nomura, S., Lee, C.W., Han, S.B., Kim, H. M., Kim, W.J., Yamamoto, H., Yamashita, N., Yano, T., Ikeda, T., Itohara, S., Inazawa, J., Abe, T., Hagiwara, A., Yamagishi, H., Ooe, A., Kaneda, A., Sugimura, T., Ushijima, T., Bae, S. C., & Ito, Y. (2002) *Cell*, 109, 113-124.
- 2) Ito, K., Liu, Q., Salto-Tellez, M., Yano, T., Tada, K., Ida, H., Huang, C., Shah, N., Inoue, M., Rajnakova, A., Hiong, K.C., Peh, B.K., Han, H.C., Ito, T., The, M., Yeoh, K.G., & Ito, Y. (2005) *Cancer Res.*, 65, 7743-7750.
- 3) Chi, X.Z., Yang, J.O., Lee, K.Y., Ito, K., Sakakura, C., Li, Q. L., Kim, H.R., Cha, E.J., Lee, Y.H., Kaneda, A., Ushijima, T., Kim, W.J., Ito, Y., & Bae, S.C. (2005) *Mol. Cell. Biol.*, 25, 8097-8107.
- 4) Yano, T., Ito, K., Fukamachi, H., Chi, X.Z., Wee, H.J., Inoue, K., Ida, H., Bouillet, P., Strasser, A., Bae, S.C., & Ito, Y. (2006) *Mol. Cell. Biol.*, 26, 4474-4488.
- 5) Chang, T.L., Ito, K., Ko, T.K., Liu, Q., Salto-Tellez, M., Yeoh, K.G., Fukamachi, H., & Ito, Y. (2010) *Gastroenterology*, 138, 255-265.
- 6) Ito, K., Lim, A.C., Salto-Tellez, M., Motoda, L., Osato, M., Chuang, L.S., Lee, C.W., Voon, D.C., Koo, J.K., Wang, H., Fukamachi, H., & Ito, Y. (2008) *Cancer Cell*, 14, 226-237.
- 7) Weis, V.G. & Goldenring, J.R. (2009) *Gastric Cancer*, 12, 189-197.
- 8) Ito, K., Chuang, L.S., Ito, T., Chang, T.L., Fukamachi, H., Salto-Tellez, M., & Ito, Y. (2011) *Gastroenterology*, 140, 1536-1546.
- 9) Quante, M., Marrache, F., Goldenring, J.R., & Wang, T.C. (2010) *Gastroenterology*, 139, 2018-2027.
- 10) Tsang, Y.H., Lamb, A., Romero-Gallo, J., Huang, B., Ito, K., Peek, R.M. Jr., Ito, Y., & Chen, L.F. (2010) *Oncogene*, 29, 5643-5650.
- 11) Taniuchi, I., Osato, M., Egawa, T., Sunshine, M.J., Bae, S.C., Komori, T., Ito, Y., & Littman, D.R. (2002) *Cell*, 111, 621-633.
- 12) Sugai, M., Aoki, K., Osato, M., Nambu, Y., Ito, K., Taketo, M. M., & Shimizu, A. (2011) *J. Immunol.*, 186, 6515-6520.
- 13) Ito, K., Inoue, K.I., Bae, S.C., & Ito, Y. (2009) *Oncogene*, 28, 1379-1384.

伊藤 公成

(長崎大学大学院医歯薬学総合研究科)

Tumor suppressive functions of RUNX3 in gastric carcinogenesis

Kosei Ito (Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki 852-8588, Japan)

タンパク質のスワッピングを伴う新規翻訳後修飾メカニズム

1. はじめに

ニトリル分解酵素の一つであるニトリルヒドラターゼ (以下, NHase と記載)¹⁾は現在, アクリルアミドやニコチンアミドのバイオコンバージョンによる工業生産に使用されている. NHase は α と β の2種類のサブユニットからなる酵素であり, 活性中心に Fe イオンを持つ Fe 型 NHase と Co イオンを持つ Co 型 NHase の二つに大別できる²⁾. アミド生産上有用な酵素であるため様々な微生物において解析され, いくつかの NHase の立体構造が既に決定されている^{3,4)}. どちらの金属イオンも酵素の α サブユニットに存在し, 金属イオンに配位する (α サブユニット中の) 三つのシステイン残基のうち, 二つはシステインスルフィン酸・システインスルフェン酸として存在することが判明している^{3,4)}. 即ち, 本酵素は金属イオンの配位とシステイン残基の酸化という翻訳後修飾を受けて活性型になる.

アジポニトリルを基質とする 5-シアノバレルアミドの工業生産に使用されている *Pseudomonas chlororaphis* B23 菌の酵素⁵⁾は Fe 型 NHase であるのに対し, (アクリロニトリルを基質とする) アクリルアミドの工業生産や (3-シアノピリジンを経由する) ニコチンアミドの工業生産に使用される *Rhodococcus rhodochrous* J1 菌 (以下, J1 菌と記載) の酵素は Co 型 NHase である (図 1)⁶⁾. Fe 型, Co 型いずれの酵素もどのような機構により翻訳後修飾が導入されるのかは不明であった. J1 菌は高分子量型 (H-) と低

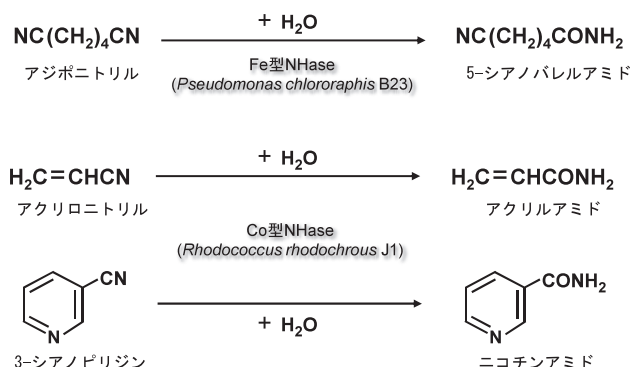


図 1 有用化合物の工業生産に利用されるニトリルヒドラターゼ (NHase)