

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)
研究期間：2008～2009
課題番号：20790505
研究課題名(和文) ニトロソ化及びリン酸化RKIPによる胃癌細胞増殖シグナルの制御に関する研究
研究課題名(英文) Effect of nitrosylated- and phosphorylated-RKIP on cell-proliferation signal in gastric cancer cells
研究代表者
大竹 一男 (OHTAKE KAZUO)
城西大学 薬学部 助教
研究者番号：50337482

研究成果の概要 (和文)：今回の研究目的は、胃癌細胞における細胞増殖シグナルに及ぼすニトロソ化及びリン酸化RKIP (Raf kinase inhibitor protein) の影響を評価することである。RKIPのニトロソ化は、RKIPのリン酸化を抑制したが、ニトロソ化したRKIPは、胃癌細胞における増殖シグナルを増加させた。

研究成果の概要 (英文)：The purpose of the current study is to evaluate the effect of nitrosylated- and phosphorylated-RKIP (Raf kinase inhibitor protein) on cell-proliferation signal in human gastric cancer (AGS) cells. RKIP-nitrosylation was significant reduction in the phosphorylation level of RKIP in AGS cells. On the other hand, cell proliferation signal was up-regulated by an expressive increase in nitrosylation level of RKIP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
平成 21 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：癌 整理活性 蛋白質 シグナル伝達 一酸化窒素 ニトロソ化 細胞増殖 翻訳後修飾

1. 研究開始当初の背景

胃の NO は、L-アルギニンを基質とする NO 合成酵素 (NOS) から産生されるだけでなく、食餌、特に野菜由来の硝酸塩や亜硝酸塩からも酵素的、化学的に産生される [1]。これまでに胃における NO は、血流維持、抗酸化作用や感染防御等の粘膜保護作用を有し、胃の恒常性の維持に極めて重要な役割を果たすことが知られている。我々は、このような多彩な NO の生理作用を紐解く目的で、NO または NO 関連分子が仲介する普遍的、特異的、可逆的な翻訳後修飾の一つの形態として機能するタンパク質の S-ニトロソ化 [2,3] に着目し、胃粘膜上皮細胞の S-ニトロソ化タンパク質を網羅的に解析した (平成 15-16 年度 若手研究 B; 16790391)。その結果、胃粘膜上皮細胞内には、60 以上の S-ニトロソ化タンパク質が検出された。そのうち 32 個の S-ニトロソ化タンパク質を同定し、それらは分子シャペロン、代謝酵素、細胞外マトリックス、細胞骨格、情報伝達系タンパク質、分化増殖に関連したタンパク質に分類された。これら 32 個のタンパク質のうち、8 個のタンパク質が新規 S-ニトロソ化タンパク質であることがわかった (論文投稿準備中)。

興味深いことに、新規同定された S-ニトロソ化タンパク質の中に、癌の増殖を抑制する Raf kinase inhibitor protein (RKIP) が含まれていた。RKIP は、Raf と結合することで癌細胞増殖シグナルの一つである Raf/MEK/ERK のリン酸化による活性化を抑制しているが、ホルボールエステルのよ

うな発癌プロモーターによって PKC が活性化されると、RKIP のセリン残基がリン酸化され、Raf を解離し、解離した Raf が MEK をリン酸化し、MEK が ERK1/2 をリン酸化する一連のシグナル伝達が起こり、最終的に細胞増殖シグナルが引き起こされる [4-6]。

RKIP は、その構造中に 2 つのシステイン残基 (Cys¹³², Cys¹⁶⁷) を有し、酸化ストレス時に、ジスルフィド結合を形成する可能性が報告されているものの [7]、より詳細な解析はこれまで行われていない。我々は、上述した AGS 細胞での予備的検討に加え、三次元構造解析データベース (Swiss-PdbViewer) から、RKIP のどちらのシステイン残基もリン酸化を受けるセリン残基 (Ser¹⁵³) 近傍に位置していることを確認している。

