

腫瘍悪性化関連因子 ARK5 遺伝子の 腫瘍細胞における発現調節機構

東京大学大学院新領域創成科学研究科

先端生命科学専攻修士課程

学籍番号 36524

下条 洋輔

目次

第I章	序論	1
第II章	材料・方法	5
第III章	結果	13
第IV章	考察	18
第V章	要約	23
謝辞		24
図表・解説		25
参考文献		41

I: 序論

一般的に、腫瘍の増殖や生存は血管から供給される酸素及びグルコースを主体とした栄養素に依存している [1] [2] [3]。故に腫瘍の血管新生は、過剰な増殖を支えるための酸素及び栄養を獲得するための必然的な反応であり、腫瘍悪性化の主要因として考えられてきた [4] [5]。しかしながら、膵癌をはじめとする多くの腫瘍組織では過度の細胞増殖・エネルギー要求にも関わらず、実際には十分な機能的な新生血管が認められず、また血管構造構築が不完全であることから常に低酸素・低栄養状態に曝されていると考えられている [6]。低酸素状態に置かれた細胞におけるエネルギー代謝に関してはこれまで解糖系の亢進により説明されてきたが [7]、腫瘍組織のような慢性的血流不足による低酸素状態では、酸素のみならず栄養素の供給が不十分であり、嫌氣的解糖の基質であるブドウ糖の供給も決定的に不足し、これまでの考えでは説明のつかない機構により腫瘍の悪性化がもたらされている可能性がある。低酸素状態だけでなく栄養素(グルコース)飢餓状態が腫瘍の悪性化において重要な要因を握っている可能性があり、近年、血管新生の盛んな肝癌由来細胞株では、低栄養素(低グルコース)下で急激な細胞死が誘導されるのに対し、血管新生が不十分な膵癌由来細胞株が低グルコースに強い耐性を示すことが明らかにされた [8] [9]。こうしたことから従来の考え方とは異なり、膵癌のような血流が不十分である腫瘍では栄養飢餓耐性能が腫瘍悪性化の重要な要因である可能性が指摘されている。

膵癌の栄養飢餓耐性能は AMPK (AMP-activated protein kinase)と Akt の少なくとも2つの因子により誘導されることが現在明らかにされている [6] [10] [8] [9]。

AMPK は運動生理や糖尿病研究領域において盛んに研究されてきたが、細胞のエネルギー欠乏に反応してコレステロールや脂肪酸の合成を抑制し、異化反応を促進するリン酸化酵素として同定されたものである [11] [12]。AMPK は触媒ドメインを有する

サブユニットおよび調節サブユニットである、 から成るヘテロ三量体のリン酸化酵素であり、現在までに各サブユニットに複数のアイソフォームが報告されている (Fig.1A)。栄養飢餓や低酸素、更に熱ショックや虚血等代謝ストレスによる細胞内 AMP の濃度上昇、加えて上流に位置するリン酸化酵素(AMPKK)によりリン酸化されることで完全な活性を示すことが明らかとなっている [13] [12] [14](Fig.1B)。AMPK の標的としてはコレステロール合成に関わる HMG-CoA reductase, また、脂肪酸合成に関与する Acetyl-CoA carboxylase が有名であり、その他グルコース輸送体 GLUT-2 の転写に関わる HNF4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α)等転写因子 [15] [16]や、タンパク合成に関わる mTOR (mammalian target of rapamycin)やそれを間接的に制御する TSC1/2 (tuberous sclerosis complex)複合体等、多岐にわたることが明らかとなっている [17] [18](Fig.1B)。

一方 Akt は、細胞内シグナル伝達系において細胞の生存シグナルの制御を中心的につかさどるリン酸化酵素であり、細胞遊走の誘導等、腫瘍悪性化に関わる因子として広く研究されてきた [19] [20]。その活性は一般的に細胞膜上にあるレセプター型チロシンキナーゼから PI3K, PDK-1 を経るシグナルにより制御されていることが知られている (Fig.1C)。活性化された Akt は、Badをはじめとする Bcl-2 family member、また Caspase や Caspase inhibitor、更に Fas ligand の発現制御を行う転写因子 Forkhead family 等アポトーシスに関わるタンパク質を標的とし、それらの機能を制御することで細胞を死から守る Survival mediator である。

Kato ら(2002)は膵癌細胞株を用いた解析により、AMPK サブユニットの発現レベルがグルコース飢餓耐性能と相関し、またこの分子の antisense を導入した膵癌細胞株 PANC-1 及び AsPC-1 が対照細胞に比べグルコース欠乏下で顕著に細胞死を示すことを見出した。同様に細胞生存因子である Akt の発現レベルに関してもグルコース飢餓耐性の強い細胞株では強発現が見られ、Akt antisense を導入した PANC-1 細胞では耐性

の軽減が認められた。このように2つの因子が膵癌の栄養飢餓耐性能の誘導に関わっていることは明らかとなったが、いまだ個々の活性制御や相互作用に関しては不明な点が多い。

こうした中、複数の AMPK 関連因子 (AMPK-related kinase)の一つとして ARK5 (AMPK-related kinase number 5)が単離・同定された(Fig.1D)。分子特性および生物反応への関わりからの解析からこのリン酸化酵素の活性が AMPK family の中で唯一 Akt により直接制御されており、Akt 依存的な栄養飢餓耐性能の誘導、更に栄養飢餓状態への適応反応が腫瘍の浸潤・転移能亢進に關与することを示す重要な因子であることが明らかとなった [21]。肝癌細胞株 HepG2 を用いた *in vitro* の解析では、ARK5 の強制発現により低グルコース下での細胞死の抑制が認められ、ATM 及び p53 の活性化を伴う Cell cycle arrest がグルコース飢餓耐性により引き起こされた可能性が示されている [22]。また、HepG2 を用いた別の実験では Akt により活性化された ARK5 が低グルコース下で Caspase-8 inhibitor である FLIP の分解遅延を通して Caspase 8 の活性化を阻害し、細胞死の抑制に貢献していることが明らかとなり [23] [24]、ARK5 が Akt の制御下で著明にグルコース飢餓耐性の誘導に關与していることが示された。更に重要なことに、Akt による ARK5 の活性が腫瘍細胞株の浸潤活性に相関し、MMP (matrix metalloproteinase)の産生亢進を誘導していることがマトリゲルを用いた解析により明らかにされている [21] [25]。またヌードマウスを用いた *in vivo* の解析では、ARK5 を強制発現させた膵癌細胞株 PANC-1 を移植したマウスが対照動物に比べ、腫瘍径増大及び転移の増強を示し、*in vitro* における実験結果を支持していた。こうした結果はグルコース欠乏が実際に起こっており、腫瘍にとって ARK5 の活性が生き延びる上で極めて重要である可能性を示唆するもので、したがって ARK5 の詳細な機能解析が今後の腫瘍悪性化の新たな理解に繋がると期待される。

一方 ARK5 の mRNA レベルの発現については大腸癌、膵癌をはじめ多くの腫瘍組織

由来の細胞株でも強発現が認められており、実際の癌組織、例えば大腸癌では ARK5 の腫瘍特異的な発現だけでなく悪性度の上昇に伴う発現増強も見られた [26]。この結果は ARK5 が臨床上腫瘍の発生・進展においても重要な役割を担っていると支持するものである。しかしながら、ARK5 の生理機能解析の進展に比べ、腫瘍特異的な発現制御機構の詳細は多くが不明である。ARK5 を標的とする新たな癌治療薬の開発が期待され、現在酵素活性阻害剤のスクリーニングが進行している。他方、ARK5 の癌組織での発現抑制という癌治療の可能性もある。今後このような治療法の実現に向け、どのようなシグナルおよび転写因子により腫瘍特異的な転写調節が制御されているのか、詳細な解析が必要不可欠である。

そこで本研究では腫瘍特異的な ARK5 の発現制御機構を明らかにするため、恒常的な mRNA の強発現がみられた膀胱癌細胞株を用い、プロモーター解析を中心に ARK5 の発現制御機構の解析を試みた。また、低グルコース下で ARK5 の発現誘導を示す肝癌細胞株 HepG2 での解析から得られた結果を踏まえ、腫瘍細胞株における ARK5 遺伝子の 2 つの発現制御機構の可能性について論説する。

II: 材料と方法

1 . 培養細胞と試薬

本研究では、膵癌細胞株 6 種 PANC-1, MIA PaCa-2, AsPC-1, BxPC-3, PSN1, KP-3 及び肝癌細胞株 5 種 HepG2, Hep3B, Alexander, HuH-7, SK-Hep-1、更に大腸癌細胞株 1 種 SW480 の計 12 細胞株を用いた。PANC-1, MIA PaCa-2, AsPC-1, BxPC-3, HepG2, Hep3B, SK-Hep1, SW480 は ATCC (American Type Culture Collection)から購入し、KP-3, Alexander, HuH-7 は JCRB (Japanese Collection of Research Bioresources)から購入した。PSN1 は国立がんセンター研究所で樹立されたもの [27]を用いた。actinomycin D は(Sigma, St. Louis, MO, USA)から購入した。100%エタノールに 50 μ g/ml の濃度でストック溶液を作成し、0.5 μ g/ml の最終濃度で使用した。

2 . 通常培地

各細胞は 1 \times MEM non-essential amino acid solution (Sigma), 1 \times Antibiotic antimycotic solution (Sigma), 4mmol L-glutamine (Sigma), 1.5g/L sodium bicarbonate, 10% Fetal bovine serum (Cell Culture Technologies, Cansera international Ink., Canada)を Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Nissui, Tokyo)に加え調整した培地で培養し、培養条件は 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂とした。

3 . 低グルコース培地

各細胞をグルコース飢餓処理する際は、1 \times MEM non-essential amino acid solution, 1 \times Antibiotic antimycotic solution, 4mmol L-glutamine, 1.5g/L sodium bicarbonate, 25mmol/L HEPES-NaOH (pH7.3), 10% Fetal bovine serum を DMEM-base (Sigma)に加え調整した培地で培養し、血清はセルロース膜により

PBS で 48 時間透析した後、試験紙(ライフスティック;マイルス・三共株式会社)によりブドウ糖の除去を確認した後使用した。培養条件に関しては 37 °C、5% CO₂ とした。

4 . Survival Assay

膀胱癌細胞株 6 種、及び肝癌細胞株 5 種全てにおいて通常培地で 3×10^5 個の細胞を 6-well プレートに撒いた。24 時間後、個々の細胞は 2ml の低グルコース培地で一度洗い、5ml の低グルコース培地で培養した。各々のインキュベーション時間において、Hoechst33342 (Molecular Probes, Oregon, USA)/PI により染色した後、顕微鏡下で 3 ヶ所において写真を取り、死細胞の割合を算出して 100 から差し引いた値を生細胞の割合とし、グラフにプロットした。

5 . RT-PCR

各細胞からの Total RNA の調整は guanidinium thiocyanate 抽出法[28]を用いた。更に mRNA の精製が必要な場合は Oligotex-dT30 Super (Takara Bio Co., Ltd.)を用い、その際方法は添付書類に従った。human-brain の polyA⁺ RNA に関しては BD Biosciences Clontech から購入したものを使用した。1st cDNA の合成には AMV transcriptase (Takara)を用い、0.5µg の Total RNA または同量の polyA⁺ mRNA を含む 20µl の反応液で逆転写反応を行った。ARK5 の 5'末端領域での ARK5 mRNA の検出では、polyA⁺ RNA サンプルと Random 9mer を用いた。30 10 分インキュベートした後、42 30 分、99 5 分、5 5 分の反応を 1 サイクルで行うことで逆転写反応を行った。通常の ARK5 mRNA の検出では Total RNA サンプルと Oligo dT primer を用いた反応を行い、反応条件は 42 30 分、99 5 分、5 5 分を 1 サイクル行った。逆転写反応後、滅菌蒸留水 20µl 加え、これを cDNA

サンプルとした。全ての PCR 反応は LA PCR Kit (Takara)を用いて行った。腫瘍における ARK5 mRNA の転写開始点が決定されていないことから ATG コドンの A を+1 とし、5'末端の確認実験では, ARK5(-1503)F/ARK(-1047)R, ARK(-1353)F/ARK (-983)R, ARK(-1004)F/ARK(-593)R, ARK(-865)F/ARK(-593)R, ARK(-811)F/ARK (-593)R, 並びにコード領域内(CDS)の ARK5(+642)F/ARK(+899)R の 6 つのプライマーセットを設計して用いた。通常の ARK5 mRNA の検出は ARK5F/ARK5R プライマーのセットを用い、3'非翻訳領域内(+ 4868~+5018)を増幅することで、発現確認を行った。内部標準として Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)の発現を GAPDHF/GAPDHR プライマーのセットで確認した。プライマーセットの配列及び反応条件は別表にまとめる(Table.1)。

6 . Quantitative PCR

定量性 PCR では、LightCycler™ (Roche Diagnostics Co, Mannheim, Germany) 及び LightCycler™ FastStart DNA MASTER SYBR Green I (Roche)を用いた。PCR で必要とするサンプル DNA、プライマーセットは RT-PCR で使用したものと同様のものとした。反応条件は ARK5 では 95 10 秒、58 10 秒、72 20 秒、GAPDH では 95 10 秒 60 10 秒、72 20 秒を各 40 サイクルで行った。ARK5 mRNA の相対コピー数の算出は、ARK5 cDNA のフラグメントを増幅して検量線を作成し、各々のインキュベーション時間でのコピー数を GAPDH mRNA のコピー数により補正することで得た。

7 . Primer Extension

i) プライマー及びマーカのエンドラベル

プライマーは、ARK5 コード領域(CDS)の ATG から 697 base 上流から逆転写反応

を行うもの(5'TCGCTCGGCCTGGATTCCTGCT3')を使用した。マーカーは 100bp ladder (New England Bio Labs Inc., Massachusetts, USA)を用い、プライマー、マーカーそれぞれの 5'末端を[γ -³²P]ATP を用いて標識した。

ii) 逆転写反応/電気泳動

PANC-1, HepG2, SW480 の Total RNA 10 μ g ならびに human-brain total RNA (BD Biosciences Clontech)、yeast total RNA (Ambion, Inc, USA)をそれぞれ 10 μ g 用いた。Total RNA サンプルを 65 °C で 15 分インキュベートし、標識されたプライマーとのアニーリングを行った後、AMV transcriptase を用いて、42 °C , 1 時間逆転写反応を行った。その後、反応停止溶液 (95% formamide, 20mM EDTA, 0.05% bromophenol blue, 0.05% xylene cyanol FF) を加えて反応を止め、マーカーを 100 °C 、 5 分熱変性させた後、サンプルと一緒にアクリルアミドゲル(8% acrylamide/bis-acrylamide , 1 \times TBE, 7M urea)にアプライして分離を行った。2100V 一定電流、2.5 時間泳動させた後、ゲルをはがして 30 分ゲルを乾燥させた。Fuji imaging plate (Fuji Photo Film Co., LTD.) に 24 時間露光させた後、オートラジオグラフィーを行った。

iii)ダイデオキシ法によるシーケンス

ダイデオキシ法によるシーケンスは Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit (USB, Cleveland, Ohio, USA)を使用し行った。まず、pGL-D2 (Fig.2A) 5 μ g をアルカリ処理により一本鎖にし、1 \times Sequenase Reaction Buffer (40mM Tris-HCl pH7.5, 20mM MgCl₂, 50mM NaCl)、及びプライマー伸長法で用いたプライマー-0.5 μ mol を含む 10 μ l の溶液に溶かした。その後 80 °C で 5 分熱し、室温まで冷ましてハイブリダイゼーションを行った。1/5 希釈した Labeling mix (1.5 μ M dGTP, 1.5 μ M dCTP, 1.5 μ M dTTP), 0.1M DTT, [α -³²P]dATP, 及び Sequenase polymerase の混合溶液 total 5.5 μ l を上述の DNA 溶液に加え、室温で 3 分放置した。その後 ddATP,

ddCTP, ddGTP, ddTTP が 1.5 μ l 入ったチューブに 3.5 μ l ずつ分注し、停止反応を 75 $^{\circ}$ C, 5 分行った。反応停止液を加え、80 $^{\circ}$ C で 5 分変性させた後、アクリルアミドゲルでの分離を行った。

8 . DNA Construct の作製

i) pGL-Full~pGL-D9 の作製

レポーターアッセイを行うにあたりまず、ARK5 の 5' flanking region の配列を NCBI のデータベースから得た。次に PANC-1 細胞のゲノム DNA を鋳型に ARKproF, ARKproR (Table.1)の 2 つのプライマーを用いて PCR を行い、本研究で推測された転写開始点の 788base 下流から 3497base 上流までの約 4.3kb のフラグメントを増幅した。増幅されたフラグメントを *NheI-XhoI* で制限酵素処理し、ルシフェラーゼ発現ベクター pGL2-Basic (Promega)へ組み込んだものを pGL-Full (Full length)コンストラクトとした(Fig.2A)。その後、pGL-Full を *SacI-NheI* により制限酵素処理し、ExoIII/Mung bean 処理による消化、ライゲーションを経て 7 つの欠失変異体 pGL-D1~pGL-D7 を得た。pGL-D8, pGL-D9 は pGL-Full を鋳型に、ARK-D8F/ARK-D8R, ARK-D9F/ARK-D9R のプライマーセットで PCR を行い、増幅断片を *SacI-HindIII* で制限酵素処理し、pGL2-Basic へ組み込むことで作製した。

ii) pGL-D4-1~pGL-D4-4 の作製

pGL-D4-1 の作製では、pGL-Full コンストラクトを *MluI-BstXI* によって制限酵素処理した後、ゲルからの精製を行った。その後 Ligation high (TOYOBO)によって末端を平滑化し、ライゲーションを行うことでコンストラクトを得た(Fig.2B)。

pGL-D4-2, pGL-D4-3, pGL-D4-4 に関しては pGL-Full を鋳型にそれぞれ ARK-D4-2F/ARKproR, ARK-D4-3F/ARKproR, ARK-D4-4F/ARKproR のプライマーセッ

トで PCR を行い (Table.1)、得られたフラグメントを *MluI-XhoI* により制限酵素処理し、pGL2-Basic ベクターに組み込むことで得た。得られたプロモーターコンストラクトは全てシーケンスにより配列の確認を行い、以降のレポーターアッセイに使用した。

9 . Reporter Assay

膵癌細胞株 PANC-1, AsPC-1, MIA PaCa-2 並びに肝癌細胞株 HepG2 を 4×10^5 /well で 6well プレートに撒き、24 時間後に TransFast™ (Promega)を用いてプロモーターコンストラクト及び β -galactosidase 発現プラスミド [29]のトランスフェクションを行った。トランスフェクションの方法は、添付書類の指示に従った。無血清培地中で 1.5 時間インキュベートした後、37 °C に暖めた通常培地 5ml を加え、更に 48 時間、37 °C , 5%CO₂の条件下でインキュベートした。尚 HepG2 では 48 時間後に低グルコース処理を行った。lysis buffer (PBS1% NP-40, protease inhibitor cocktail (1mM AEBSF, 0.8 μ M aprotinin, 20 μ M leupeptin, 40 μ M bestatin, 15 μ M pepstatin A, 14 μ M E-64); Sigma)によりタンパク質を抽出し、ルミノメーターによりルシフェラーゼ活性を測定した。測定には 96well プレートを用い、20 μ l のサンプルに対し、100 μ l のルシフェラーゼ基質 Luciferase Assay System (Promega)を加え活性測定を行った。 β -galactosidase の活性測定は β -galactosidase Enzyme Assay System (Promega)を用いた呈色反応により行った。96well プレート上で 20 μ l のサンプルに対し、20 μ l の基質を加え、37 °C で 30 分インキュベートし、420nm の波長により吸光度測定を行って得られる値を活性値とした。各コンストラクトにおける最終的なルシフェラーゼ活性は β -galactosidase 活性により補正したものとした。

10 . 塩基配列の確認

DNA Construct の塩基配列の確認は、BIG DYE® terminator v.3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems, USA)を用いて行った。反応条件はプロトコールに従い、電気泳動には DNA シークエンサー 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を使用した。

11 . 大腸菌培養および DNA 調製

クローニングのための大腸菌宿主は TOP10 株 [30]を用いた。形質転換の方法はキット One Shot TOP10 Chemically Competent E.coli (Invitrogen, USA)のプロトコールに従い、大腸菌を LB プレートに撒いて 37℃, 16 時間インキュベートした後、1.5ml の LB 培地にて 16 時間振った。100ml の TB 培地に 500 μ l の大腸菌を加え、6 時間振り、吸光度の測定を行った。OD₆₀₀ が 1~1.5 の時に最終濃度が 20 μ g/ml となるように chloramphenicol を加え、更に 16 時間培養した。DNA 調製は Quantum Prep™ Plasmid Midiprep Kit (BIO RAD, USA)を用いて行い、方法は添付書類に従った。その後フェノール・クロロホルム抽出を行って得たプラスミドをレポーターアッセイに使用した。

12 . actinomycin D 処理

HepG2 細胞を 2×10^6 個 10cm シャーレに撒き、24 時間後、終濃度 0.5 μ g/ml となるように actinomycin D を溶かした通常培地及び低グルコース培地下で培養した。6 時間そして 12 時間後、RNA を抽出し、ARK5 mRNA の発現量を調べるため RT-PCR を行った。

13 . 画像解析

ARK5 mRNA の半減期の解析では、泳動写真を画像データとしてコンピューターに取り込んだ後、Scion image (Scion Corporation) ソフトを用いてシグナル強度を解析した。ARK5 バンドの相対強度は ARK5 のバンドピークの面積を GAPDH のもので補正することで得た。

III: 実験結果

I: 腫瘍細胞株における ARK5 mRNA の発現及びグルコース飢餓耐性との関連

腫瘍細胞株における ARK5 mRNA の発現パターンを調べるため、膵癌細胞株 6 種及び肝癌細胞株 5 種を対象に RT - PCR を行った。通常培地中で飼育した細胞から RNA を抽出し、cDNA を作製し PCR を行った結果、膵癌細胞株 6 種いずれにおいても、ARK5 mRNA の恒常的な発現が認められた(Fig.3A)。肝癌細胞株では HepG2, Hep3B に比べ Alexander, HuH-7, SK-Hep-1 において、強い恒常的な発現が認められた。続いて、ARK5 の発現とグルコース飢餓耐性との関連を検討するため、グルコース飢餓状態各処理時間における細胞株の生存率をヘキスト PI 染色により求めた。その結果、膵癌細胞株では AsPC-1, PANC-1, KP-3 が 48 時間以降も高い生存率を示し、BxPC-3, MIA PaCa-2, PSN1 の 3 細胞株については 48 時間の時点では約 3 割以下の生存率を示し顕著なグルコース飢餓耐性は認められなかった(Fig.3B)。一方肝癌細胞株では HepG2 及び Hep3B がグルコース飢餓処理 48 時間後までに顕著な細胞死を示した。また、HuH-7、SK-Hep-1、Alexander がグルコース飢餓状態に対し、48 時間以降も極めて強い耐性を示し、ARK5 の発現結果と一致する傾向を認めた。しかし ARK5 mRNA の発現パターンと耐性能の相関が見られ、ARK5 の遺伝子発現が腫瘍のグルコース飢餓耐性能に關与している可能性が示唆されたが、ARK5 の発現量と完全に一致するわけではなかった。

II: 転写調節制御による ARK5 遺伝子発現制御機構

II-I: 腫瘍細胞株における ARK5 転写調節領域内の主要転写開始点の推定

ARK5 の腫瘍における遺伝子発現制御機構は不明である。しかし、先ず考えられる重

要な機構として、転写調節因子による発現制御が挙げられる [31]。そこで転写調節因子による ARK5 の発現調節機構の解明を試みるべく、腫瘍における ARK5 遺伝子の発現制御領域の解析に着手した。

ARK5 の発現が認められる正常組織としては心臓と脳が知られており(データに示していない)、脳由来の ARK5 mRNA ではメチオニンコドン ATG の A を +1 としたとき、上流 1381 塩基までの cDNA がクローニングされ、これが 5'末端であり、転写開始点の可能性のあることがデータベースにより示されているが [32]、腫瘍での転写調節による発現制御機構がこの転写開始点を同様に使用しているか明らかでない。このことから、まず腫瘍で主に使用されている転写開始点の決定を試みた。腫瘍細胞株として膵癌細胞株 PANC-1, 肝癌細胞株 HepG2, 大腸癌細胞株 SW480 更に正常組織としてヒト脳から抽出された polyA⁺RNA をサンプルに用い、RT-PCR により腫瘍細胞株由来 ARK5 mRNA の 5'端領域の検討を行った。プライマーセットとして、ATG の A を+1 とおいた場合に上流 593 塩基から 811 塩基の領域を検出する E、593 塩基から 865 塩基までの領域を検出する D、593 塩基から 1004 塩基の領域を検出する C、983 塩基から 1353 塩基の領域を検出する B、更に 1047 塩基から 1503 塩基の領域を検出する A 及びコード内領域を検出する F の 6 つのセットを用いて行った。ARK5 の転写制御候補領域の配列並びにプライマーの位置は図に示した(Fig.4)。結果、F, E では全サンプルにおいて ARK5 mRNA の検出が可能であったが、D から A のプライマーセットにかけては脳由来の ARK5 mRNA に比べ腫瘍由来のものでは極めて弱い発現、もしくは検出が出来ないものがあった。以上の結果から PANC-1, HepG2, SW480 のいずれの腫瘍由来の ARK5 mRNA では 811 塩基から 865 塩基の領域に主要な 5'末端が存在することが予想され、この領域に主要転写開始点の存在が考えられた(Fig.5)。

次にプライマー伸長法により、詳細な転写開始点の決定を試みた。プライマーは ATG コドン上流 697 塩基からのものを用い、PANC-1, HepG2, SW480、更にヒト脳から抽

出した Total RNA 10 μ g を鋳型にプライマー伸長法を行った。およその産物長の確認を行ったところ、3 つの腫瘍細胞株では約 110 塩基前後の主要な産物の確認が出来た (Fig.6A)。ヒト脳からのサンプルでは、弱い同一サイズの産物が認められた。同一のプライマーを用いたプライマー伸長法とダイデオキシ法によるシーケンスを同時に行い、腫瘍細胞株における ARK5 mRNA の転写開始点の同定を行った結果、ATG 上流 811 塩基の T に相当する位置にバンドを確認した (Fig.6B)。これらの結果から腫瘍での ARK5 mRNA の転写は、ATG 上流 811 塩基を主要な起点として行われている可能性が示され、RT-PCR による解析と一致する結果となり、この領域の近辺に発現調節に關与する制御因子結合部位の存在が予想された。

II-II:腫瘍細胞における ARK5 遺伝子の転写制御要素の探索

転写開始点探索の一方で、ARK5 遺伝子の転写調節領域内の制御要素の探索も腫瘍における遺伝子発現解析上重要な課題であることから、ARK5 の転写調節領域を、ルシフェラーゼをコードする cDNA の上流に導入し、レポーターアッセイによる転写制御因子の探索を試みた。今回新たに推測された ARK5 遺伝子の転写開始点を+1 とした際、上流 3497 塩基から下流 788 塩基を含む転写調節領域を完全長プロモーター pGL-Full とし、以下 pGL-D1 から pGL-D9 まで 8 つの欠失変異を作製した。その際のレポータープラスミドの作製方法は材料・方法で述べた (Fig.2)。これらルシフェラーゼ発現コンストラクトを膵癌細胞株 PANC-1, AsPc-1, MIA PaCa-2 へ導入し、ルシフェラーゼ活性の測定を行ったところ、いずれの細胞株において pGL-D4 から pGL-D5 の間で著明な活性減少を認め、-412 塩基から +248 塩基の領域に正に働く制御要素が存在することが明らかとなった (Fig.7A)。この領域に結合しうる既知の転写因子としては、ハウスキーパーな遺伝子の転写に關与する Sp1 [31] [33], c-Jun, c-Fos ヘテロダイマーの転写

因子として細胞増殖や形質転換に関与する AP-1 [34]や細胞周期の制御に関与する転写因子 E2F、更に急性骨髄性白血病の発症に関与する転写因子 AML-1 [35] [36]等がデータベースによる解析で示されている(Fig.8)。ARK5 の転写活性に関わる制御因子の同定を試みるため、新たに作製した欠失変異 pGL-D4-1 から pGL-D4-4 を用いてこの領域でのレポーターアッセイを試みた。その結果、pGL-D4-2 と pGL-D4-3 の間に著しい活性の減少を認めた。-284 塩基から-193 塩基の領域には AML-1 様の転写因子結合配列及び E2F 様の結合配列が見受けられ、これら転写因子が ARK5 の転写活性に重要な役割を担っている可能性が示唆された(Fig.7B, Fig.8)。しかし、今回の研究では完全に同定するには至らなかった。

III : mRNA 安定化による ARK5 遺伝子発現制御機構

III-I : グルコース飢餓条件下での ARK5 の遺伝子発現

グルコース飢餓耐性の誘導において重要な因子である ARK5 がグルコース飢餓条件下でどのような発現制御を受けるか検討するに当たり、肝癌細胞株である HepG2, Alexander, HuH-7, および SK-Hep-1 の 4 種を低グルコース培地で培養して RT-PCR により発現の経時変化を調べた(Fig.9)。その結果、グルコース飢餓条件下では HepG2 細胞でのみ ARK5 mRNA の発現誘導が認められた。より詳細に ARK5 発現誘導の経時的变化を見た結果、ARK5 mRNA の蓄積がグルコース飢餓処理後 9 時間で始まっており、12 時間後でピークに達することが明らかとなった(Fig.10A)。リアルタイム PCR による ARK5 mRNA 発現量の定量化を行った結果、ARK5 mRNA は無処理対照細胞に比べ、グルコース飢餓処理 12 時間後に約 2.5 倍に増加していた。

III-II : グルコース飢餓による ARK5 mRNA 発現誘導への mRNA 安定性の関与

ARK5 mRNA の蓄積の原因としては、1) 転写による制御、2) mRNA の安定化による制御[37]が考えられる。グルコース飢餓条件下での ARK5 mRNA の蓄積が転写調節によるものかを決定するため、完全長プロモーターを含むルシフェラーゼ発現コンストラクト pGL-Full を HepG2 に導入し、グルコース飢餓条件下でルシフェラーゼ活性の測定を行った。Fig.10B に示すように、ルシフェラーゼの相対活性は 12 時間のグルコース飢餓処理の間次第に減少していくことが明らかとなった。次に ARK5 mRNA の安定化による蓄積を検討するため、グルコース飢餓条件下で転写阻害剤である actinomycin D により HepG2 を処理した。その結果、対照細胞に比べ、グルコース飢餓処理の細胞では ARK5 mRNA の分解が著明に抑えられていることが明らかとなった (Fig.10C)。画像解析により、無処理対照細胞では ARK5 mRNA の半減期がおよそ 3 時間であったものが 12 時間のグルコース飢餓条件下では 6 時間であることが明らかとなり、約 2 倍の半減期の延長が示された。以上の結果から、HepG2 細胞ではグルコース飢餓条件下で ARK5 mRNA の安定化が発現制御に関与していることが明らかとなった。

IV: 考察

今回の研究は腫瘍細胞株における ARK5 遺伝子の制御領域の解析としては最初のものであり、本研究を通して ARK5 遺伝子制御領域の部分的な特徴を示すことが出来た。

転写制御領域の解析では、プライマー伸長法により、腫瘍で主に用いられている転写開始点の同定を試みており、RT-PCR による解析と照らし合わせた結果 ATG 上流 811 塩基が転写の起点になっている可能性が示唆された。RT-PCR による ARK5 の 5'末端の検証では当初腫瘍での ARK5 mRNA が、脳と同じく ATG 上流 1381 塩基近辺の領域まで検出が可能であると思われたが、実際 811 塩基までの領域で主要な発現が見られ、1353 塩基から 983 塩基までの領域では脳と比較して極めて弱い発現が見られた。この結果は腫瘍では正常組織である脳と同様な、ATG 上流 1381 塩基を起点とする転写は低頻度に生じている一方、主に使用している転写開始点は脳とは異なり更に下流に存在することを示唆しており、従って脳と腫瘍組織では ARK5 遺伝子の発現様式が全く異なる可能性がある。ATG 上流 1400 塩基から ATG コドンに渡る領域では GC 含量が平均 75%以上と局所的に極めて高く、CpG アイランドが形成されていることが考えられ、メチル化・脱メチル化による発現制御等エピジェネティックな調節によりその様な差が生じているのかもしれない [38]。また、異なる転写因子の働きによる可能性もある。残念なことに今回行った転写開始点の解析の問題点として、プライマー伸長法で得られたバンドが厳密に RT-PCR で得られた量比を反映していなことが挙げられる。この点が実際に転写開始点として機能しているか正確に断定できるに至っていない。プライマー伸長法でのバンドが非特異的な産物である可能性が完全には否定できていない。Total RNA ではなく polyA+RNA を試料とした、より mRNA 特異的なプライマー伸長法の検討や、今後 S1 マッピングの手法による詳細な解析、更に複数の異なるプライマーを用いたプライマー伸長法による再検討が施行されればより明確な答えが得られると考える。それにより脳と腫瘍における制御差についての詳しい解析にも今後

繋がっていくだろう。

一方ルシフェラーゼレポーターアッセイによる転写制御因子の探索では、今回の研究で推測された転写開始点上流 284 塩基から 193 塩基の領域に存在する、転写因子 E2F と AML-1 α の 2 つが ARK5 の転写活性に関与する候補因子として挙げられた。E2F は細胞周期の G1 から S 期へのエントリーに関与する転写因子であり [35]、細胞周期を制御していることが知られている。ARK5 を強制的に発現させた HepG2 細胞では、グルコース飢餓に対する応答として ATM や p53 の活性を伴う細胞周期の停止が生じていることが示唆されていることから [22]、ARK5 も細胞周期の制御に関与している可能性がある。細胞周期促進に関与する因子が、そのブレーキ役を講ずる因子の転写制御を行っている可能性もフィードバック制御として考えられ、大変興味深い。

他方 AML-1 α は急性骨髄性白血病の原因遺伝子である転写因子 AML-1 のスプライシングバリエーションとして知られている [39]。AML-1 は別名 RUNX-1 と呼ばれ、RUNX 遺伝子ファミリーメンバーの一つであるが、RUNX 転写因子は腫瘍の発生に関与しており、例えば腫瘍の抑制剤として働く RUNX-3 の発現異常が胃癌の発生に寄与していることが現在までに明らかとなっている [40]。RUNX は TGF- β シグナル伝達に関与する Smad や Jak-STAT シグナル伝達に関わる STAT、更に転写因子 GATA-1 等他のシグナル伝達分子や転写因子との相互作用を示し、細胞分化や増殖に関与する遺伝子発現の制御を行っていることが知られる [41] [42]。上述の可能性を考慮しながら、今後更なる詳細なプロモーター解析並びに変異導入を通して、ARK5 の転写活性に関わる因子の決定が急務である。

また、重要なことに今回作製したプロモーターコンストラクトを用いたレポーターアッセイでは転写開始点下流の領域の配列にも依然としてルシフェラーゼ活性が認められた(Fig.7A)。この結果から、ARK5 の第一エクソン内にもエンハンサーが存在する可能性も考えられる。TGF- β 1, c-myc をはじめ、5'非翻訳領域の長い遺伝子は複数のプロモーターにより制御されていることが知られ [43] [44]、ARK5 も同様に幾つかのプロモ

ーターにより制御されている可能性も考えられるが、今回の検討の範囲ではアーティファクトの可能性を否定できてはいない。それらを示すためには、更に下流のプライマーを用いたプライマー伸長法及び S1 マッピングによる検証が必要である。

本研究では恒常的な発現を示す膀胱癌細胞株を用いた ARK5 遺伝子の転写制御機構の解析の他に、肝癌細胞株 HepG2 がグルコース飢餓条件下で示す ARK5 遺伝子発現誘導の解析も行った。グルコース飢餓条件下では ARK5 mRNA が 12 時間で約 2.5 倍の発現増加が見られたが、この結果は栄養に乏しい環境が栄養飢餓耐性、浸潤・転移等に非常に重要な分子である ARK5 の発現を促すことを示しており、極めて興味深く、腫瘍の悪性化がこうした微小環境への応答の結果であるという仮説を支持している [6]。しかしながら HepG2 では誘導が見られるにも関わらずグルコース飢餓条件下で 24 時間以内に著しい細胞死を示す(Fig.3B)。この点に関しては ARK5 の活性化を行う Akt の状態が影響しているのかもしれない。また、他の AMPK である AMPK α の活性が飢餓耐性に必須であることも明らかになっており詳細な検討が必要である [9]。

ルシフェラーゼによるレポーターアッセイの結果では、グルコース飢餓による ARK5 の発現誘導は転写活性によることを示していなかった。一方 actinomycin D による mRNA 半減期の検討結果は ARK5 mRNA の蓄積が mRNA の安定化によることを示した。3'非翻訳領域に見受けられる AU-rich な要素に RNA 結合タンパクが結合することで mRNA の安定化、不安定化が制御されていることが報告されており [45]、実際に幾つか AU-rich element を ARK5 mRNA の 3'非翻訳領域のポリ A 付加シグナルの近辺に確認することが出来たことから(データには示していない)、mRNA 安定化による制御の可能性が強く考慮される。グルコース飢餓というエネルギー欠乏状態を考えれば、エネルギーを消費する de novo の mRNA 合成に比べ、細胞にとっては mRNA の安定化による遺伝子発現制御の方が好都合と考えられる。

mRNA 安定化による制御の可能性が示唆されている一方、しかしながら、転写によ

る制御の可能性も、現段階では完全には否定できない。グルコース飢餓処理によるルシフェラーゼ活性が 12 時間後で 1/5 にまで減少しているにもかかわらず、mRNA 安定化による半減期の延長は約 2 倍であることから 2.5 倍の ARK5 mRNA の発現誘導が説明できない矛盾点があるからである。一つの解釈として、グルコース飢餓条件にルシフェラーゼによるレポーターアッセイの系が適していない可能性が挙げられる。グルコース飢餓が代謝ストレスであるために、ルシフェラーゼタンパクの翻訳や折りたたみといったタンパク質合成プロセスの段階が影響を受けているのかもしれない [46] [47]。この点を明確にする為には、新規に合成された RNA をより直接的に定量できる Nuclear runoff assay を試みる必要がある。また、他の可能性としては、今回使用した完全長プロモーターコンストラクトには含まれていない転写調節領域の関与がある。転写による制御の可能性を払拭する為には、更に詳細なプロモーター解析を進めていくことも求められる。

以上、今回の研究により腫瘍細胞株では転写調節因子による制御及び mRNA の安定化による制御という ARK5 遺伝子発現の 2 つの制御機構の可能性が示された。これは何を意味しているか。例えば血管新生に関わる成長因子 VEGF は低酸素状態では転写と mRNA の安定化によりその発現が制御されていることが明らかにされているが [48]、これと似たように、腫瘍がエネルギー欠乏環境による弊害に対応し、生き残っていくためには、低グルコース下でサバイバルに関連する遺伝子発現を微調節できる多彩な制御機構が必要なのであろう。また、Fig.3 での ARK5 の発現と生存率では完全に一致しない細胞もあることから、遺伝子発現段階の制御だけでなく、翻訳、そしてタンパク質の分解制御といった [49] [50]、他段階の調節の可能性も推測できる。

転写制御、mRNA の安定化による制御双方においていかなるシグナル、また分子が関与するかより詳しい機構が解析されることになれば腫瘍特異的な発現制御の解明に繋がる。最近我々の研究室で ARK5 の発現と多発性骨髄腫の悪性化には極めて強い相

関があることが分かった(未発表)。今後、こうした解析が微小環境に基づいた ARK5 の腫瘍特異的転写阻害という新しい治療法へと結びつくことが期待される。

V: Abstract

A novel AMPK family member, ARK5 was found to be involved in tumor survival under glucose starvation, contributing to the tumor malignancy via conferring the adaptability to such microenvironment. In order to clarify the precise mechanism of regulation of ARK5 gene expression in cancer cell lines, I, an analysis of transcriptional regulation; II, analysis of mRNA stabilization, were conducted using pancreas cancer and hepatoma cell lines. The putative transcription start site employed in tumor cell line was revealed to be positioned at -811th nt from the ATG translation initiation site by primer extension experiment. The reporter assay by using promoter-luciferase constructs showed the region between -284 and -193 nts upstream from the putative transcription start site is responsible for major promoter activity of ARK5 gene and it was found to contain E2F and AML-1 α recognition motives. On one hand, glucose starvation was found to induce ARK5 mRNA accumulation in a human hepatoma HepG2 cell line. During 12 h glucose starvation, HepG2 cells showed 2.5-fold increase in ARK5 mRNA concentration compared with that of non-starved cells. Stability of ARK5 mRNA was analyzed in HepG2 by actinomycin D treatment and approximately 2-fold enhancement of ARK5 mRNA stability during 12 h glucose starvation was found. These findings suggest that ARK5 gene expression was regulated at least by two mechanisms, through transcriptional regulation and mRNA stabilization in cancer cell lines.

謝辞

本研究に従事する機会を与えて頂き、また本研究の立案、実施、発表に関し終始熱き御指導、御鞭撻を賜りました国立がんセンター研究所支所江角浩安先生に厚く御礼申し上げます。

細部にわたり実験の御指導をいただきました同研究所支所がん治療開発部、鈴木敦先生、小倉勤先生並びに倉島由紀子先生に心から感謝致します。

また、小泉史明先生をはじめ、同研究所がん治療開発部の皆様には実験上様々な助言を頂き深く感謝いたします。

AMPK (AMP-activated protein kinase)

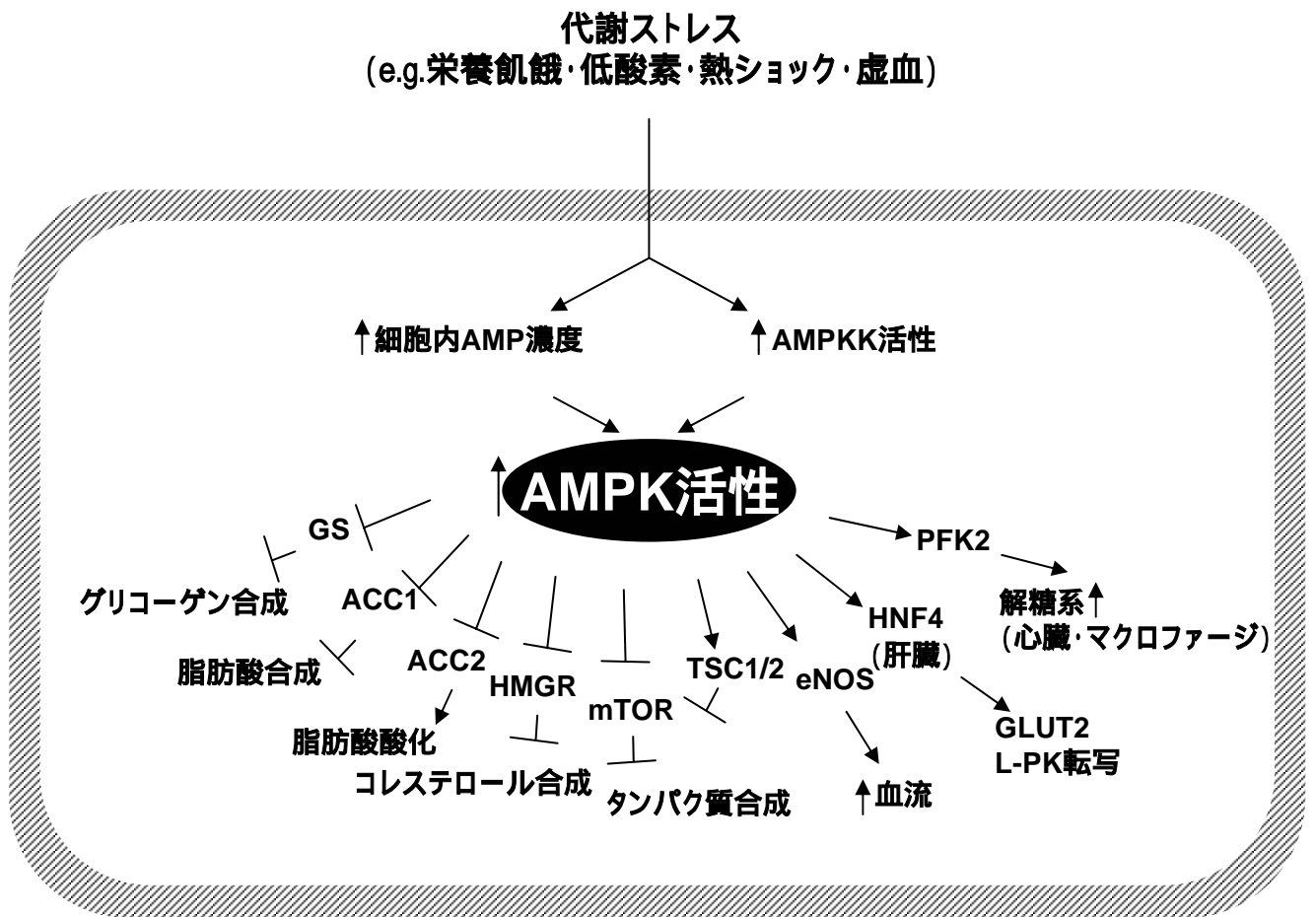
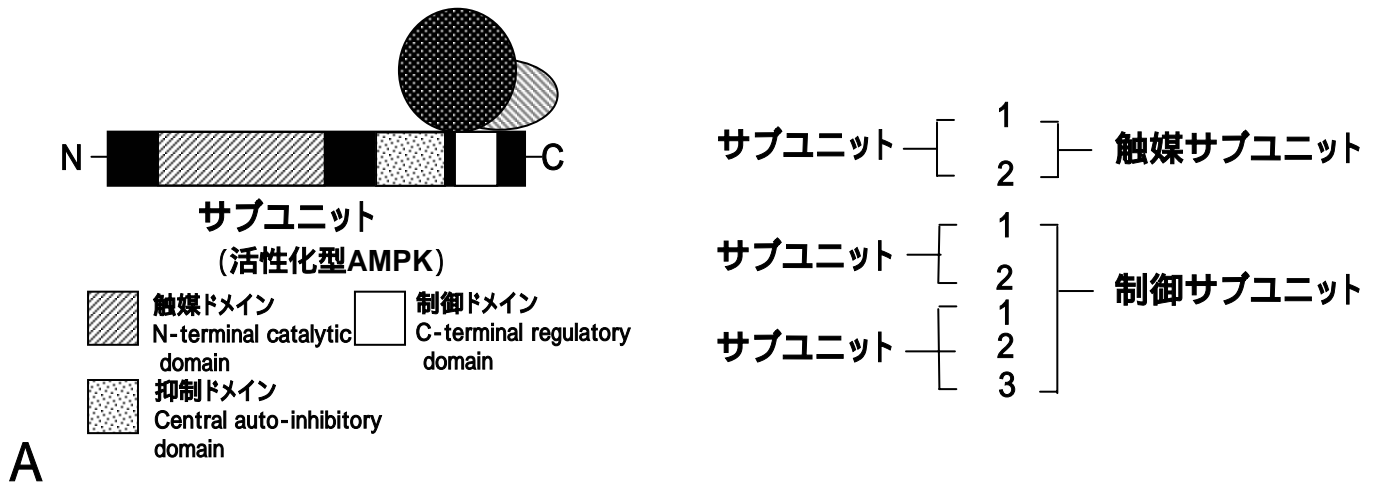
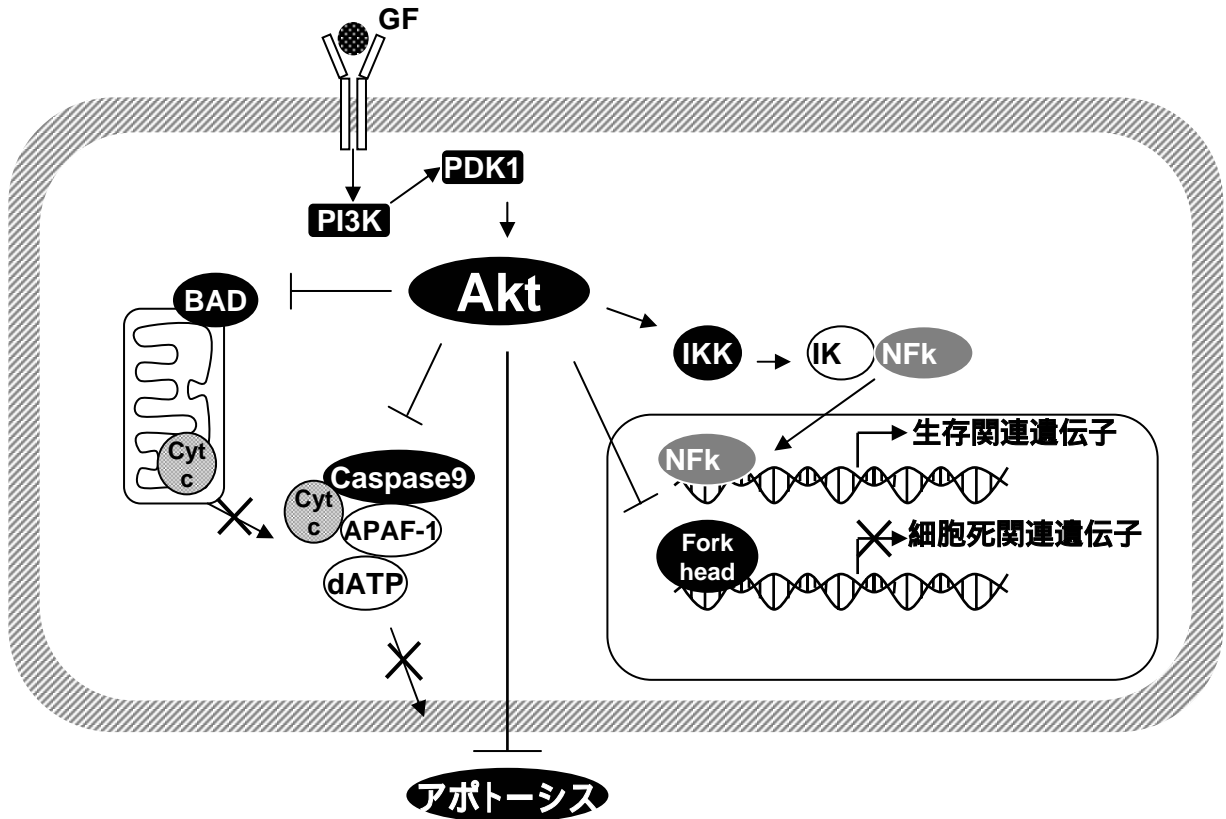


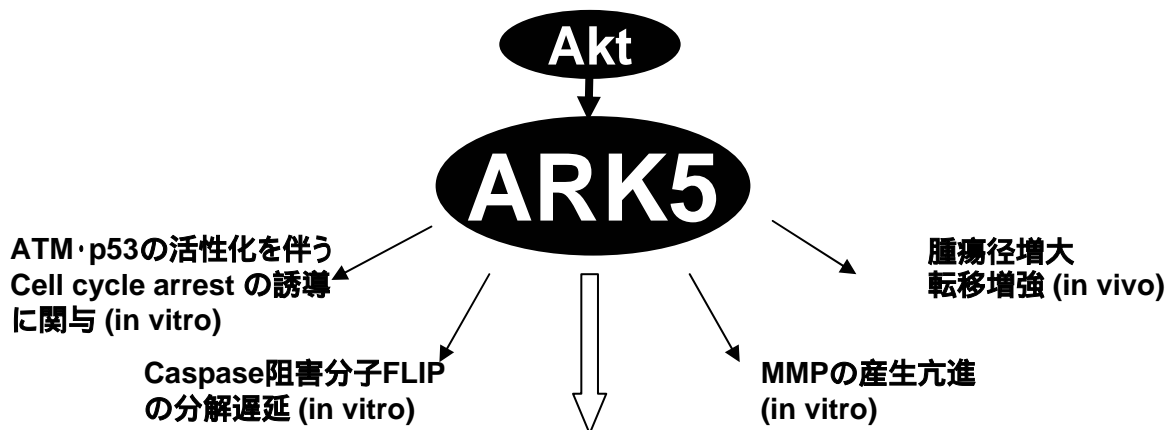
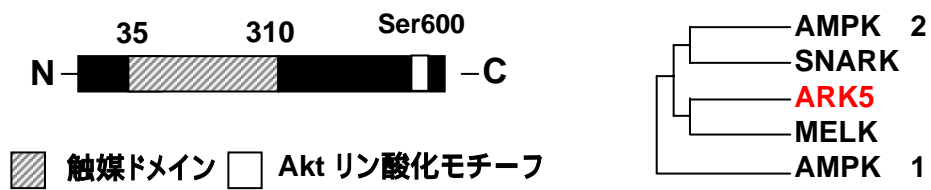
Fig.1

細胞生存シグナル



C

ARK5 (AMPK-related kinase number 5)

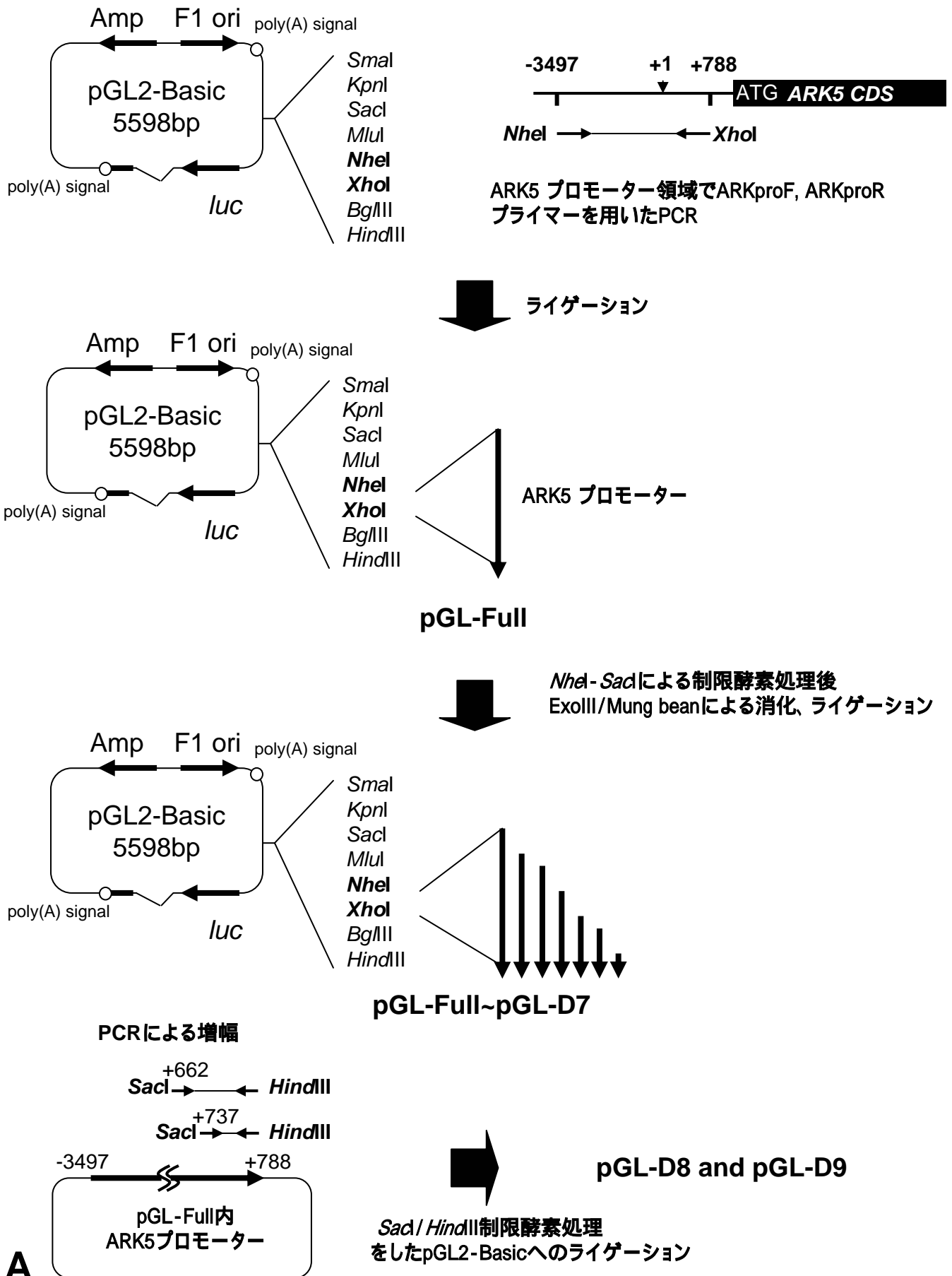


生存や浸潤・転移に関するリン酸化酵素
(腫瘍悪性化関連因子)

D

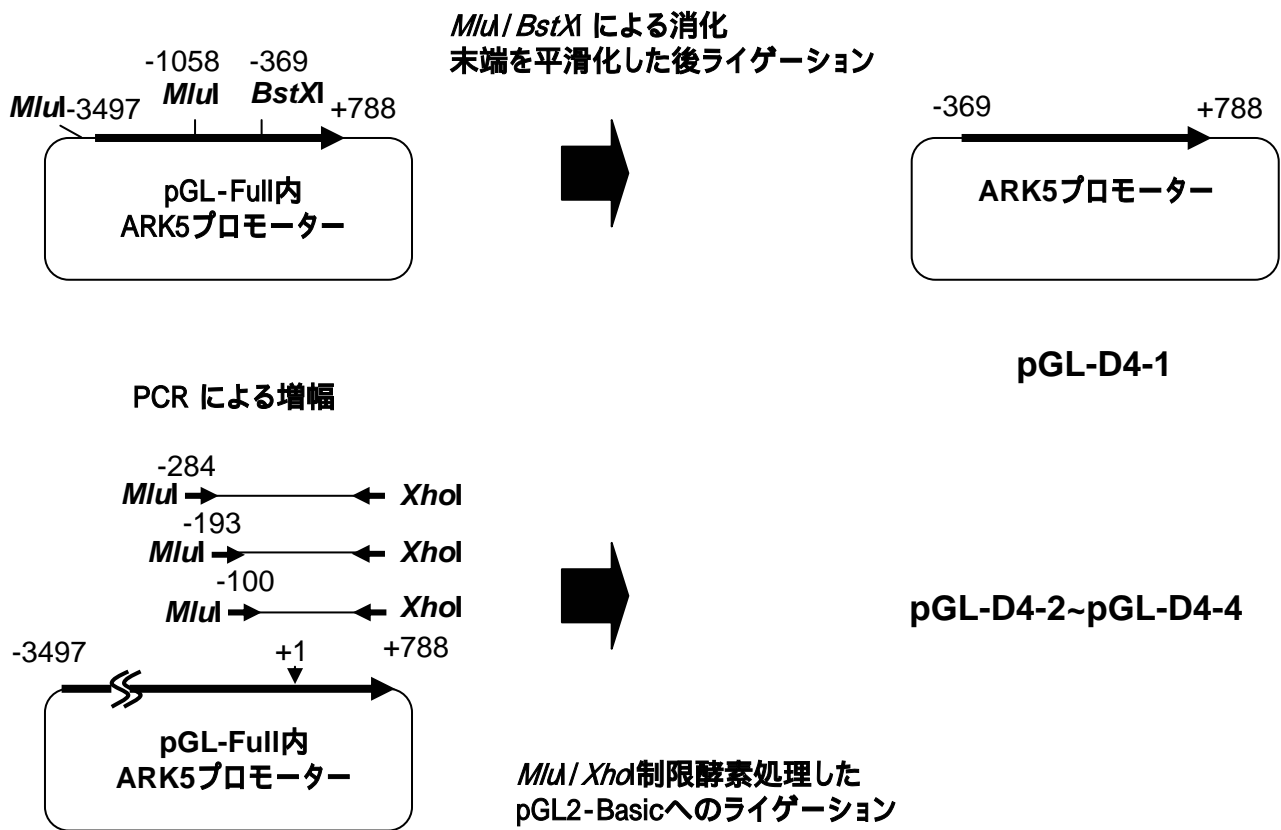
Fig.1 Continued.

Human ARK5 プロモーターコンストラクトの作製方法



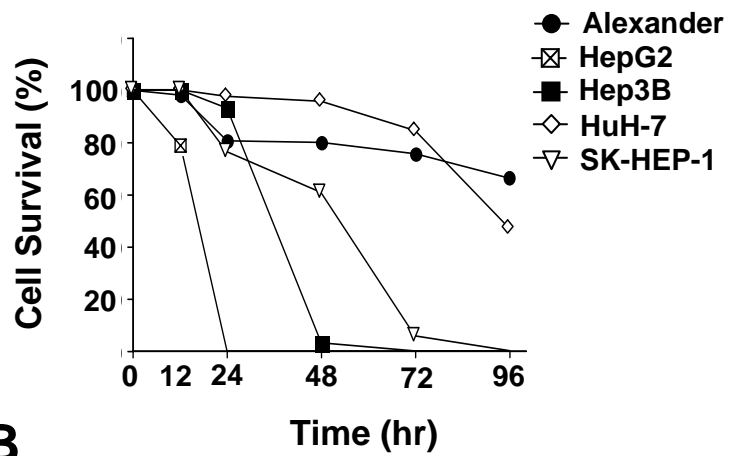
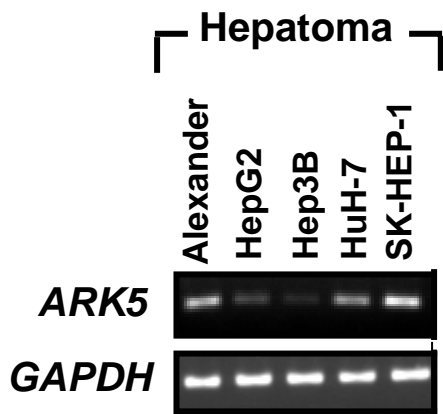
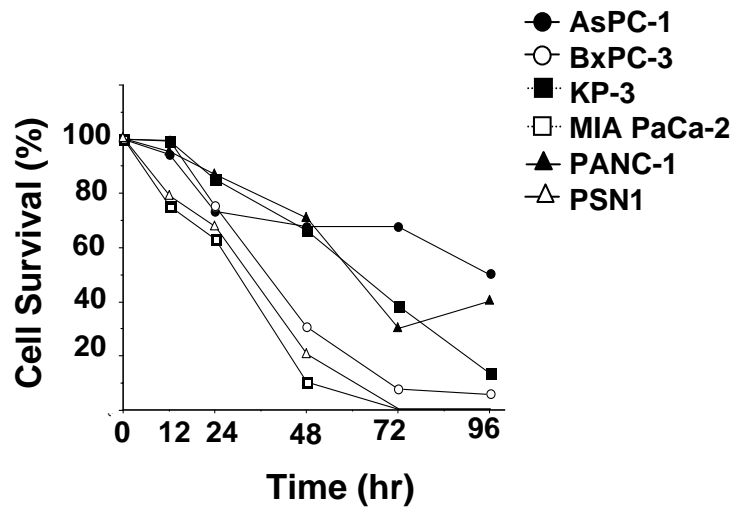
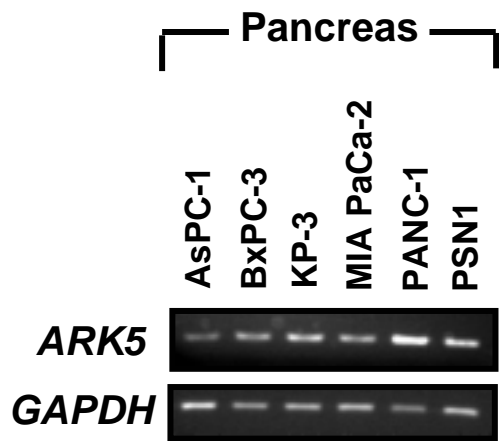
A

Fig.2



B

Fig.2 Continued.



A

B

Fig.3

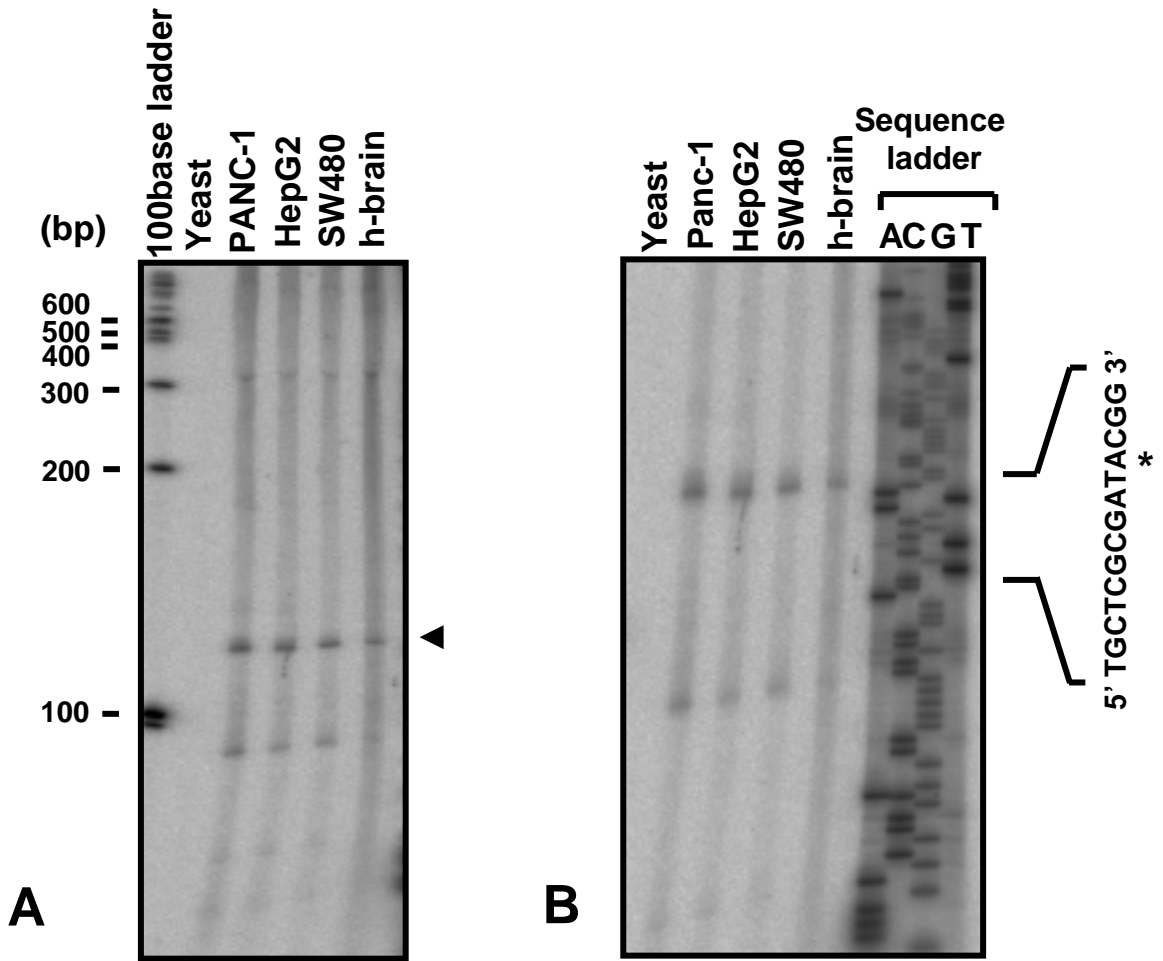
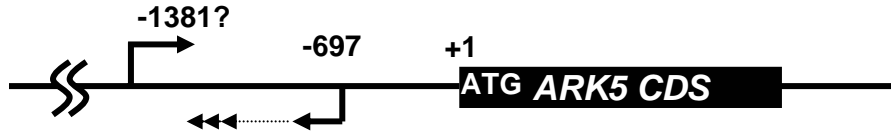
```

-1593 TTCCACCCCTAGTCTGGTACATTGCACCACTTGTAAAAAATTTCCCTAAGACCTCTTTTTCTCTA
-1522 GCCTTCTTCCTTATTTTTCATGGTCTCTTCTTAGAACGGCGGCAGCCACGCCGGTGGGAGGCCCTTC
      ↘
      A-F
-1453 CTGCCTGACCCTTACCGTGCGGGGTACCGTTCCTGTCCACCATCGCCAGGATCTGGCCCTTTCAGTGAAA
      ▼
-1384 GGAAATCTCCCAAGGCCTAAGGAGGCAAGAGGCCTGCAAATCGCCTCCTGCTCAGCAAACGGGTTGCT
      ↘
      B-F
-1316 CAGCAGGCCCGGGTCTGCTGCCACCCAGGTCCTGGTTTGCCACCTCCGATGGCGGCCTTCGCT
-1249 GGCAGGGTGGGCGCCTCTGGGAGCCAGCTCCGTCCCGGCGCCTTAGAGCCCCATCTCTCCACGT
-1182 CCCTGGCCTTCTCCCTTCCAGGCGGCTGTCCCCGCCGGGTCCAGATGGTGTGGAGGGCCGGCG
-1115 GTTCGACGGCGGGCCCGGGTTCCAGCCTCCCGGCCTCCCTCCGTCCTGACTCTCCTTTCTCGGAGA
      ↘
      A-R
-1047 GGGCGCGGGGGCCGGGGCCAAAGCGCCGCTTTGGGTTCTCCTGGACTCGGAGTTGCCCCAGGCG
      ↘
      C-F
      ↙
      B-R
-981 GGCGCAGCTGTCCCCGCGGGTGCCAGCCTCGGGCGGGCAAGTCCGTGAGTACCGCCTGTAAC
-915 CGAACACCAGGCCTCCCTGCCCTCCCCAGCTCCGGCCGCCAGGCTCGGGCGACACCTACAAGAA
      ↘
      D-F
-848 AATGAAGGGGCGCCAGGCCCGCGCGGCCCGCGCGTATCGCGAGCAGGTCCCGCGCGGCCCGCG
      ↘
      E-F
-783 GCTCGCGCGCTCTTTCTTCCCCGGCCCCGGGGCTCGGCCAGCCGAACCGCCGCCCGGGCGCCAG
-717 CAGGAATCCAGGCCAGCGACCCGCCCGGAGCCGAGGCGGCGGAGGGCCCGGGTAGCTGCGA
-652 CTGGCGAGCCCAGAGCGCCCGGGAGGGGGCGCCCGGCTTGAATTTCCCGTCCCTTCCGGCCC
      ↘
      C,D,E-R
-586 AGCGAGGACAAAGCACTCCTGGCCGCCGCCCGCCGCCCGCTGCGCTACGCCGCGCCGCACAAA
-520 GGGCGAGTCGCGACACGCTCCCATCCCCCTCCAGCTCACGGCGGCCCGGCCCGGGTGGCTGCA
-454 GGGAGGTGGGGAAAGCCCTGGCTGCACCGCCCTCGCTCCCCCTCCCCTGGGGCCGCGGAGCGCC
-388 GCCCCGCCCGCTGCGCGTCTCCCGGGAGGGGTTGGGGGGCGCGGCCCCACATAAAGCTC
-322 CCCCTCCTGCGCTGCGAGCCACCTCTCCCTCCCTCCTGCAAACACCACCGCCTCCCCTGCCACCGC
-254 CGCCACCTCGCCCAGCTCCACAGCTCGCCGCGGCCGGGGGGCGGTGCGCGACCGTGCAGCGCC
-189 GCGGGCGCCAGATGTGCACTCCCGCGCCGCCAGTGACCGAGCCGAGTCCGAGCGGTATCGGGC
-123 CGCTCCCTGATGCTGCGGGGGCGACCTTGAGCGTACAGCGGCTTCCCTCGGTGGGGACCCCGACAT
      +1
-56  CCCAGCGCTGTGCCGGTCTTGCCCTCTGTAGCCCGGCTCGCCCCGCGCTTGGACATGAAGGGG

```

Fig.4

ARK5 Promoter Region



A

B

-848
 AATGAAGGGGCGCCAGGCCCGCGGCGGCCCGCGGCGGCGGCCCG
 * -811
 TATCGCGAGCAGGTCCCGGCGGCCCGG-----
 +1
 ATG

C

Fig.6

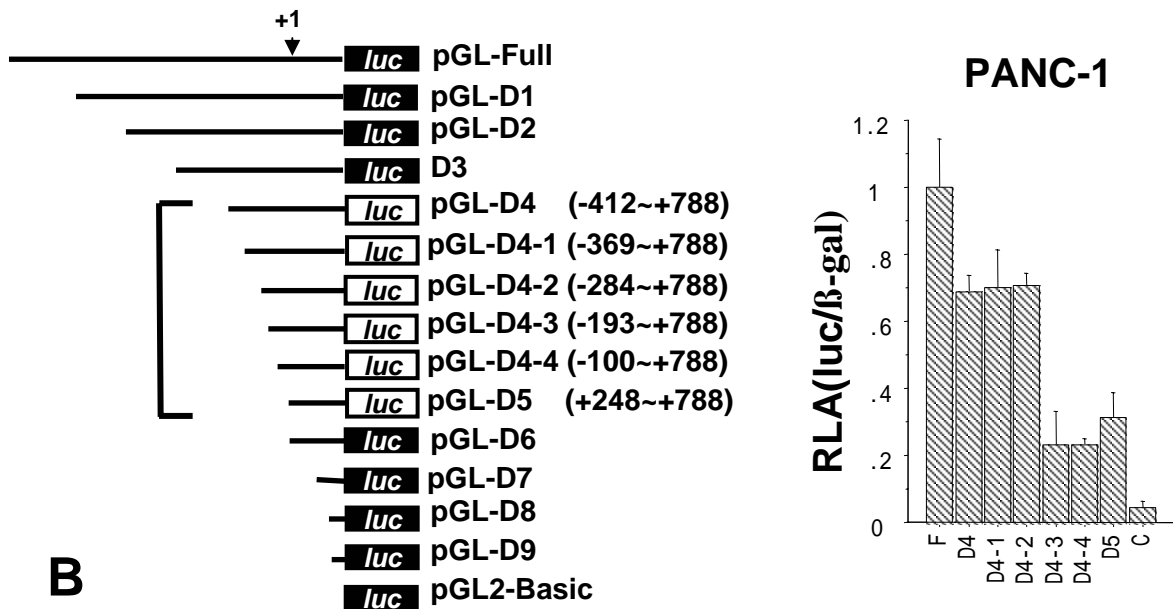
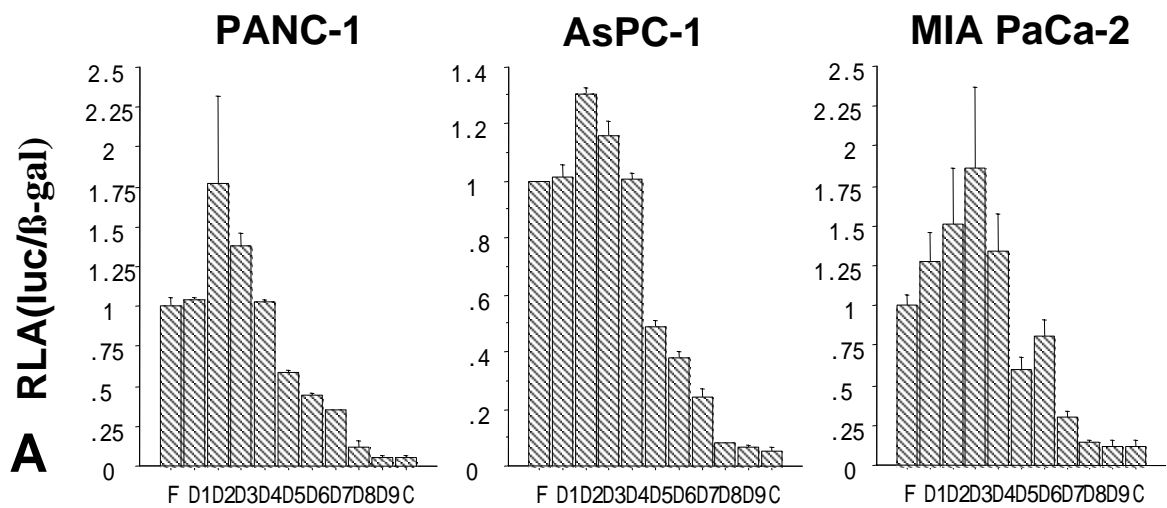
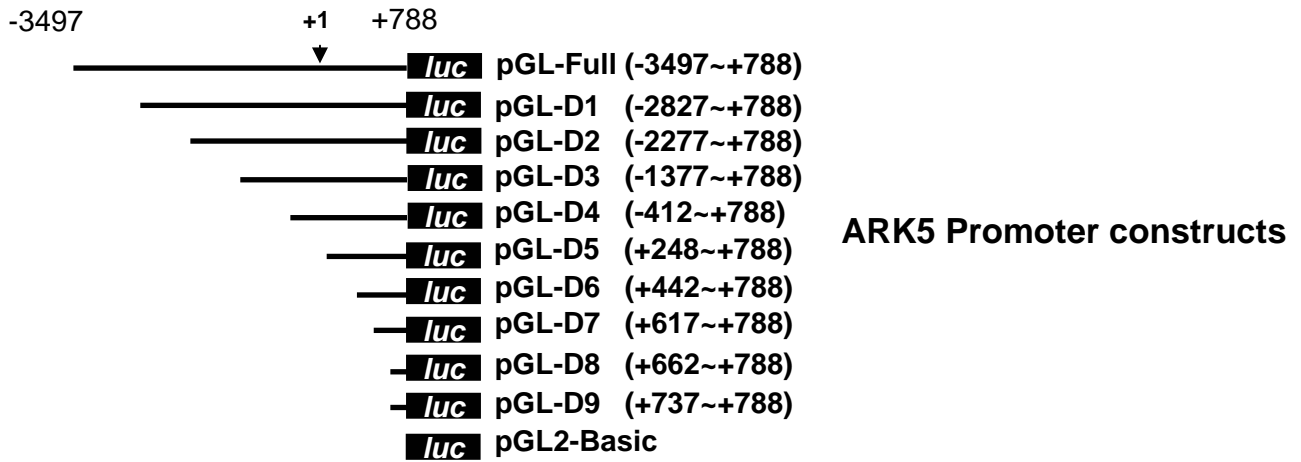
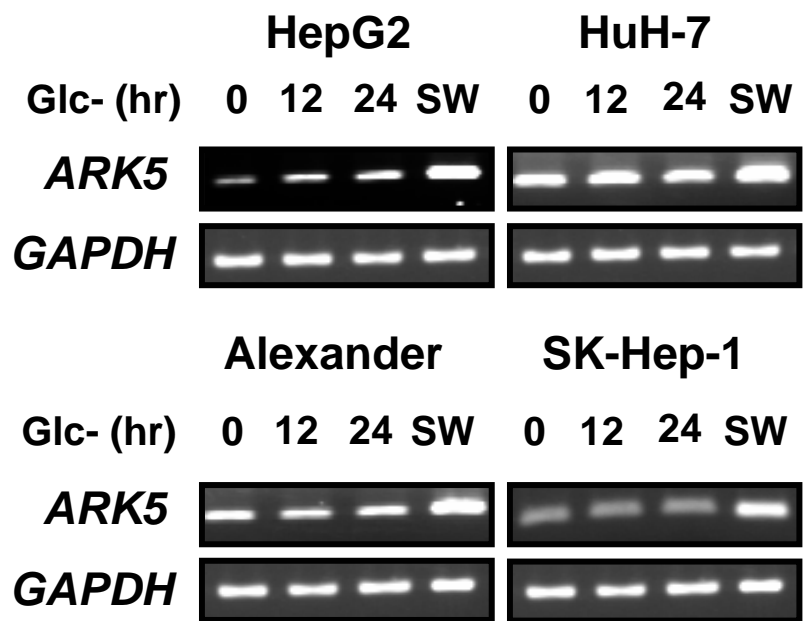


Fig.7

-412 AGCTCCGTC^{MZF-1}CCCGGCCTTTAGAG^{GATA-1~3}CCCCATCTCTTCCACGTCCCTGGCCTCC
 -359 TCCCCTTC^{MZF-1}CAGGCGGCTG^{MZF-1}TCCCCGCC^{GATA-1~3}GGGTCCAGATGGTGTCGGAGGGCC
 -308 GCGGTTTCAGCGCGGGCCCGGGTTCAGCCTCCCGGCCTCCCTCCGTCCC
 -257 TGA^{E2F}CTCTCTTTCTTCGGAGAGGGCGCGGGGGCCGGGGCCAAA^{GCGCCGCT}
 -206 CT^{AML-1}TGGGGT^{D4-3}TCTCCTGGACTCGGAGTTGCCCCAGGCGGGCGCAGCTCTGCCCC
 -154 GCGGGGTGCCAGCCTCGGGCGGGCAAGGTCC^{AP-1}GTGAGTCACCGCCTGTAACC
 -103 GAACACCAGGCC^{SP1}TCCCTGCCCC^{MZF-1}TCCCCAGCTCCGGCCGCCAGGCTGCGG
 -52 CGACACCTACAAGAAAATGAAGGGGCGCCAGGCCCGCGGGCGGCCCGGGC
 -2 ⁺¹CGTATCGCGAGCAGG^{MZF-1}TCCCGGC^{GCCCCCGGCTCGCGGGCGCTCTTTCTTCCC}
 +51 CGGCCCCGGGGCTCGGCCAGCCGCAACCGCCGCCCGGGCGCCAGCAGGAA
 +101 TCCAGGCCGAGCGACCGGCCCGGAGCCCGAGGCGGGCGGAGGGCCCCGCGG
 +151 TAGCTGCGACTGGCGAGCCCGAGAGCGCCCGGGGAGGGGGCGCCCCGGCT^{NF-kap}
 +201 ^{GGAATTTCC}CGGTCCCTTCGGCCCCAGCGAGGACAAAGCACTCCTGG

Fig.8



RT-PCR

Fig.9

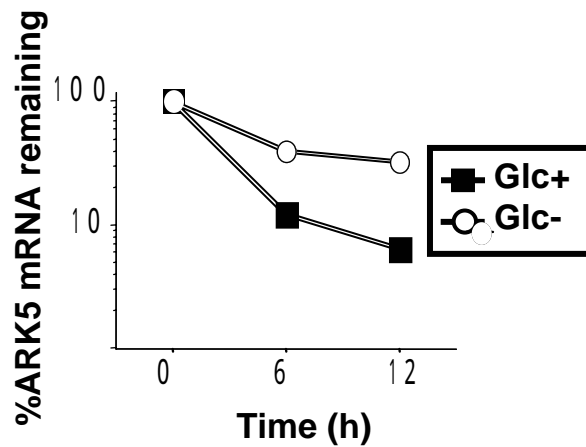
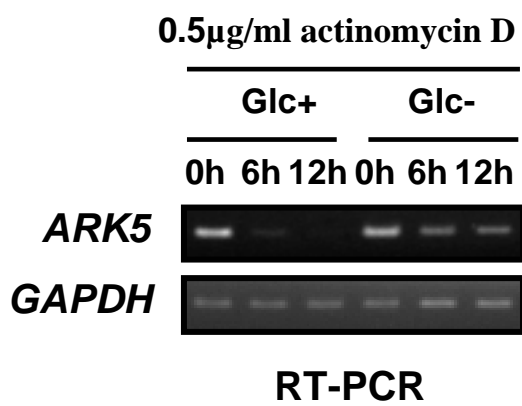
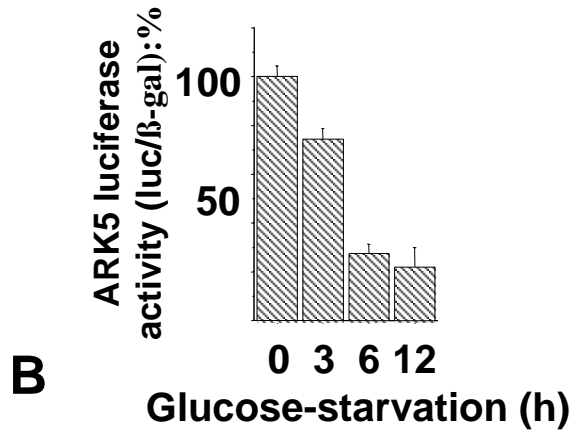
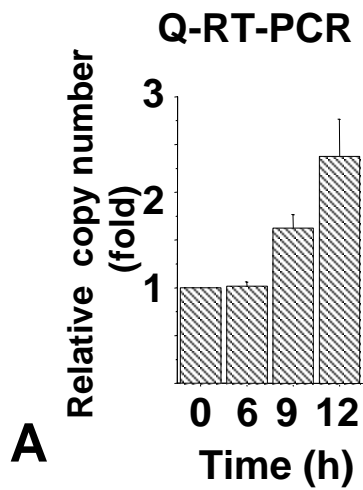
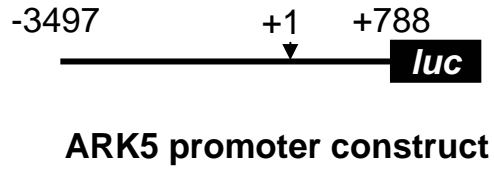
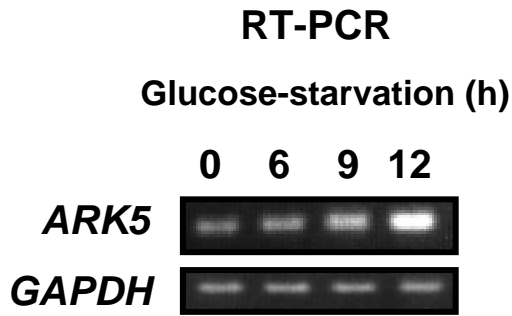


Fig.10

Table. 1-1

プライマーセット(発現確認)

遺伝子名	プライマー名	配列	反応条件*	産物長
ARK5	ARK5F	5' atgctaagtaccctctgaatg3'	94 30秒/58 30秒/72 1分 30cycles	150bp
	ARK5R	5' gcaacaagcagtcagtcgac3'		
	ARK(-1503)F	5' atggctcttcttagaacgcg3'	94 30秒/68 30秒/72 1分 30cycles	435bp
	ARK(-1047)R	5' tctccgaagaaggagagtcag3'		
	ARK(-1353)F	5' gcctgcaaatacgctcctctgctcagc3'	94 30秒/68 30秒/72 1分 30cycles	371bp
	ARK(-983)R	5' cctggggcaactccgagtcaggag3'		
	ARK(-1004)F	5' gcacgcgttgactcggagttgccccaggcggg3'	94 30秒/65 30秒/72 1分 30cycles	411bp
	ARK(-593)R	5' aagggaccgggaaattccaag3'		
	ARK(-865)F	5' ggcgacacctacaagaaatg3'	94 30秒/65 30秒/72 1分 30cycles	274bp
	ARK(-593)R	5' aagggaccgggaaattccaag3'		
ARK(-811)F	5' tatcgcgagcaggtcccggcggc3'	94 30秒/65 30秒/72 1分 30cycles	222bp	
ARK(-593)R	5' aagggaccgggaaattccaag3'			
GAPDH	ARK(+642)F	5' gagtccactctatgcatc3'	94 30秒/58 30秒/72 1分 30cycles	258bp
	ARK(+899)R	5' atgtcctcaatagtgccc3'		
	GAPDHF	5' agggctggtttaactctggt3'		
	GAPDHR	5' cccactgattttgagggga3'	94 30秒/60 30秒/72 1分 22cycles	200bp

*全てのPCR反応では最後のステップとして72 8分の反応を行った。

Table. 1-2

プライマーセット(クローニング)

プライマー名	配列*	反応条件**	産物長
ARKproF	5' <u>ccgctagc</u> aagtgagtgcaaggaccagtaatgagcc3'	94 1分/65 1分/72 2分 30cycles	4285bp
ARKproR	5' <u>cgctcgaagg</u> ctacagagggcaagaccgggcacagcgct3'		
ARK-D8F	5' <u>gcgagctc</u> gcagtcgagcggatcgggccgccc3'	94 30秒/60 30秒/72 1分 30cycles	127bp
ARK-D8R	5' <u>gcaagctt</u> gctacagagggcaagaccgggcacag3'		
ARK-D9F	5' <u>gcgagctc</u> tcggtggggacccgacatcccagcgtgtgc3'	94 30秒/68 5秒/72 5秒 30cycles	52bp
ARK-D9R	5' <u>gcaagctt</u> gctacagagggcaagaccgggcacagcgctgg3'		
ARK-D4-2F	5' <u>gcacgcgtt</u> tcagcctccggcctccctccgtc3'	94 30秒/65 30秒/72 1分 30cycles	1072bp
ARKproR	5' <u>cgctcgaagg</u> ctacagagggcaagaccgggcacagcgct3'		
ARK-D4-3F	5' <u>gcacgcgtt</u> ggactcggagttgccccaggcggg3'	94 30秒/65 30秒/72 1分 30cycles	981bp
ARKproR	5' <u>cgctcgaagg</u> ctacagagggcaagaccgggcacagcgct3'		
ARK-D4-4F	5' gagtaccgcctgta <u>acgcgt</u> caccaggcctccctgccccctccccag3'	94 30秒/65 30秒/72 1分 30cycles	909bp
ARKproR	5' <u>cgctcgaagg</u> ctacagagggcaagaccgggcacagcgct3'		

*下線・太字は制限酵素サイト

**全てのPCR反応では最後のステップとして72 8分の反応を行った。

図の解説

Fig.1 グルコース飢餓耐性の誘導に関与する分子

A. AMPK ヘテロ三量体と AMPK を構成する各サブユニットのアイソフォーム。
B. 代謝ストレスによる AMPK の活性化及びその標的分子を示した [51]。これら以外数多くの分子が報告されている。ACC; Acetyl-CoA carboxylase (ACC1,ACC2), GS; glycogen synthase, HMGR; HMG-CoA reductase, TSC; tuberous scleriosis complex (TSC1,TSC2), mTOR; mammalian target of rapamycin, eNOS; endothelial nitric oxide synthase, HNF4 α ; hepatocyte nuclea factor 4 α , PFK2; 6-phosphofructo-2-kinase. C. Akt による細胞生存シグナル伝達の制御。GF; growth Factor, IKK; Ikapper kinase, IK β ; Ikapper β NF κ β ; nuclear factor kapper β , Cyt C; cytochrome C. D. ARK5 の一次構造と AMPK related kinase の中の位置付けを示した。また、栄養飢餓状態において Akt 制御下での ARK5 の機能的特徴を示した。

Fig.2 Human ARK5 プロモーターコンストラクトの作製方法

レポーターアッセイに使用したプロモーターコンストラクトは PCR、更に ExoIII/Mung bean 消化により作製した。pGL-D8, pGL-D9, pGL-D4-1~pGL-D4-2 に関しては PCR 法を用いたサブクローニングにより作製し、pGL-4-1 に関しては制限酵素処理に続きライゲーション反応により作製した。

Fig.3 腫瘍細胞株における ARK5 mRNA の発現とグルコース飢餓条件下での各細胞株の生存率の検証

A, 膵癌細胞株 6 種、肝癌細胞株 5 種から RNA を抽出し、ARK5 の発現を見

る為、RT-PCR を行った。B. 腫瘍細胞株計 11 種を低グルコース培地下で培養し、ヘキスト PI 染色による生存率の判定を行った。

Fig.4 ARK5 転写制御領域の配列及び、腫瘍における ARK5 mRNA の 5'末端検証に用いたプライマーの位置

メチオニンコドン ATG の A を+1 とした時の上流約 1.6kb の配列を示した。矢頭は脳由来の ARK5 mRNA の 5'末端の位置を示す。

Fig.5 腫瘍における ARK5 mRNA 5'末端の位置の確認

プライマーセット A~F を用い、腫瘍での ARK5 mRNA のおよその 5'末端の位置を RT-PCR 法により確認した。RT+:逆転写反応処理のサンプル、RT-:逆転写反応未処理のサンプル。gDNA: genomic DNA

Fig.6 プライマー伸長法による転写開始点の推定

A. 腫瘍細胞株 PANC-1, HepG2, SW480、及びヒト脳由来の Total RNA 10 μ g を鋳型に ATG コドン上流 697 塩基からのプライマーを用いてプライマー伸長法を行った。矢頭は約 110bp 付近の主要な産物を示す。B. ダイデオキシ法によるシーケンスを同時に行い、転写開始点の推定を行った。星印は転写開始点を示す。C. 詳細な転写開始点の位置を示した。

Fig.7 レポーターアッセイによる転写制御因子の探索

A. 新たに推定された転写開始点を+1 と置き、上流 3497 塩基、下流 788 塩基までを含むプロモーターコンストラクトを構築した。更に 9 つの欠失変異を用意して転写制御に関与する領域の同定をルシフェラーゼレポーターアッセイにより、

PANC-1, AsPC-1,及び MIA PaCa-2 の 3 種の細胞で行った。B. 減少が見られた -412 塩基から+248 塩基の領域を PANC-1 細胞を対照に更に 4 つの欠失変異を用いてレポーターアッセイを行うことで、制御領域の同定を行った。

Fig.8 腫瘍での ARK5 mRNA の転写に關与する候補因子

-412 塩基から+248 塩基までの配列及びデータベースで示された既知転写因子の結合モチーフを示す。レポーターアッセイから明らかになった候補因子の配列は黒塗りで示す。

Fig.9 肝癌細胞株 HepG2 で見られるグルコース飢餓による ARK5 mRNA の発現誘導

肝癌細胞株 4 種を低グルコース培地下で培養し、12 時間、24 時間後 RT-PCR により ARK5 mRNA の発現を確認した。SW はポジティブコントロールとして用いた SW480 のサンプルを示す。

Fig.10 ARK5 mRNA 発現誘導における mRNA の安定性の關与

A. RT-PCR 及びリアルタイム RT-PCR を行い、ARK5 mRNA 発現誘導の定量化を行った。B. グルコース飢餓条件下で完全長プロモーターコンストラクトを用いたレポーターアッセイを行い、転写による制御の確認を行った。C. 転写阻害剤 actinomycin D で細胞を処理し、グルコース飢餓条件、及び通常条件下で培養した細胞から得られた RNA をサンプルに RT-PCR を行った。

Table.1 PCR に用いたプライマーセット及び反応条件と配列

ARK5 mRNA の 5'末端領域の検討及び ARK5 プロモーターコンストラクトのクローニングに使用したプライマーセットの配列、反応条件を示した。

参考文献

1. Dang, C.V. and G.L. Semenza, *Oncogenic alterations of metabolism*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**(2): p. 68-72.
2. Helmlinger, G., et al., *Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation*. Nat Med, 1997. **3**(2): p. 177-82.
3. Sutherland, R.M., *Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model*. Science, 1988. **240**(4849): p. 177-84.
4. Folkman, J., *Proceedings: Tumor angiogenesis factor*. Cancer Res, 1974. **34**(8): p. 2109-13.
5. Folkman, J., *Can mosaic tumor vessels facilitate molecular diagnosis of cancer?* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(2): p. 398-400.
6. Esumi, H., et al., *Hypoxia and nitric oxide treatment confer tolerance to glucose starvation in a 5'-AMP-activated protein kinase-dependent manner*. J Biol Chem, 2002. **277**(36): p. 32791-8.
7. Bunn, H.F. and R.O. Poyton, *Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia*. Physiol Rev, 1996. **76**(3): p. 839-85.
8. Izuishi, K., et al., *Remarkable tolerance of tumor cells to nutrient deprivation: possible new biochemical target for cancer therapy*. Cancer Res, 2000. **60**(21): p. 6201-7.
9. Kato, K., et al., *Critical roles of AMP-activated protein kinase in constitutive tolerance of cancer cells to nutrient deprivation and tumor formation*. Oncogene, 2002. **21**(39): p. 6082-90.
10. Hashimoto, K., et al., *5-amino-4-imidazolecarboxamide riboside confers strong tolerance to glucose starvation in a 5'-AMP-activated protein kinase-dependent fashion*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **290**(1): p. 263-7.
11. Carling, D., et al., *Mammalian AMP-activated protein kinase is homologous to yeast and plant protein kinases involved in the regulation of carbon metabolism*. J Biol Chem, 1994. **269**(15): p. 11442-8.
12. Hardie, D.G. and D. Carling, *The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell?* Eur J Biochem, 1997. **246**(2): p. 259-73.
13. Corton, J.M., J.G. Gillespie, and D.G. Hardie, *Role of the AMP-activated protein kinase in the cellular stress response*. Curr Biol, 1994. **4**(4): p. 315-24.
14. da Silva Xavier, G., et al., *Role of AMP-activated protein kinase in the regulation by glucose of islet beta cell gene expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(8): p.

- 4023-8.
15. Bartoov-Shifman, R., et al., *Activation of the insulin gene promoter through a direct effect of hepatocyte nuclear factor 4 alpha*. J Biol Chem, 2002. **277**(29): p. 25914-9.
 16. Leclerc, I., et al., *Hepatocyte nuclear factor-4alpha involved in type 1 maturity-onset diabetes of the young is a novel target of AMP-activated protein kinase*. Diabetes, 2001. **50**(7): p. 1515-21.
 17. Cheng, S.W., et al., *Thr2446 is a novel mammalian target of rapamycin (mTOR) phosphorylation site regulated by nutrient status*. J Biol Chem, 2004. **279**(16): p. 15719-22.
 18. Mak, B.C. and R.S. Yeung, *The tuberous sclerosis complex genes in tumor development*. Cancer Invest, 2004. **22**(4): p. 588-603.
 19. Datta, S.R., A. Brunet, and M.E. Greenberg, *Cellular survival: a play in three Akts*. Genes Dev, 1999. **13**(22): p. 2905-27.
 20. Higuchi, M., et al., *Akt mediates Rac/Cdc42-regulated cell motility in growth factor-stimulated cells and in invasive PTEN knockout cells*. Curr Biol, 2001. **11**(24): p. 1958-62.
 21. Suzuki, A., et al., *ARK5 is a tumor invasion-associated factor downstream of Akt signaling*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(8): p. 3526-35.
 22. Suzuki, A., et al., *Identification of a novel protein kinase mediating Akt survival signaling to the ATM protein*. J Biol Chem, 2003. **278**(1): p. 48-53.
 23. Suzuki, A., et al., *ARK5 suppresses the cell death induced by nutrient starvation and death receptors via inhibition of caspase 8 activation, but not by chemotherapeutic agents or UV irradiation*. Oncogene, 2003. **22**(40): p. 6177-82.
 24. Suzuki, A., et al., *Regulation of caspase-6 and FLIP by the AMPK family member ARK5*. Oncogene, 2004. **23**(42): p. 7067-75.
 25. Kusakai, G., et al., *Strong association of ARK5 with tumor invasion and metastasis*. J Exp Clin Cancer Res, 2004. **23**(2): p. 263-8.
 26. Kusakai, G., et al., *ARK5 expression in colorectal cancer and its implications for tumor progression*. Am J Pathol, 2004. **164**(3): p. 987-95.
 27. Mashiyama, S., et al., *Detection of p53 gene mutations in human brain tumors by single-strand conformation polymorphism analysis of polymerase chain reaction products*. Oncogene, 1991. **6**(8): p. 1313-8.
 28. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
 29. Weisz, A., et al., *Dual mechanism for the control of inducible-type NO synthase gene*

- expression in macrophages during activation by interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. Transcriptional and post-transcriptional regulation. J Biol Chem*, 1994. **269**(11): p. 8324-33.
30. Elaichouni, A., et al., *Study of the influence of plasmids on the arbitrary primer polymerase chain reaction fingerprint of Escherichia coli strains. FEMS Microbiol Lett*, 1994. **115**(2-3): p. 335-9.
 31. Dynan, W.S. and R. Tjian, *Isolation of transcription factors that discriminate between different promoters recognized by RNA polymerase II. Cell*, 1983. **32**(3): p. 669-80.
 32. Nagase, T., et al., *Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. IX. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro. DNA Res*, 1998. **5**(1): p. 31-9.
 33. Samson, S.L. and N.C. Wong, *Role of Sp1 in insulin regulation of gene expression. J Mol Endocrinol*, 2002. **29**(3): p. 265-79.
 34. Shaulian, E. and M. Karin, *AP-1 as a regulator of cell life and death. Nat Cell Biol*, 2002. **4**(5): p. E131-6.
 35. Attwooll, C., E.L. Denchi, and K. Helin, *The E2F family: specific functions and overlapping interests. Embo J*, 2004. **23**(24): p. 4709-16.
 36. Mitani, K., *Molecular mechanisms of leukemogenesis by AML1/EVI-1. Oncogene*, 2004. **23**(24): p. 4263-9.
 37. Shim, J. and M. Karin, *The control of mRNA stability in response to extracellular stimuli. Mol Cells*, 2002. **14**(3): p. 323-31.
 38. Nakao, M., *Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. Gene*, 2001. **278**(1-2): p. 25-31.
 39. Cameron, E.R. and J.C. Neil, *The Runx genes: lineage-specific oncogenes and tumor suppressors. Oncogene*, 2004. **23**(24): p. 4308-14.
 40. Ito, Y., *Oncogenic potential of the RUNX gene family: 'overview'. Oncogene*, 2004. **23**(24): p. 4198-208.
 41. Miyazono, K., S. Maeda, and T. Imamura, *Coordinate regulation of cell growth and differentiation by TGF-beta superfamily and Runx proteins. Oncogene*, 2004. **23**(24): p. 4232-7.
 42. Elagib, K.E., et al., *RUNX1 and GATA-1 coexpression and cooperation in megakaryocytic differentiation. Blood*, 2003. **101**(11): p. 4333-41.
 43. Kim, S.J., et al., *Activation of the second promoter of the transforming growth factor-beta 1 gene by transforming growth factor-beta 1 and phorbol ester occurs through the same target sequences. J Biol Chem*, 1989. **264**(32): p. 19373-8.

44. Bae, H.W., et al., *Characterization of the promoter region of the human transforming growth factor-beta type II receptor gene*. J Biol Chem, 1995. **270**(49): p. 29460-8.
45. Morris, B.J., et al., *cAMP controls human renin mRNA stability via specific RNA-binding proteins*. Acta Physiol Scand, 2004. **181**(4): p. 369-73.
46. Ashe, M.P., S.K. De Long, and A.B. Sachs, *Glucose depletion rapidly inhibits translation initiation in yeast*. Mol Biol Cell, 2000. **11**(3): p. 833-48.
47. Paschen, W., *Shutdown of translation: lethal or protective? Unfolded protein response versus apoptosis*. J Cereb Blood Flow Metab, 2003. **23**(7): p. 773-9.
48. Levy, A.P., *Hypoxic Regulation of VEGF mRNA Stability by RNA-binding Proteins*. Trends Cardiovasc Med, 1998. **8**(6): p. 246-50.
49. Calkhoven, C.F., C. Muller, and A. Leutz, *Translational control of gene expression and disease*. Trends Mol Med, 2002. **8**(12): p. 577-83.
50. Burger, A.M. and A.K. Seth, *The ubiquitin-mediated protein degradation pathway in cancer: therapeutic implications*. Eur J Cancer, 2004. **40**(15): p. 2217-29.
51. Hardie, D.G., *Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status*. Endocrinology, 2003. **144**(12): p. 5179-83.
52. 鈴木敦、日下生玄一、呂杰、小倉勤、江角浩安 ; 「新しい AMPK ファミリー-ARK5 の癌転移への影響」日本臨床 2003. **61**(8);p. 219-223