2. 研究の目的

生体内における一酸化窒素 (NO) 仲介性のタンパク質システイン残基の S-ニトロソ化は、タンパク質リン酸化同様、普遍的、特異的、可逆的な翻訳後修飾の一形態として機能していることが明らかにされつつある。これまでに我々は、生体内で高濃度の NO を産生する胃粘膜上皮細胞の S-ニトロソ化タンパク質をプロテオミクスアプローチにて解析し、8 つの新規 S-ニトロソ化タンパク質を発見した。その中の一つに、癌の増殖を抑制するタンパク質である、Raf kinase inhibitor protein (RKIP) が含まれていた。RKIP は、主要な癌細胞増殖シグナル

である Raf/MEK/ERK 経路を抑制している一方で、発癌プロモーターであるホルボールエステル刺激によって、PKC が活性化されると RKIP のセリン残基がリン酸化され、このシグナルカスケードの抑制が遮断され、下流の ERK1/2 のリン酸化が起こり癌細胞増殖シグナルが開始される。

我々は、RKIP と ERK の発現しているヒト胃癌細胞株 (AGS 細胞)を用いて、血清飢餓状態の細胞に S-ニトロソグルタチオン (GSNO) を前処理し、AGS 細胞のタンパク質を S-ニトロソ化し、その後ホルボールエステル刺激を行ったところ、ERK1/2 のリン酸化の増加が顕著に抑制されたことを見いだした。これらの結果から、RKIP による Raf/MEK/ERK シグナルが、翻訳後修飾による S-ニトロソ化 RKIP とリン酸化 RKIP のインタープレイによって制御されている可能性が示唆された。

そこで本研究では、癌細胞増殖の中心的役割を果たしている Raf/MEK/ERK シグナル伝達経路における S-ニトロソ化 RKIP の本質的な役割を詳細に検討した。

3. 研究の方法

AGS 細胞を使用して、ホルボールエステルである PMA 及び GSNO 存在、非存在下で RKIP のリン酸化とニトロソ化の検出を Western blot 法にて行う。RKIP と Raf の結合能、MEK 及び ERK のリン酸化レベルの解析を免疫沈降法と免疫染色法にて行った。

4. 研究成果

以下の知見が得られた。(1) RKIP のニトロソ化は、RKIP のリン酸化を妨げた。(2) RKIP のニトロソ化は、MEK へのニトロソ

基転反応を介して、Raf/MEK/ERK カスケードの活性化を増強した。(3) ニトロソ化した RKIP は、MEK のリン酸化反応には直接影響せず、MEK と結合することによって、ニトロソ化 MEK となり、これが ERK リン酸化を引き起こすことを示した。以上の結果より、ニトロソ化 RKIP は、細胞内で RKIP のリン酸化反応を干渉する一方で、リン酸化 RKIP とは全く異なる機構で、Raf/MEK/ERK シグナルの活性化を導き、この機構が、MEK のニトロソ化によって起こることを国内外で初めて明らかにした。本研究成果は、今後の癌（特に胃癌）治療薬の新規標的となる有用なエビデンスを提供することができたと思われる。

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 2 件)

- ① Ohtake K, Shimada N, Uchida N, Kobayashi, Proteomic approach for identification of protein S-nitrosation in mouse gastric mucosa treated with S-nitrosoglutathione, J. Proteomics, 査読有, (2009) 72:750-760.
- ② Ohtake K, Shimada N, Uchida N, Kobayashi, Proteomic approach for identification of protein S-nitrosation in mouse gastric mucosa, Nitric Oxide, 査読有, (2009) 20:S36.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 大竹一男 他 3 名、S-ニトロソ化 RKIP は RKIP リン酸化を阻害し、ERK リン酸化を

活性化する、第9回日本NO学会学術集会、
2009年5月8日、静岡 グランシップ
② K Ohtake 他3名、Proteomic approach
for identification of protein
S-nitrosation in mouse gastric mucosa、
THIRD INTERNATIONAL MEETING ON THE
ROLE OF NITRITE IN PHYSIOLOGY,
PATHOPHYSIOLOGY, AND THERAPERUTICS、
2009年6月17日、スウェーデン スト
ックホルム カロリンスカ研究所

[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:

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

大竹 一男 (OHTAKE KAZUO)

城西大学 薬学部・助教

研究者番号: 50337482

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: