

学位論文

細胞外グルコース濃度感知機構の解明

大和田 賢

目次

略号	4
第一章 序論	5
1-1 糖の代謝	
① 解糖系	
② ペントースリン酸回路	
③ その他のヘキソースの代謝	
1-2 細胞外グルコース濃度の感じ方	
1-3 がん組織の低酸素・低栄養	
1-4 がん細胞のエネルギー産生の特徴	
1-5 グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化	
1-6 本研究の目的	
1-7 参考図	
第二章 実験材料と実験方法	18
2-1 細胞培養と各種培地	
2-2 試薬	
2-3 細胞抽出液の作製	

2-4 SDS-PSGE

2-5 イムノブロット

2-6 siRNA トランスフェクション

2-7 siRNA 溶液の調製

2-8 RT-PCR

2-9 細胞内過酸化水素の測定

第三章 結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 24

3-1 グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化

3-2 細胞外グルコース濃度が及ぼす AKT リン酸化への影響

3-3 グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化に及ぼす 2-deoxyglucose
への影響

3-4 グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化に及ぼすヘキソースの影
響

3-5 グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化に及ぼす AICAR の影響

3-6 グルコース欠乏下で増大する細胞内過酸化水素

3-7 グルコース欠乏により増加する細胞内過酸化水素に及ぼすヘキソースの
影響

3-8 グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化に及ぼす SRC 及び OSSA
の影響

3-9 グルコース欠乏により増加する細胞内過酸化水素に及ぼす NOX の寄与

3-10 図

第四章 考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 51

4-1 細胞外グルコース濃度に応じた AKT リン酸化の意義

4-2 グルコース代謝産物の増減による AKT リン酸化の制御

4-3 活性酸素シグナルの伝わり方

4-4 グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化の生理的意義

4-5 NOX4 の制御機構

総括・・ 67

謝辞・・ 68

参考文献・・ 69

2-DG : 2-deoxyglucose

ACC : acetyl-CoA carboxylase

AICAR : 5-amino-1-β-D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide

AMPK : AMP-activated protein kinase

BES-H₂O₂ : 3'-O-Acetyl-6'-O-pentafluorobenzenesulfonyl-2',7'-difluorofluorescein

DCFDA : dichlorofluorescein diacetate

SOD : superoxide dismutase

mTORC2 : mammalian target of rapamycin 2

NAC : N-acetylcysteine

NOX4 : NADPH oxidase 4

NOX5 : NADPH oxidase5

OSSA : Oxidative-stress associated SRC activator

PDK1 : phosphoinositide-dependent kinase 1

PI3K : phosphoinositide-3 kinase

第一章 序論

1-1 糖の代謝

① 解糖系

グルコースは細胞内に取り込まれると代謝を受ける。解糖では酵素が触媒する 10 段階の反応を経て、グルコースはピルビン酸へと代謝される (参考図 1)。解糖を構成する 10 の反応はヘキソース段階とトリオース段階に大別できる。解糖のヘキソース段階の第 1 反応はヘキソキナーゼによる ATP からグルコースへのリン酸基転移反応で、グルコース-6-リン酸 (G6P) ができる。細胞膜は電荷をもつ分子を通さないため、このリン酸化はグルコースを細胞内にとどめておくのに役立つ。第 2 反応でグルコース-6-リン酸イソメラーゼ (PGI) により G6P はフルクトース-6-リン酸 (F6P) へ変換される。第 3 反応では 6-ホスホフルクト-1-キナーゼ (PFK) の触媒で ATP を使って F6P をリン酸化、フルクトース 1,6-ビスリン酸 (F1,6P) が生じる。第 4 反応ではアルドラーゼにより F1,6P が切断されグリセルアルデヒド 3-リン酸 (GAP) とジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) が生じる。解糖経路では GAP のみが先の反応に進むが、DHAP と GAP はケトース - アルドースという異性体の関係である。第 5 反応では DHAP と GAP はトリオースリン酸イソメラーゼにより異性化される。解糖のヘキソース段階では、グルコース 1 分子あたり 2 分子の ATP が ADP に変換される。続いて、解糖のトリオース段階で GAP は 5 段階の反応を経てピルビン酸へと代謝される。この過程で 4 分子の ATP が

ADP から作られる。したがって解糖では 1 分子のグルコースあたり 2 分子の ATP が生成される。また、解糖系の最終産物であるピルビン酸はアセチル CoA に代謝されたのち、ミトコンドリアで TCA サイクルに入る。この過程ではグルコース 1 分子から 36 分子の ATP が産生される (Boiteux, A, 1981 ; Erlandsen, H, 2000)。

② ペントースリン酸回路

G6P に変換されたグルコースはペントースリン酸回路に入ることも知られている。この経路の主な役割は NADPH の生産とリボース 5-リン酸 (R5P) の生成である。R5P は、RNA, DNA, ある種の補酵素などの成分となるリボヌクレオチドそれらの誘導体の生合成に必要である。NADPH は還元的な生合成反応で使われるピリジンヌクレオチド補酵素である。脂肪酸やステロイドを合成するためには多量の NADPH が必要である。このため、肝臓や脂肪組織ではペントースリン酸回路が活発に働くことが知られている。

ペントースリン酸回路の代謝経路を参考図 2 に示す。ペントースリン酸回路は酸化的段階と非酸化的段階に分けられる。酸化的段階では G6P がリブローズ 5-リン酸 (Ru5P) を経て 5 炭素の化合物である R5P あるいはキシルロース-5-リン酸 (Xu-5P) に変換される。その過程で NADPH が作られる。NADPH とヌクレオチドが多量に必要なときは、Ru-5P は R-5P に異性化される。通常は、R-5P より NADPH のほうが細胞にとって必要であるため、ほとんどのペントースリン酸回路の中間代謝物は Xu-5P を経て、解糖

系の中間体 (F6P, GAP) に変換される。酸化段階で余分に作られた代謝物を解糖系に導いて処理する反応がペントースリン酸回路の非酸化的段階である(C hayen, J, 1986 ; Kresge, N, 2005)。

③ その他のヘキソースの代謝

ガラクトースはグルコースと C4 の立体配置だけが異なるエピマーである。ガラクトースの代謝経路を参考図 3 に示す。ヘキソキナーゼはグルコースやフルクトースをリン酸化するが、ガラクトースには作用しない。ガラクトースは、ガラクトキナーゼにより C1 に ATP のリン酸基を付加され、ガラクトース 1-リン酸になる。ガラクトース-1 リン酸ウリジルトランスフェラーゼにより UDP グルコースのウリジル基がガラクトース 1-リン酸に移ると、UDP ガラクトースとグルコース 1-リン酸 (G1P) が生じる。G1P はホスホグルコムターゼにより G6P に変換され、解糖系に合流する (Elsas, L. J, 1998)。

フルクトースはヘキソキナーゼによりリン酸化され F6P になり直接解糖系に入る (参考図 3B)。

1-2 細胞外グルコース濃度感知機構

グルコースは上述のように主要なエネルギー源である ATP 産生に重要な役割を果たすだけでなく、細胞分裂時に核酸、タンパク質、脂質、糖の合成が行われる時の主要な炭素源ともなる。そのため細胞には、細胞外グルコース濃度を感知する様々な機構が存在する。

出芽酵母は、Snf3 や Rgt2 を用いて、細胞外グルコース濃度を感知することが知られている。これらの分子のアミノ酸配列は、哺乳動物細胞におけるグルコーストランスポーター (Glut) と相同性が高いが、トランスポート活性は持たない。しかしこれらの分子によってグルコーストランスポーターの発現が細胞外グルコース濃度依存的に制御されている。細胞外グルコース濃度が高まると Rgt2 が細胞膜上のカゼインキナーゼ (Yck1 及び Yck2) を活性化し、介在分子である Mth1/Std1 のリン酸化を行い、グルコーストランスポーター1 (HXT1) の発現を誘導する。一方、細胞外グルコース濃度が低下すると Snf3 を介して複数のグルコーストランスポーターの発現が誘導され、細胞内にグルコースが取り込まれる (Flick KM, 2003 ; Kim JH, 2003 ; Ozcan S, 1999)。酵母では、解糖系の第 1 反応を司るヘキソキナーゼにより、細胞外グルコース濃度の感知をすることが報告されている (Rolland, F, 2001)。また、酵母同様、植物でもヘキソキナーゼがグルコースセンサーとして働くことが報告されている (Cho, J.-I, 2009)。

一方、哺乳動物細胞における細胞外グルコース濃度感知機構についてもいくつかの知

見がある。すい臓の β 細胞は、グルコース量に応じてインスリンを分泌する。そのメカニズムは、細胞内に取り込んだグルコースから産生される ATP によって細胞膜の ATP 感受性 K^+ チャンネルが閉鎖され、それによる脱分極で電位依存性 Ca^{2+} チャンネルが開きインスリンの分泌が起こるものである (Inagaki, N, 1995 ; Bratanova-Tochkova, T. K, 2002)。したがって、この場合はグルコースそのものというより、少なくとも細胞内グルコースの増加の結果生み出される ATP によって細胞外グルコース濃度の情報が伝えられているとも考えられる。この観点から、細胞外グルコース濃度感知に関わる因子としてや AMPK (AMP activated protein kinase) が知られている。AMPK は細胞内のエネルギー変化を ATP : AMP 比として感知し、AMP の濃度が高くなることにより活性化される (Hardie, D. G, 2004)。活性化された AMPK は糖や脂質の代謝を促進することで ATP の生産を促し、細胞内のエネルギーバランスをコントロールすることが知られている (Carling, D, 2004)。

1-3 がん組織の低酸素・低栄養

進行固型がん組織の多くでは腫瘍血管の新生が認められるが、これらの血管は機能的に未熟であり、またしばしば無秩序ながん細胞の増殖のため解剖学的にも不十分な血管網となる (Jain, R. K, 2003 ; Thomlinson, R. H, 1955 ; Less, J. R, 1991 ; Brown, J. M, 1998)。特に膵がんは組織中に機能的な血管が乏しいことがよく知られている。このような正常に機能しない血管網では、組織を構成する細胞に酸素・栄養を供給する血流が十分に行き渡らず、結果としてがん細胞は慢性的な低酸素・低栄養環境に曝露されることとなる。実際に、がん組織には低酸素領域が存在することが知られている。いくつかのがん種において組織の酸素分圧を実測した報告では、非がん組織の平均酸素分圧は24-66 mmHg であるが、がん組織での平均酸素分圧は10-30 mmHgとなっている。このようながんの典型例として大腸がんや膵がんが挙げられる。事実、膵がんにいたっては、非がん組織の酸素分圧 51.6 mmHgに対し腫瘍酸素濃度は僅か2.7 mmHgであった (Brown, J. M, 2004)。一方、腫瘍組織が低栄養環境にあることも実証されている。大腸がん組織中のグルコース濃度は周辺のがん組織に比べ1/10倍程度であるとの報告がある (Hirayama, A, 2009)。このように、腫瘍部は極めて低酸素・低栄養な環境に曝露されていることが実測のデータから示された。細胞が必要なエネルギー源であるATPを産生する代表的な代謝経路として解糖系と酸化的リン酸化がある。解糖系の基質となるグルコース、酸化的リン酸化で電子伝達の最終受容体となる酸素がいずれも乏しいがん組織の微小環境は細胞の生存に極めて不適な環境といえる。

1-4 がん細胞のエネルギー産生の特徴

血流が乏しく低酸素・低栄養環境に曝されるがん細胞は代謝系を変化させてこうした環境で生き残るための適応反応をとっていると考えられる。分化した組織の細胞は、好气的条件では解糖系で2分子のATPと酸化的リン酸化によって36分子のATPが、1分子のグルコースから産生される。Louis Pasteur は、グルコース代謝が酸素存在下で減少することを見出した。多くの細胞では、酸素の存在により解糖系に関わる酵素の活性が抑制され、ミトコンドリアを介する酸化的リン酸化が可能となる。この酸素による解糖系の抑制は、パスツール効果と呼ばれる (Racker, E, 1974)。嫌气的条件では、酸素に依存した酸化的リン酸化によるエネルギー産生ができなくなり、グルコースをピルビン酸まで分解し、さらに乳酸に変える嫌气的解糖によってエネルギーを産生する (Gatenby, R. A, 2004)。一方、Otto Warburg により、増殖が盛んな細胞及びがん細胞は、酸素の存在下でさえもそのエネルギー産生の多くを解糖系に依存していると報告された (Warburg, O, 1956)。がん細胞の好气的解糖系によるエネルギー産生は、ワールブルグ効果と呼ばれる。しかしながら、上記の通り実際のがん微小環境では、嫌气的解糖をおこなうための基質となるグルコースが慢性的に不足している。強い血流不足に曝されながら発生し、かつ悪性化してきたがんは、嫌气的解糖の活性化により低酸素下を生き延びるという考え方では説明がつかない生物学的特性があると考えられ、この現象は『austerity (栄養飢餓耐性)』と定義された (Izuishi, K, 2000)。

1-5 グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化

これまでに、当研究室では、すい臓がん細胞株や肝臓がん細胞株など多くのがん細胞株において、培地中のグルコースを除去することによりAKTのリン酸化 (Ser473) が速やかに誘導されることを報告してきた (Esumi, H, 2004 ; Izuishi, K, 2000)。セリン/トレオニンキナーゼ AKTはレトロウィルスのがん遺伝子産物 v-AKT の細胞内相同因子である。多くの報告から、増殖因子やサイトカインがAKT 経路の活性化を介して細胞の増殖や生存を促進することが示されている (Cantley, L. C, 2002 ; Franke, T. F, 1997 ; Burgering, B. M. T, 1995)。増殖因子やサイトカインが受容体に結合すると、下流のPI3K (phosphoinositide 3-kinase) は活性化され細胞膜近傍に存在するphosphoinositide の3位をリン酸化する。これにより産生された phosphatidylinositol (3,4,5)-triphosphate (PIP3) と AKT のpleckstrin homology (PH) domain との相互作用によって、AKT は細胞膜に移行し、AKT の上流のキナーゼである 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1)によってThr308 が (Alessi D. R, 1996)、 mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) によって Ser 473 がリン酸化されて活性化する (Sarbasov, D. D, 2005 ; Jacinto, E, 2006)。これまでに、グルコース欠乏により誘導されるAKTリン酸化も、PI3K阻害剤による減弱が認められることから、PI3Kに依存していることが示されている (Izuishi K, 2000)。また、すい臓がん細胞株PANC-1はグルコ

ース欠乏下でも生存する (栄養飢餓耐性) が、このメカニズムの一部にAKTの活性化が寄与することも報告されている (Izuishi, K, 2000)。AMPK-related kinase (AMPK-RK) に属するARK5は、AMPK family の中で唯一 AKT により制御されている (Suzuki, A, 2004b)。グルコース欠乏に耐性を示さない肝がん細胞株 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 の活性化を伴う細胞周期の遅延がグルコース飢餓により引き起こされる可能性が示された (Suzuki, A, 2003a)。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 の阻害剤である FLIP の分解を遅延し、Caspase-8 の活性化を阻害することにより、細胞死の抑制に寄与していることが明らかになり、ARK5 が AKT の制御下で栄養飢餓耐性の誘導に関与していることが示されている (Suzuki, A, 2004a ; Suzuki, A, 2003b)。

また、AKT は紫外線照射、熱ショック、低酸素、酸化ストレスなど種々の細胞ストレスに反応し、活性化し細胞の生存に寄与することも報告されている (Alvarez-Tejado, M, 2002 ; Bang, O. S, 2000 ; Esposito, F, 2003 ; Nomura, M, 2001)。

1-6 本研究の目的

上述のように、栄養が適切に供給されることは、細胞のエネルギー産生、増殖、生存において非常に重要である。特になん細胞の多くは、その ATP の産生をエネルギー効率の悪い解糖系に依存しており、グルコースへの依存度が高いそのため、細胞には細胞外グルコース濃度に応答する様々な適応機構が十分に用意されていると考えられる。本研究では、グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化を指標とし、不明な点が多く残されている細胞外グルコース濃度感知機構の解明に取り組んだ。

ヘキソース段階

グルコース

↓ 1 **ヘキソキナーゼ**

G6P

↑↓ 2 **グルコース-6-リン酸イソメラーゼ**

F6P

↓ 3 **ホスホフルクト-1-キナーゼ**

F1,6P

↑↓ 4 **アルドラーゼ**

+

DHAP ⇌ GAP

5 **トリオースリン酸イソメラーゼ**

↑↓ 6 **グリセルアルデヒド3-リン酸
デヒドロゲナーゼ**

1,3-ビスホスホグリセリン酸 (1,3-BPG)

↑↓ 7 **ホスホグリセリン酸キナーゼ**

3-ホスホグリセリン酸 (3-BPG)

↑↓ 8 **ホスホグリセリン酸ムターゼ**

2-ホスホグリセリン酸 (2-BPG)

↑↓ 9 **エノラーゼ**

ホスホエノールピルビン酸

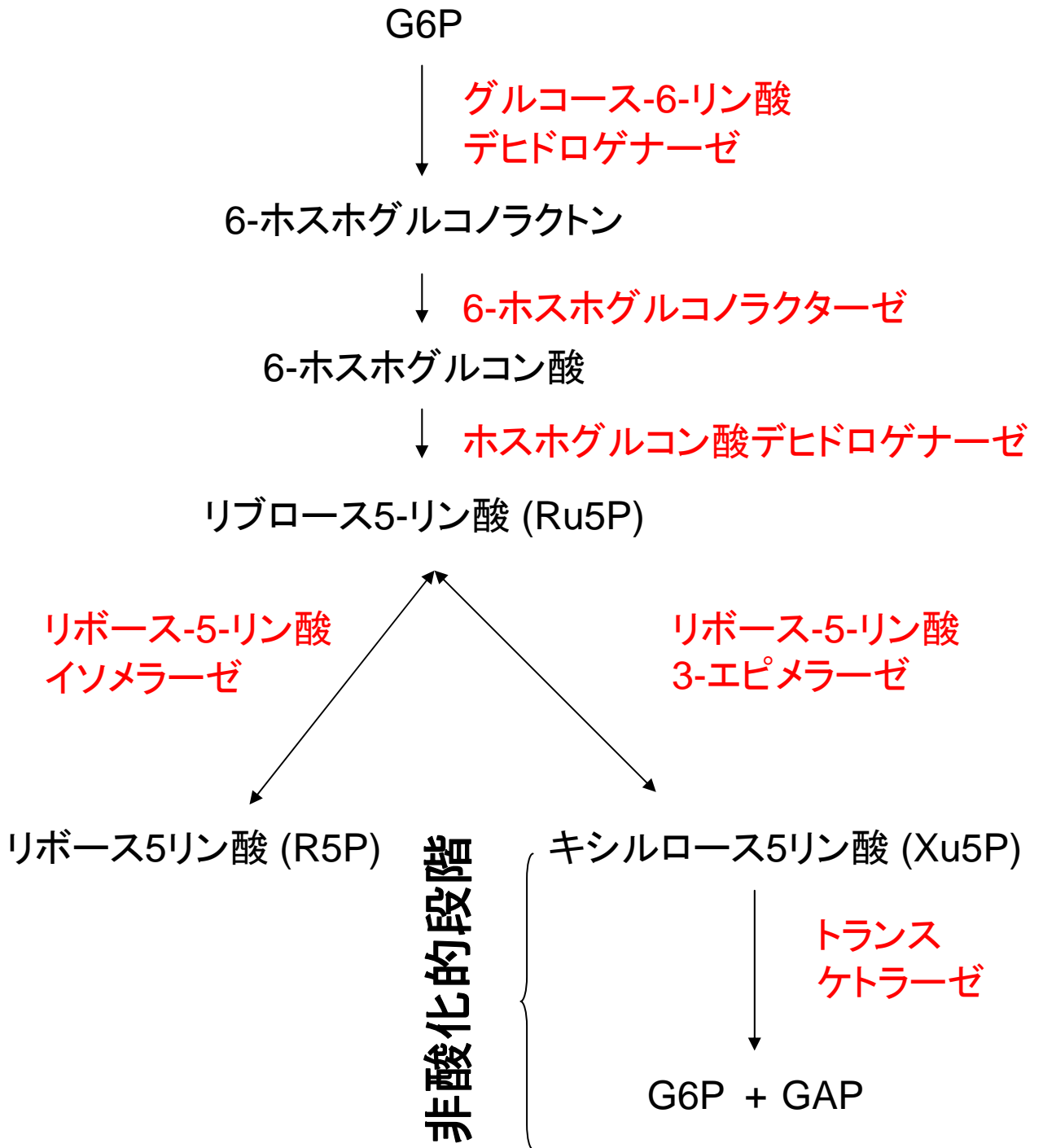
↓ 10 **ピルビン酸キナーゼ**

ピルビン酸

トリオース段階

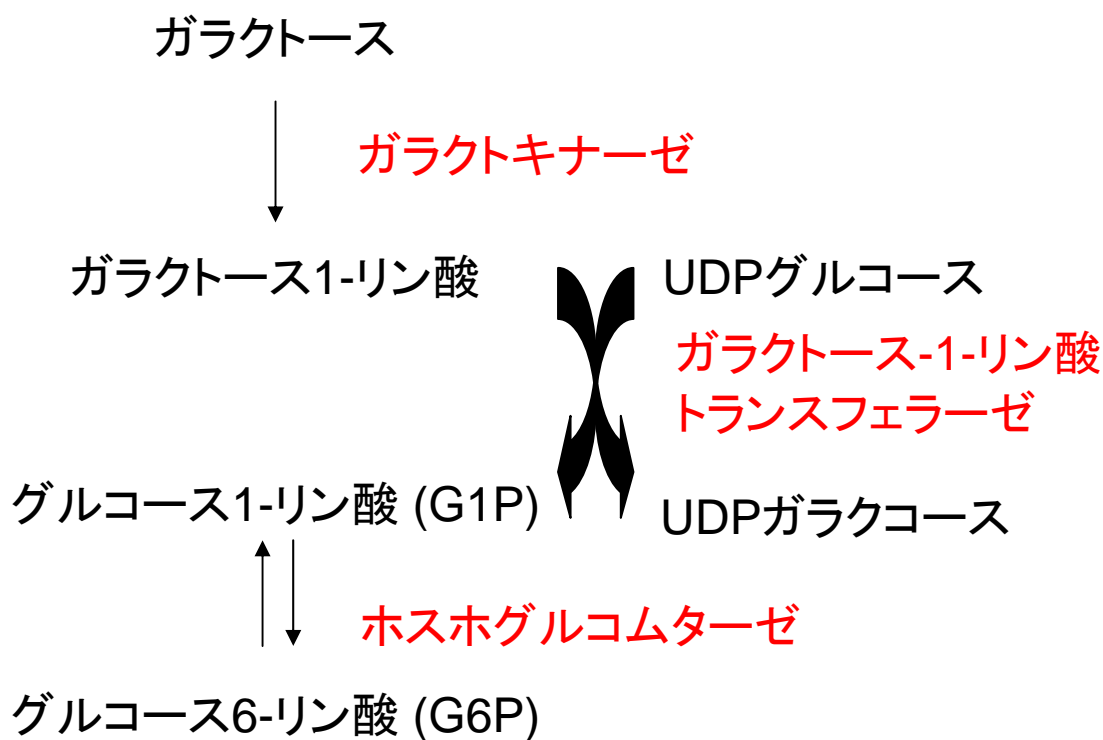
参考図1 解糖系

酸化段階

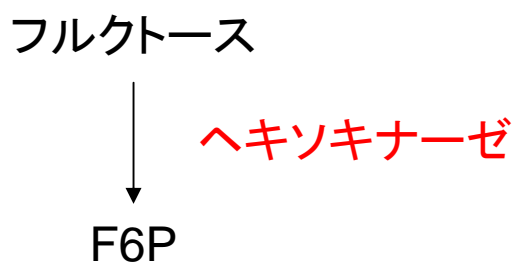


参考図2 ペントースリン酸回路

(A)



(B)



参考図3 (A) ガラクトース代謝 (B) フルクトース代謝

第二章 実験材料と実験手法

2-1 細胞培養と各種培地

本研究では、膵臓がん細胞株 PANC1、肝臓がん細胞株 HepG2、ヒト正常胃の漿膜由来線維芽細胞を用いた。ヒト正常胃の漿膜由来線維芽細胞は国立がん研究センター東病院臨床開発センター臨床腫瘍病理部の落合淳志博士より供与を受けた。PANC-1、HepG2 は ATCC (American Type Culture Collection) から購入した。各細胞は 1×MEM non-essential amino acid solution (Sigma), 1×Antibiotic antimycotic solution (Sigma), 10% Fetal bovine serum (Cell Culture Technologies)、3.7g/L sodium hydrogen carbonate、25 mM HEPES-KOH (pH 7.4) を Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies) に加え調製した培地を用いた。培地は 3-4 日ごとに交換し、コンフルエントに達する前に継代した。培養器内は常に 37°C、CO₂ 濃度 5%、大気 95%、湿度 100% に保った。

各細胞をグルコース欠乏条件で培養する際は、1×MEM non-essential amino acid solution (Sigma), 1×antibiotic antimycotic solution, 4 mM L-glutamine (Sigma), 10% fetal bovine serum を DMEM-base (Sigma) に加え調製した培地で培養し、血清はセルロース膜により PBS (8 g/L NaCl, 1.15g/L Na₂HPO₄, 0.2g/L KCl, 0.2g/L KH₂PO₄) で 72 時

間透析した後、試験紙によりグルコースが除去されたことを確認した後使用した。培養器内は常に 37°C、CO₂ 濃度 5%、大気 95%、湿度 100% に保った。

2-2 試薬

3'-O-Acetyl-6'-O-pentafluorobenzenesulfonyl-2',7'-difluorofluorescein (BES-H₂O₂) は Wako より購入した。PP2 (CalbioChem), LY294002 (CalbioChem) は Dimethylsulfoxide (DMSO、Wako) に溶解して 5 mM のストック溶液とした。5-amino-1-β-D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide (AICAR, Enzo Life sciences) は DMSO に溶解して、500 mM のストック溶液とした。グルコース、フルクトース、ガラクトース、2-deoxyglucose (2-DG)、N-acetylcysteine (NAC) は Sigma より購入した。dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) は Invitrogen から購入した。

OSSA、NOX4、NOX5 SiRNA は Life Technologies から購入した。ウェスタンブロットに使用した一次抗体は、Anti-total Akt、Anti-phosphospecific Akt (Ser473)、Anti-total SRC、Anti-phospho SRC (Y416)、Anti-ACC、Anti-phospho (Ser 79)を用い、すべて Cell signaling Technology から購入した。Anti-OSSA は国立がん研究センター研究所 分子標的グループ転移浸潤シグナル研究分野 堺隆一博士から供与を受けた。Anti Actin (C-11) は Santa Cruz Biotechnology から購入した。二次抗体、Goat antimouse IgG-HRP、Goat antirabbit IgG-HRP、Donkey antigoat IgG-HRP は Santa Cruz から購

入した。

2-3 細胞抽出液の作製

タンパクの解析に用いる細胞を PBS で 2 回洗浄した後、細胞溶解 buffer (10% SDS、100 mM Tris-HCl (pH7.4)、10 mM Na₃VO₄)を添加し、セルスクレーパーで細胞を集めた。酵素を失活させるため、100°C、7 分間インキュベーションした後、超音波細胞破壊機 (ASTRASON) で出力 5%、10 秒程度超音波処理したものを室温、15000 rpm、10 分間遠心を行い、その上清をサンプルとして使用した。BSA 1 mg/mL 溶液を標準液とし、BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて各サンプルのタンパク質濃度を定量した。

2-4 SDS-PAGE

サンプルに 6 × SDS gel loading buffer (750 mM Tris-HCl (pH6.8)、12% SDS、30% Sucrose、0.006% Bromophenol、30% Mercapto ethanol) を加え、100°C、3 分間加熱した。SDS-PAGE バッファー(3 g/L Tris、18.8 g/L Glycine) を適量満たした泳動装置に 6-12% SDS-ポリアクリルアミドゲルをセットした後、サンプルをタンパク質濃度が一定になるよう添加した。マーカー (Bio-Rad Laboratories) は 5 µL 添加した。電気泳動は、定電圧 110 V で 90 分行った。

2-5 イムノブロット法

泳動後、ゲルを Transfer buffer (3 g/L Tris、14.3 g/L Glycine、20% MeOH) 中で 30 分振とうさせた。Immobilon-P トランスファーメンブレン (Millipore) は親水化のため MeOH 中で 15 分間、Transfer buffer 中で 15 分間振とうした。セミドライブロットティング装置 (ATTO) を用い、 $0.8\text{mA}/\text{cm}^2$ で 75 分、転写を行った。転写後、ブロッキング液 (5% BSA in TTBS (0.05 M Tris HCl (pH7.5)、9g/L NaCl、0.1% Tween20)) に浸し、室温で 1 時間振とうした。抗体との反応は 4°C で一晩振とうしながら行った。TTBS で 20 分間×3 回振とうした後、それぞれの二次抗体をブロッキング液で 2000 倍希釈し室温で 90 分、振とうしながら反応させた。TTBS で 20 分間×3 回振とうした後、ECL-western blotting detection reagent (GE Healthcare Bioscience) を用いて現像し、バンドを検出した。

2-6 siRNA トランスフェクション

血清を含まない DMEM 培地を用いて、PANC-1 細胞を 1×10^6 cells ずつ 100 mm ディッシュにまき、 37°C 、95%大気、5% CO_2 で 24 時間培養した。siRNA 溶液を最終濃度 100 nM となるように Opti-MEM (Invitrogen)にくわえ、 37°C 、95%大気、5% CO_2 で 24 時間培養した後、血清入りの DMEM 培地に置換した。siRNA によるノックダウン

効率は、ウェスタンブロット法もしくは RT-PCR 法にて確認した。

2-7 siRNA 溶液の調製

siRNA 10 nmol をスピンドウンし、RNase-free water 500 L に溶解し、20 M 溶液を保存液とした。Opti-MEM 培地に各 Lipofectamine 2000 reagent を混合して、室温に 5 分間放置した。別のチューブに用意しておいた Opti-MEM 培地と各 siRNA を混合した siRNA 溶液と、Lipofectamine 2000 reagent 溶液を混合し、室温に 20 分間静置し、培養プレートに添加した。siRNA の最終濃度を 100 nM とした。24 時間後に、血清を含む DMEM に置換した。

2-8 RT-PCR

トータル RNA は Isogen (Nippon Gene) を用いて抽出し、Nano Drop 2000 分光光度計 (Thermo Fisher Scientific) によって定量した。等量の RNA に対し、First-Strand cDNA synthesis kit (GE healthcare) をもちいて、cDNA を合成した。RT-PCR のプライマー配列は以下のものとした。NOX4 のプライマーは forward
5'-CTCAGCGGAATCAATCAGCTGTG-3' reverse
5'-AGAGGAACACGACAATCAGCCTTAG-3' とした。NOX5 のプライマー配列は
forward 5'-ATCAAGCGGCCCCCTTTTTTTCAC-3' reverse

5'-CTCATTGTCACACTCCTCGACAGC-3' とした。PCR 産物は臭化エチジウムで染色後、E-graph (ATTO) を用いて検出した。

2-9 細胞内過酸化水素の測定

細胞をグルコース含有培地もしくはグルコース欠乏培地で 30 分処理した。そのとき BES-H₂O₂ プローブを終濃度 5 μM 添加した。以降の操作は遮光条件で行った。培地除去後 PBS で二回洗い、トリプシン/EDTA solution (Sigma) を用いて細胞を培養ディッシュから剥がした。細胞をチューブに移し、4°C 200×g で遠心した。細胞のペレットを PBS で二回洗った後、PBS で懸濁し 5.0ml チューブ (BD Falcon) に移した。細胞懸濁液中の蛍光プローブの蛍光強度は直ちに励起波長 488nm のアルゴンイオンレーザーを搭載した FACScanto II (Becton Dickinson) を用いて測定した。発光波長は 530 nm に定めた。1 サンプルあたり 10,000 個の細胞を測定し、細胞 1 個当たりの蛍光強度の mean 値を Cell Quest プログラム (Becton Dickinson) により算出した。

第三章 結果

3-1 グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化

グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化 (Ser 473) を検出するため、イムノブロット法を用いた。肝臓がん細胞株 HepG2 において、培地中のグルコースを除去すると AKT リン酸化 (Ser 473) の増加が 30 分から観察され、3 時間まで維持された。この時 PI3K の ATP 結合部位を競合阻害する LY294002 (Smith, L. K, 1995) を添加することにより、グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化 (Ser 473) は全時間経過で抑制された (図 1A)。また、すい臓がん細胞株 PANC-1 においても、グルコース欠乏により AKT リン酸化が亢進され、LY294002 処理により抑制された (図 1B)。グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化 (Ser 473) が PI3K 依存であることが、本実験系でも観察された。グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化が、がん細胞以外でもおこる反応であるか検討するため、ヒト正常漿膜由来の線維芽細胞を用いた。線維芽細胞でも、培地中のグルコースを除くと AKT リン酸化 (Ser 473) の亢進が 30 分で観察された (図 2)。

3-2 細胞外グルコース濃度が及ぼす AKT リン酸化への影響

グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化 (Ser 473) は、どの程度の細胞外グルコース濃度域で観察されるのか検討した。健常成人の血中グルコース濃度 (血糖値) は、5.5 mM である。HepG2 細胞では、培地中のグルコース濃度が血糖値の四分の一である 1.38 mM 以下で AKT リン酸化 (Ser 473) の増加が観察された (図 3A)。また PANC-1 細胞では、0.69 mM 以下で AKT リン酸化 (Ser 473) の増加が観察された (図 3B)。ヒト手術検体を用いた大腸及び胃の非がん部を用いた測定結果によれば、グルコース濃度はそれぞれ平均 1.22 mM, 1.29 mM と報告されている (Hirayama, A, 2009)。以上のことより、グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化 (Ser 473) は通常の組織中のグルコース濃度の範囲内で起こることから、生理的反応として起こりうることが示唆された。

3-3 グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化に及ぼす 2-deoxyglucose の影響

序論で述べたように、酵母はグルコースキャリアホモログを用いて、細胞外グルコース濃度感知を行っている (Flick KM, 2003 ; Kim JH, 2003 ; Ozcan S, 1999)。また、細胞外グルコース濃度感知に解糖系の第一段階を介在するヘキソキナーゼ (HK) の関与が酵母や植物細胞で報告されている。グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化 (Ser 473) に、グルコーストランスポーター及びヘキソキナーゼが関わっているか検討するため、グルコースアナログである 2-deoxyglucose (2-DG) (Crane RK, 1954 ; Tower DB, 1958)を用いた。グルコース同様、2-deoxyglucose はグルコーストランスポーターのよい基質となり、細胞内に取り込まれると 2-deoxyglucose 6 phosphate (2-DG6P) に代謝され細胞内にとどまるものの、以降の解糖系のステップには進めない。またペントースリン酸回路では、6-phospho-2-deoxygluconate (6P-2-DG) まで代謝されるが、以降のステップには進めない (参考図 4)。グルコース欠乏培地に 2-deoxyglucose を添加しても、HepG2 細胞、PANC-1 細胞共に AKT リン酸化 (Ser 473) の亢進は減弱しなかった。このことより、グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化 (Ser 473) には、グルコーストランスポーター及びヘキソキナーゼによるグルコース分子の認識は関係しないことが考えられた。さらに、グルコース存在下でも 2-deoxyglucose 添加で、AKT リン酸化 (Ser 473) は増加した (図 4A,B)。先に述べたがように、2-deoxyglucose

は解糖系及びペントースリン酸回路の途中まで代謝され、グルコースの代謝をむしろ阻害することが知られている。したがって、グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化 (Ser 473) は、G6P 以降の解糖系もしくはペントースリン酸回路の中間代謝産物の増減を認識することにより制御されている可能性が考えられた。

3-4 グルコース欠乏に誘導される AKT リン酸化に及ぼすヘキソースの影響

3-3 の結果より、グルコース代謝の flux を正常に戻せばグルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化 (Ser 473) は抑制されるのではないかと考えた。フルクトースは F6P から、ガラクトースは G6P から解糖系に合流する (参考図 5)。ガラクトース及びフルクトースを培地中に添加し、グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化に対する影響をイムノブロット法で確認した。HepG2 細胞、PANC-1 細胞共にガラクトース、フルクトース添加により、グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化 (Ser 473) は抑制された (図 5A,B)。このことより、グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化 (Ser 473) は、グルコースそのものの有無を認識して惹起される反応ではなく、解糖系もしくはペントースリン酸回路の中間代謝産物の増減を認識することにより制御されていることが、より強く示唆された。

3-5 グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化に及ぼす AICAR の影響

哺乳動物細胞では細胞外グルコース濃度感知に関わる因子として AMPK が挙げられる。そこでグルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化に、AMPK が寄与するか検討するため、AMPK の活性化剤である AICAR (Stefanelli, C, 1998) を用いた。PANC-1 細胞において、AICAR 処理により AMPK の直下の脂肪酸やコレステロールの合成をつかさどる ACC (acetyl-CoA carboxylase) (Ha, J. 1994) のリン酸化 (Ser 79) が亢進されることを確認した。しかし、培地中のグルコースの有無に関わらず、AICAR 添加で AKT のリン酸化に変化は認められなかった (図 6)。このことより、グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化は、AMPK からの制御を受けていないことが考えられた。

3-6 グルコース欠乏下で増加する細胞内過酸化水素

これまでの結果より、グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化 (Ser 473) は、中間代謝産物の増減を認識することにより制御されていることが強く示唆された。解糖系の最終代謝産物であるピルビン酸を培地中に添加すれば、グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化が惹起されないのではないかと考え検討した。グルコース欠乏培地にピルビン酸を添加すると、グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化は抑制された (図 7)。ピルビン酸はアセチル CoA を経て、ミトコンドリアの TCA サイクルで代謝され、ミトコンドリアでの酸化的リン酸化に必要な NADH を生み出す。また、ミトコンドリア電子伝達系コンプレックス I の阻害剤である rotenone、コンプレックス III の阻害剤である antimycin 処理により、細胞内活性酸素種が増加することが報告されている (Watson, R. T, 2004 ; Ide, T, 1999)。活性酸素種とはスーパーオキシド、ヒドロキシラジカル、一重項酸素、過酸化水素等の総称である。ミトコンドリアで産生される活性酸素種は、ユビセミキノンが酸素を電子に供与することで、スーパーオキシドとして産生される。スーパーオキシドは、ミトコンドリア内に存在する Mn-SOD (superoxide dismutase) により過酸化水素 (H_2O_2) に変換される。過酸化水素はグルタチオンペルオキシダーゼやペルオキシレドキシンにより水分子に変換される。グルコース欠乏下で、細胞内活性酸素種の増加が観察されるか DCFDA probe 及び BES- H_2O_2

probe を用い検討した。DCFDA はヒドロキシラジカル、スーパーオキシド、過酸化水素など広範な活性酸素種を補足できる probe である。HepG2 細胞の細胞内活性酸素種はグルコース欠乏培地に曝露すると増大し、ここに抗酸化剤である NAC を処理することにより、減少した (図 8)。次に、過酸化水素に極めて反応性の高い BES-H₂O₂ probe (Maeda H, 2004) を用いて細胞内過酸化水素をフローサイトメーターで測定した。

HepG2 細胞において、グルコース欠乏下で細胞内過酸化水素の増加が観察され、抗酸化剤である N-acetylcysteine (NAC) 処理により細胞内過酸化水素は減少した(図 9A)。

これまでに、過酸化水素は AKT を含む様々な細胞内シグナル伝達のメディエーターとなることが報告されている。グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化 (Ser 473) は NAC 処理により減少した (図 9B)。さらに培地中に過酸化水素を処理すると、濃度依存的に AKT リン酸化 (Ser 473) が亢進されることが、本実験系でも観察された (図 9C)。また、PANC-1 細胞でもグルコース欠乏による細胞内過酸化水素の増加が観察された (図 10A)。さらにグルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化 (Ser 473) は NAC 処理により抑制されることも観察された (図 10B)。これらの結果より、グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化 (Ser 473) において過酸化水素がメディエーターとなっていることが強く示唆された。ヒト正常漿膜由来の線維芽細胞でも、培地中のグルコースを除くと、細胞内過酸化水素の増大が観察された (図 11)。このことより、グルコース欠乏による細胞内過酸化水素の増加は、がん細胞特異的な反応でないことが

示された。

3-7 グルコース欠乏により増加する細胞内過酸化水素に及ぼすヘキソースの影響

上述の結果よりグルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化は、細胞が解糖系もしくはペントースリン酸化回路の中間代謝産物の増減を認識することにより制御されていることが明らかになった。またグルコース欠乏により増加する細胞内過酸化水素が AKT リン酸化のメディエーターであることも示された。

そこでヘキソース添加によって、グルコース欠乏により誘導される細胞内過酸化水素が抑制されるか検討した。ガラクトース及びフルクトース添加で、グルコース欠乏により誘導される細胞内過酸化水素は抑制された (図 12)。このことより、グルコース欠乏で増加する細胞内過酸化水素は、解糖系もしくはペントースリン酸化回路の中間代謝産物の増減を認識することにより制御されていることが明らかになった。

3-8 グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化に及ぼす SRC 及び OSSA の影響

これまでに過酸化水素がメディエーターとなり、PI3K 依存的に AKT を活性化する機構として SRC/OSSA/PI3K を介する経路が報告されている。UV 刺激により増加した細胞内活性酸素の刺激を受けると、SRC 及び PI3K のアダプタープロテインである OSSA が複合体を形成し、PI3K の活性化を通じて AKT の活性化を行う (Tanaka M, 2009)。

OSSA (Oxidative-stress associated SRC activator) は酸化ストレスに伴う SRC の新規活性化因子として同定されたアダプタープロテインである。SRC は最初に同定されたがん遺伝子産物でチロシンキナーゼであり、細胞の分化、増殖、がん化などを制御する多様なシグナル伝達において重要な役割を担っている。哺乳動物細胞では、c-SRC との相同性から SRC ファミリーチロシンキナーゼとして 8 種が同定されている。c-SRC に関してはそのキナーゼ活性制御に重要な 2 つのチロシン残基が報告されている。

Tyr416 は活性化に関わる自己リン酸化部位であり、Tyr527 は不活性化に関わる負の制御部位である (Thomas, S. M, 1997 ; Hunter, T, 1997)。SRC ファミリーチロシンキナーゼの阻害剤である PP2 (Hanke, J. H, 1996) 処理により、グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化 (Ser 473) 及び SRC リン酸化 (Tyr 416) は抑制された (図 13A,B)。また、培地中に過酸化水素を添加すると SRC のリン酸化 (Tyr 416) 及び AKT リン酸化 (Ser 473) は亢進し、PP2 処理により抑制された (図 13B,C)。これらのこと

より、グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化 (Ser 473) には SRC の活性化が強く関与していることが明らかになった。

次にアダプタープロテインである OSSA のこのシグナル伝達への寄与を確認するため、RNAi 干渉法による発現抑制を行った。OSSA 特異的な siRNA の導入により、OSSA タンパク質の減少を確認した (図 14A)。OSSA の発現抑制によってグルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化 (Ser 473) は抑制された (図 14B)。また、培地中に過酸化水素処置することにより亢進する AKT リン酸化 (Ser 473) も、OSSA の発現抑制により抑制された (図 12C)。これらのことより、グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化 (Ser 473) には SRC の活性化及び OSSA が強く関与していることが明らかになった。

3-9 グルコース欠乏により増加する細胞内過酸化水素蓄積に対する NOX の寄与

グルコース欠乏下で増加する細胞内過酸化水素の産生場所の同定を試みた。主要な細胞内活性酸素種の産生場所として、NADPH oxidase (NOX) family (Sumimoto, H, 2008)、ミトコンドリア (Skulachev, V. P, 1996)、ペルオキシソーム (Zhang, R. L, 2002)などが知られる。近年、活性酸素種を介するシグナル伝達機構として NOX family の寄与を示す報告がなされている。NOX family は、活性酸素種を最初から本来の生成物として作る膜貫通酵素系である。NOX は NADPH の電子を受け取り、酸素分子に供与することによりスーパーオキシドを産生する。ヒトでは 5 分子種の NOX と 2 分子種の Duox (Dual oxidase) の計 7 分子種が存在することが知られており、PANC-1 細胞においては NOX4 及び NOX5 の発現が報告されている (Mochizuki, T, 2006)。

そこでグルコース欠乏下で誘導される AKT リン酸化 (Ser 473) に及ぼす NOX4 及び NOX5 の関与を検討した。PANC-1 細胞において、NOX4、NOX5 の発現抑制を行った。NOX4 特異的 siRNA の導入により、NOX4 の発現抑制が RT-PCR 法により確かめられた (図 15A)。NOX4 の発現を抑制すると、グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化 (Ser 473) は抑制された (図 15B)。

一方、NOX5 の発現抑制ではグルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化 (Ser 473) は抑制されなかった (図 16A,B)。これらのことより、グルコース欠乏により増加する細

胞内過酸化水素は NOX4 由来であることが示唆された。

HepG2 細胞では、NOX4 の発現は確認されたものの、NOX5 の発現は確認されなかった (Gao, D, 2010)。そのため、NOX4 の寄与を検討した。NOX4 の発現抑制効率を RT-PCR 法にて確認した (図 17A)。NOX4 の発現抑制により、グルコース欠乏により増加する細胞内過酸化水素は減少した (図 17B)。またグルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化 (Ser473) も抑制された (図 17C)。これらのことよりグルコース欠乏により増加する細胞内過酸化水素の産生に NOX4 が関与していることが強く示唆された。

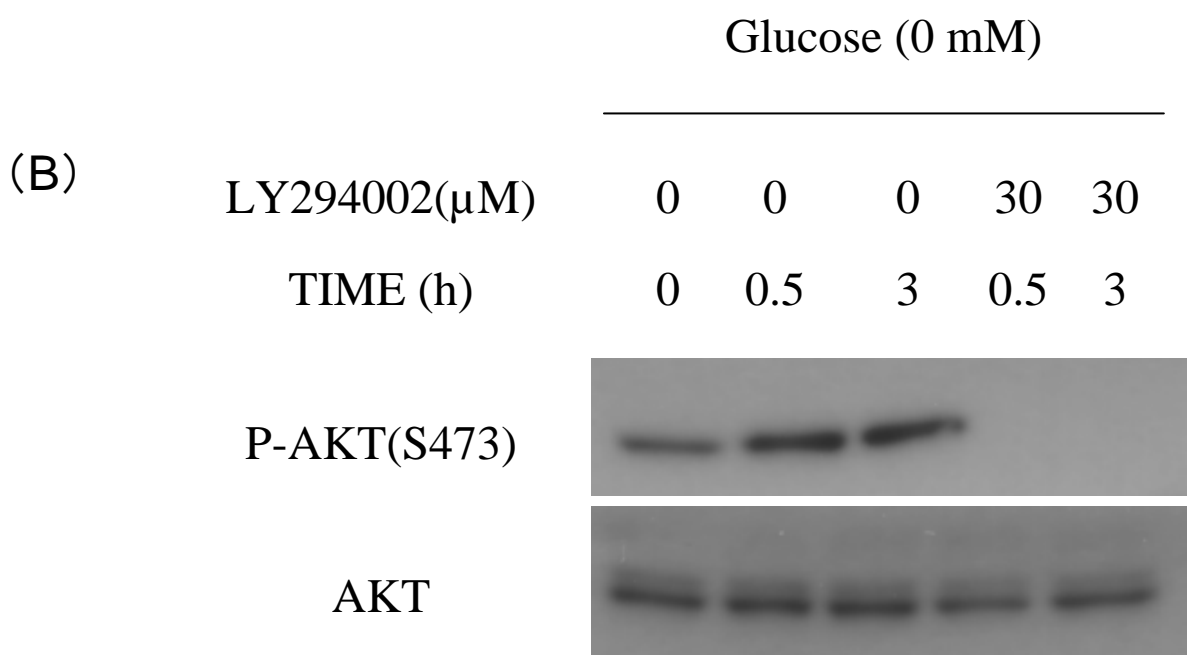
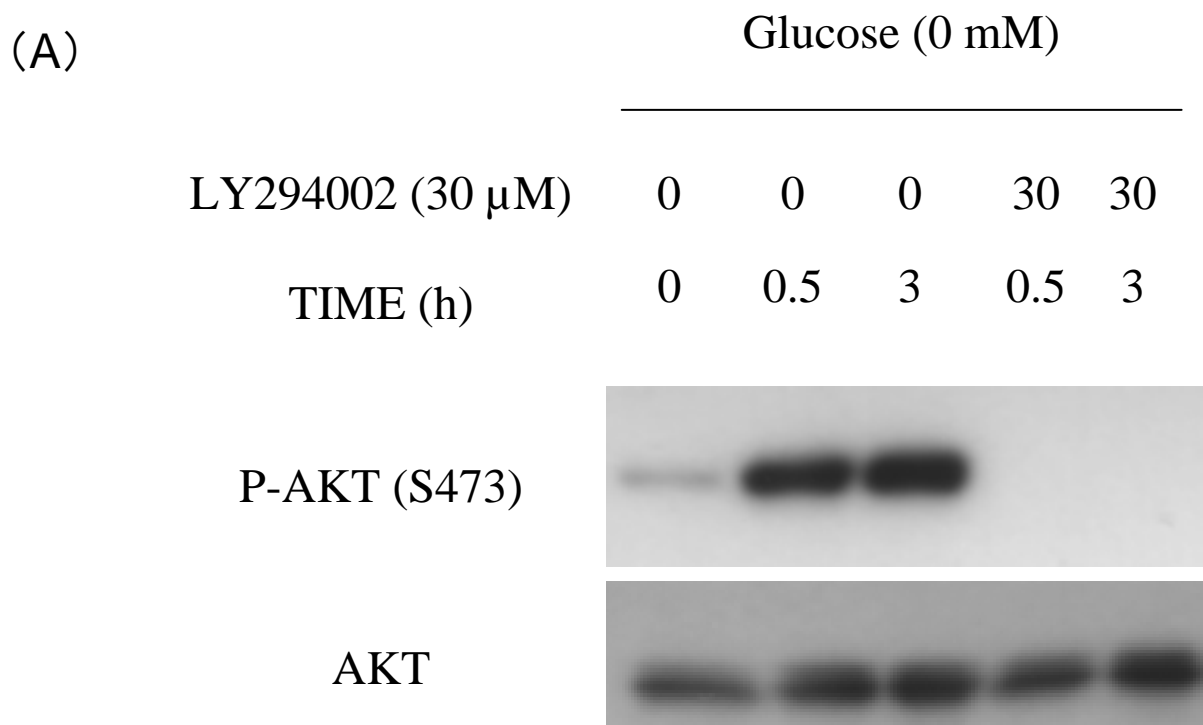


図1 リン酸化AKT (Ser 473), AKTのイムノブロット解析
 グルコース欠乏培地に細胞をPI3Kの阻害剤
 であるLY294002を表記の終濃度で処理し、所定の時間培養した。
 (A) HepG2細胞 (B) PANC-1細胞

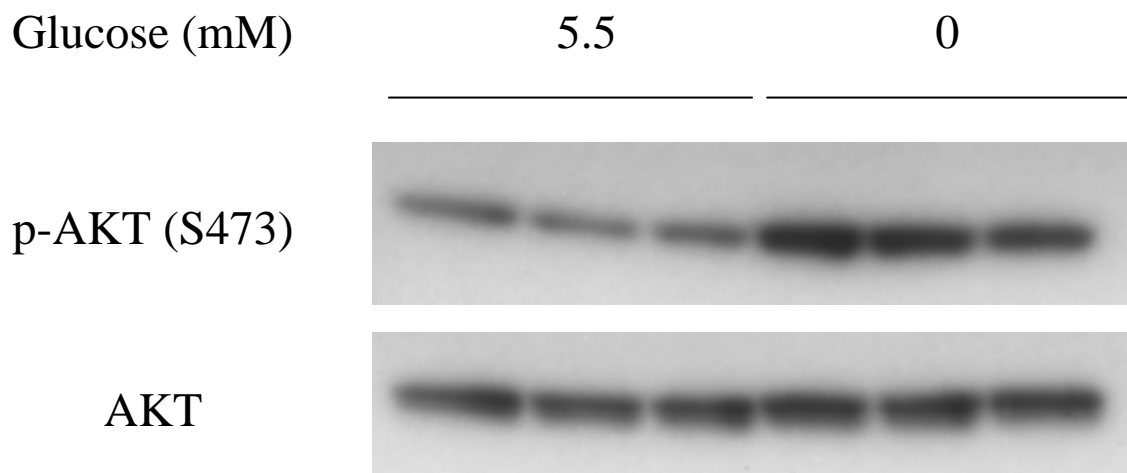


図2 リン酸化AKT (Ser 473), AKTのイムノブロット解析
 グルコース欠乏培地で胃のしょう膜由来繊維芽細胞を30分培養した。

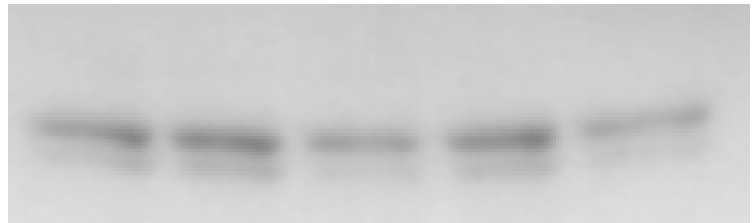
(A)

Glucose (mM) 5.5 2.75 1.38 0.69 0

P-AKT (S473)



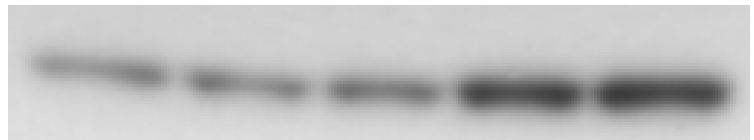
AKT



(B)

Glucose (mM) 5.5 2.75 1.38 0.69 0

P-AKT(S473)



AKT

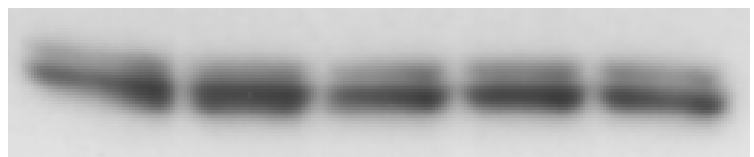
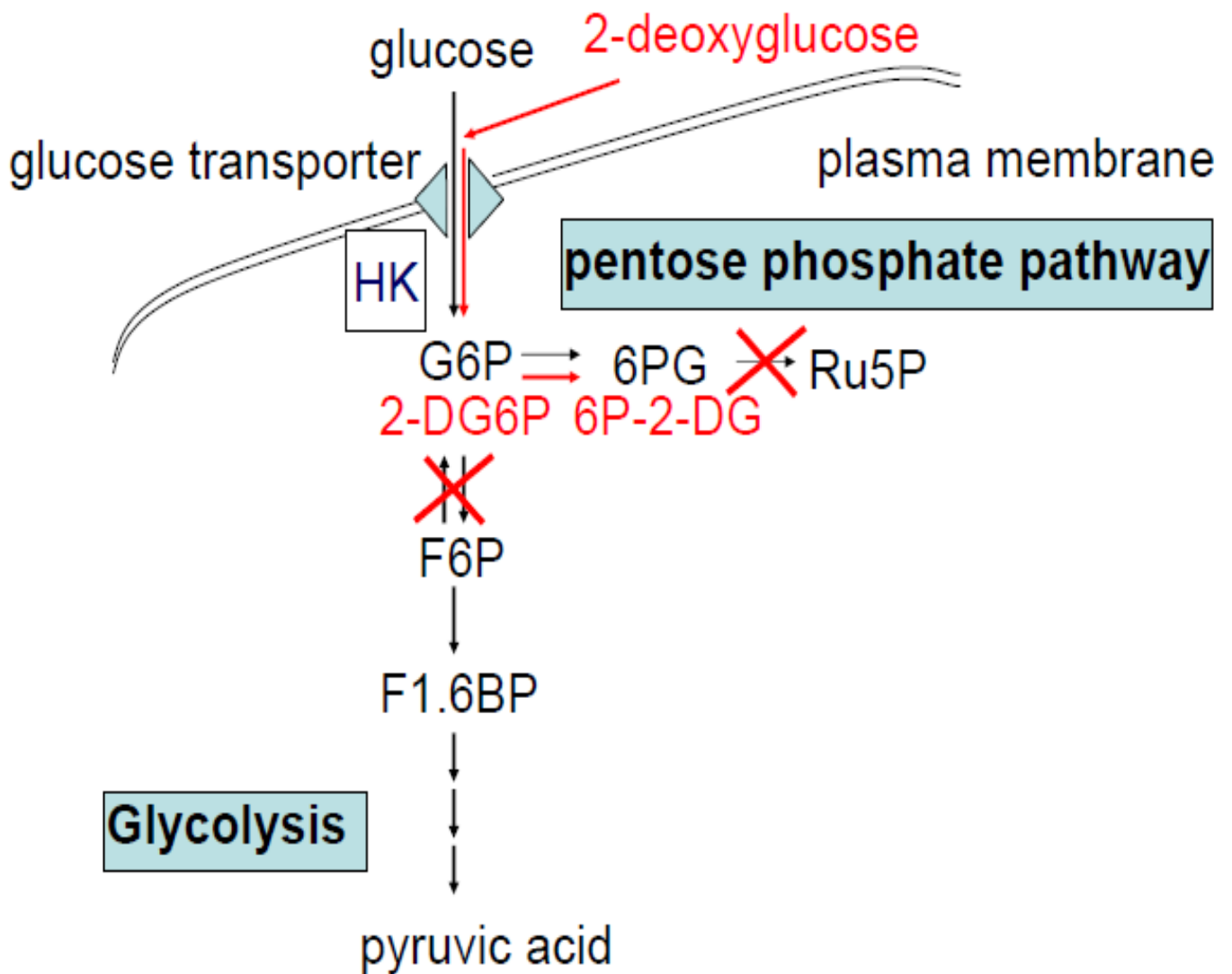


図3 リン酸化AKT (Ser 473), AKTのイムノブロット解析
表記のグルコース濃度の培地で細胞を30分培養した。
(A) HepG2細胞 (B) PANC-1細胞

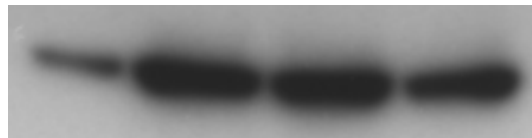


参考図 4 2-deoxyglucose の代謝

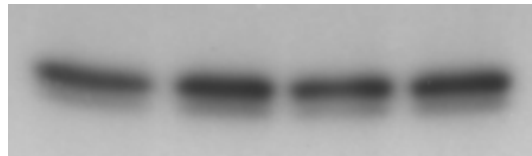
(A)

2-DG (mM)	0	0	5.5	5.5
Glucose (mM)	5.5	0	0	5.5

P-AKT (S473)



AKT



(B)

2-DG (mM)	0	0	5.5	5.5
GLUCOSE (mM)	5.5	0	0	5.5

P-AKT (S473)

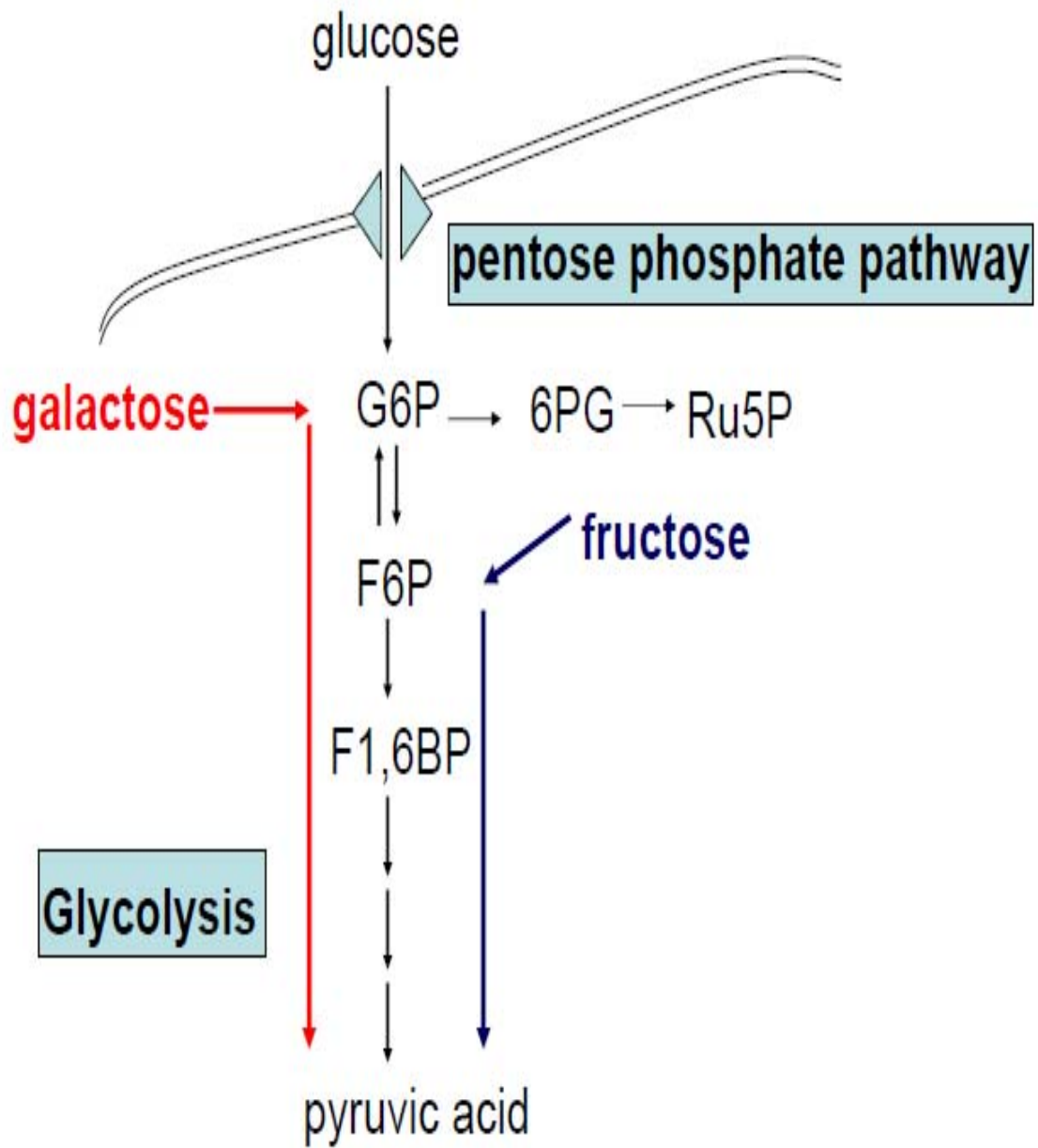


AKT



図4 リン酸化AKT (Ser 473), AKTのイムノブロット解析
表記の終濃度でグルコース及び2-DGの培地に添加し、
細胞を30分培養した。

(A) HepG2細胞 (B) PANC-1細胞

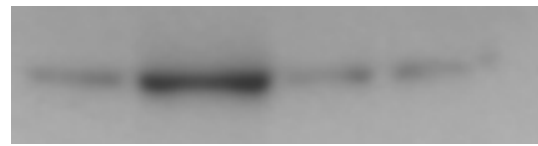


参考図 5 ガラクトースとフルクトースの代謝経路

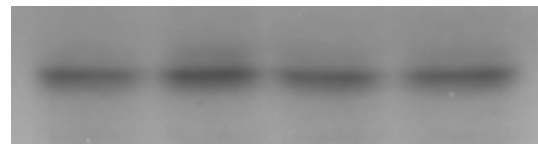
(A)

Galactose (mM)	0	0	0	5.5
Fructose (mM)	0	0	5.5	0
Glucose (mM)	5.5	0	0	0

P-AKT(S473)



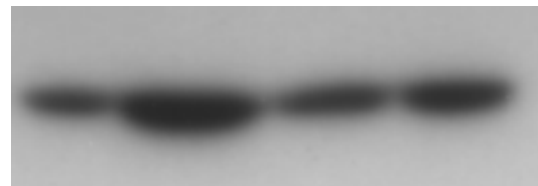
AKT



(B)

Galactose (mM)	0	0	0	5.5
Fructose (mM)	0	0	5.5	0
Glucose (mM)	5.5	0	0	0

P-AKT(S473)



AKT



図5 リン酸化AKT (Ser 473), AKTのイムノブロット解析
表記の終濃度でガラクトース及びフルクトースを培地に添加し、
細胞を30分培養した。

(A) HepG2細胞 (B) PANC-1細胞

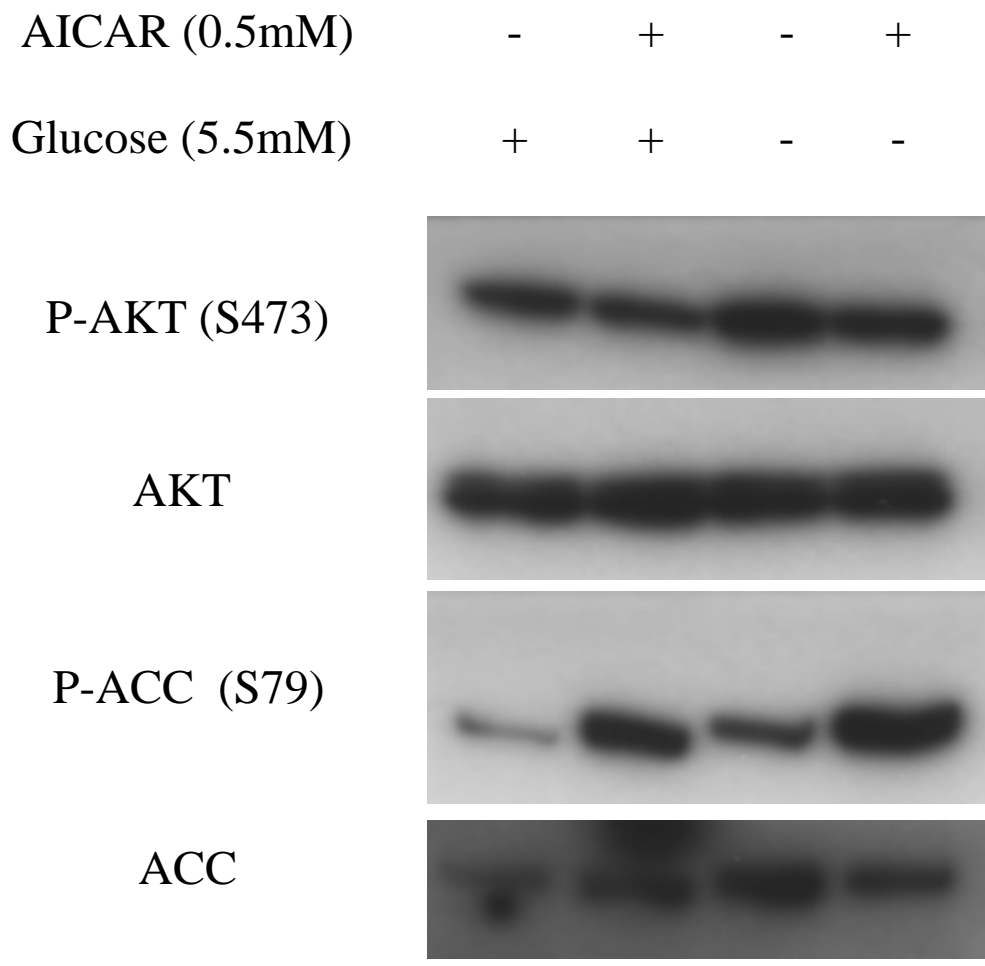
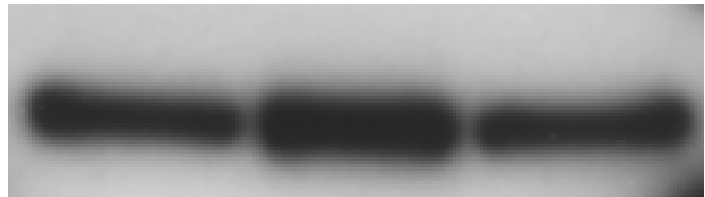


図6 リン酸化AKT (Ser 473), AKT,リン酸化ACC (Ser79),ACCのイムノブロット解析
PANC-1細胞をグルコース含有培地または不含培地にAICARを表記の濃度添加し、30分培養した。

pyruvate acid (mM)	0	0	1.0
--------------------	---	---	-----

Glucose (mM)	5.5	0	0
--------------	-----	---	---

P-AKT (S473)



AKT

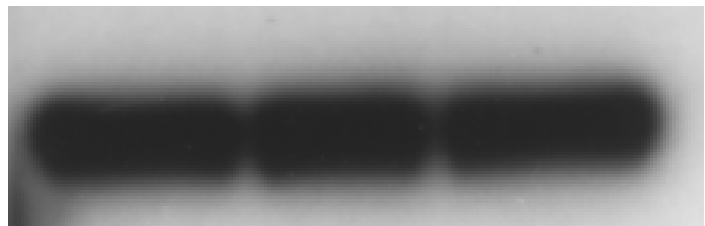


図7 リン酸化AKT (Ser 473), AKTのイムノブロット解析
表記の終濃度でグルコース及びピルビン酸を培地に添加し、
HepG2細胞を30分間培養した。

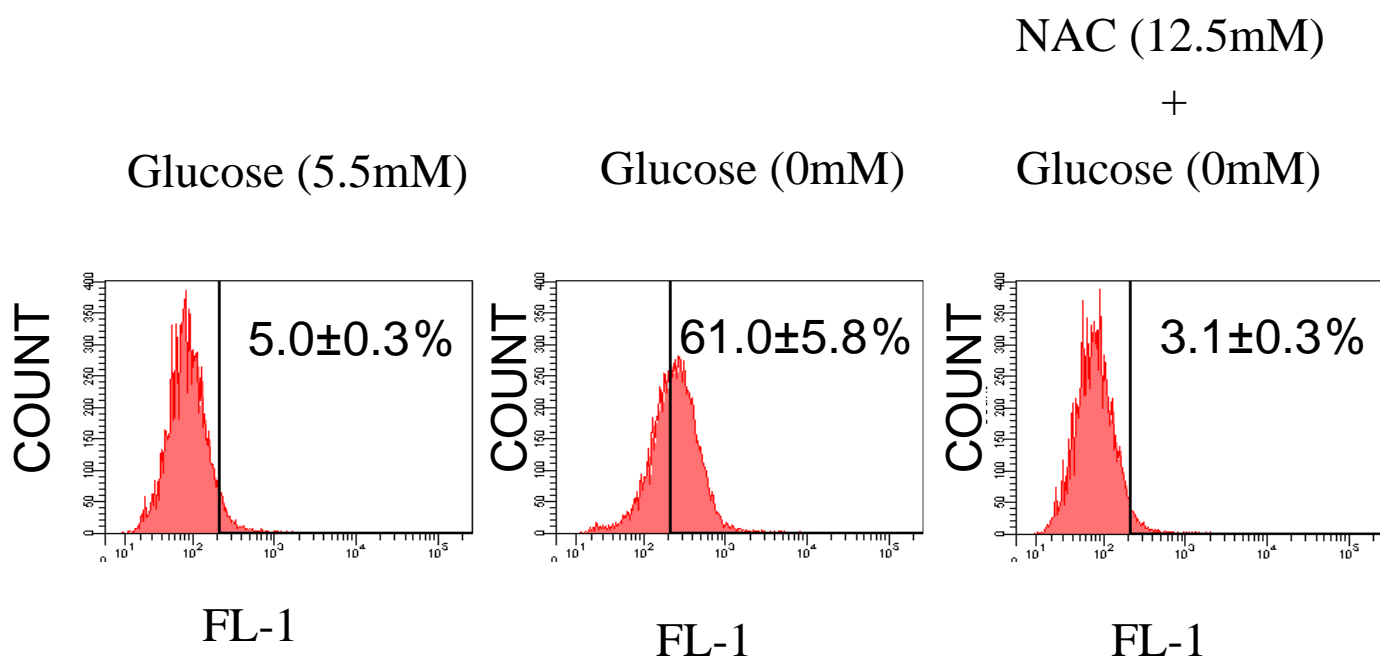


図8 HepG2細胞をグルコース含有培地または不含培地に表記の終濃度でNAC処理し30分間培養した後、DCFDA プローブを用いて、フローサイトメーターを用いて測定した。平均値 ± 標準誤差 n=3

(A)

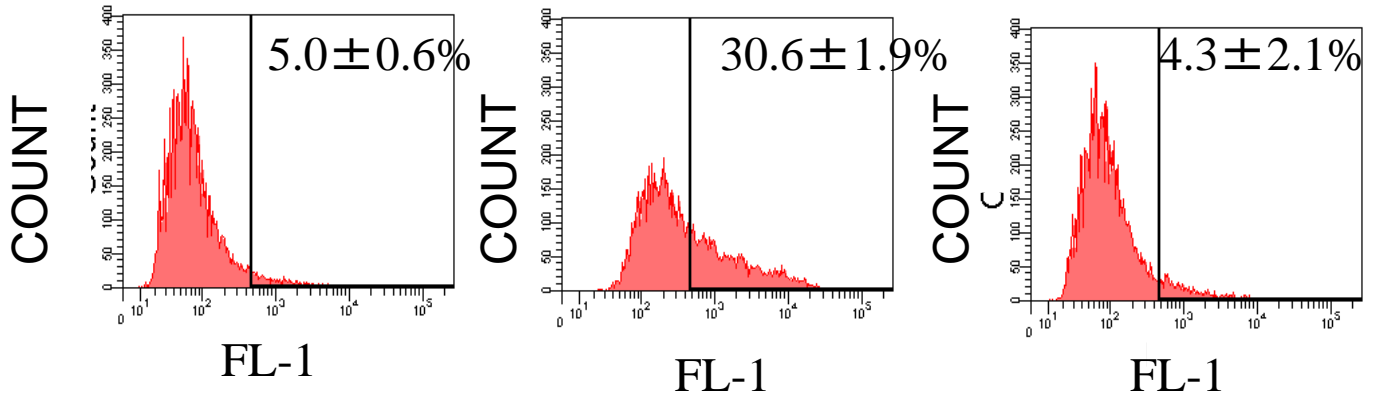
NAC (12.5mM)

+

Glucose (5.5mM)

Glucose (0mM)

Glucose (0mM)



(B)

(C)

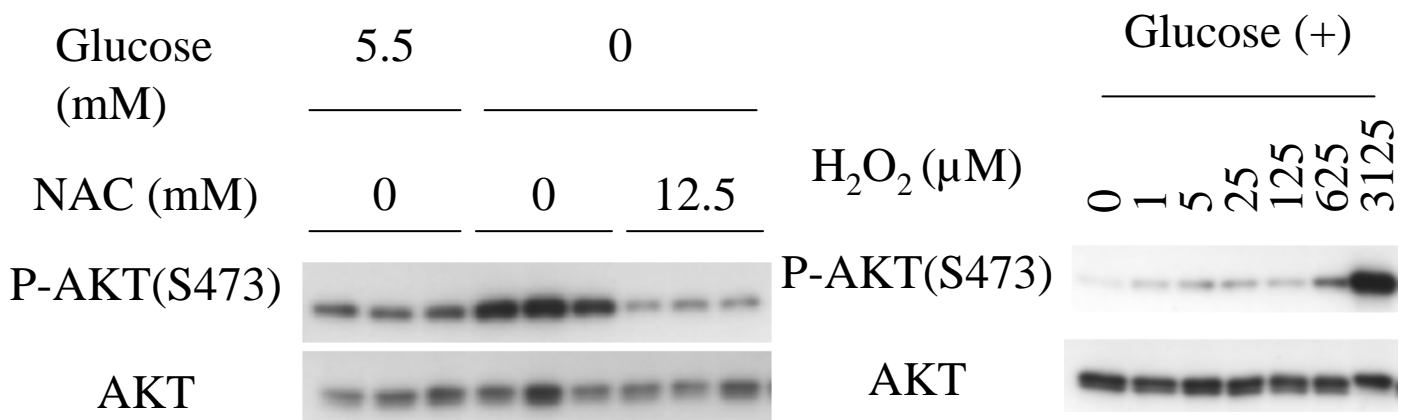
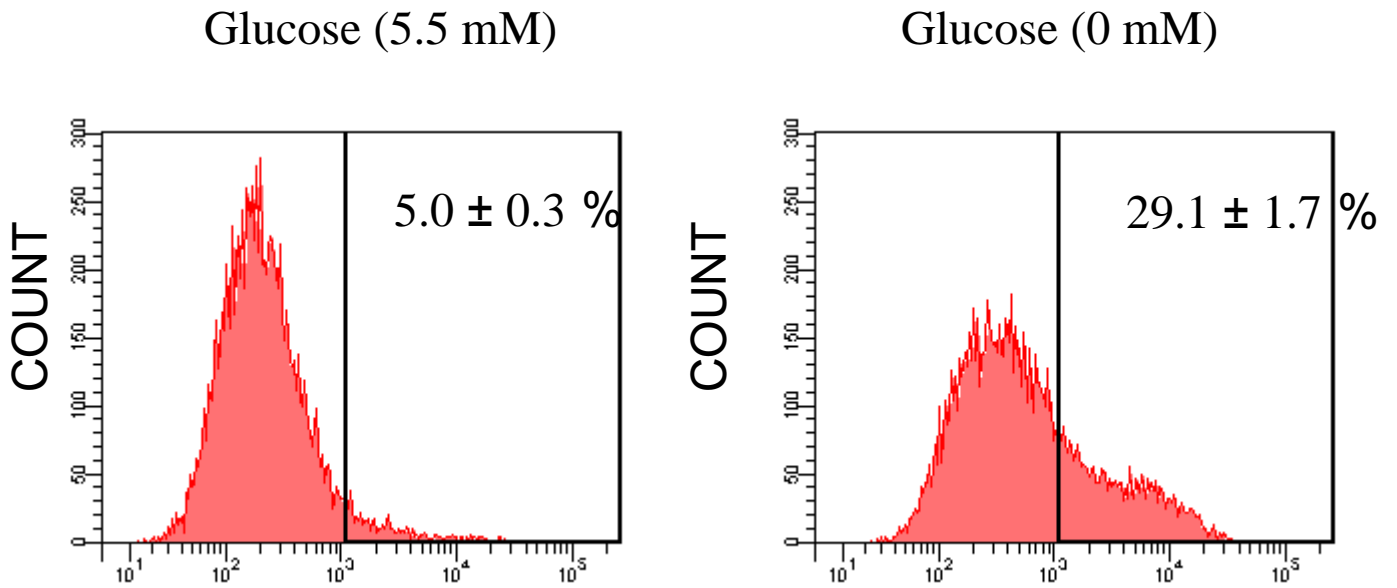


図9 HepG2細胞をグルコース含有培地または不含培地に表記の終濃度でNAC処理し30分間培養した。(A) Bes- H_2O_2 を用いて、フローサイトメーターを用いて測定した。平均値 \pm 標準誤差 $n=3$
(B) リン酸化AKT,AKTをイムノブロット法にて解析した。(C)グルコース含有培地に、表記の終濃度で H_2O_2 を15分間処理し、AKT, リン酸化AKTをイムノブロット法にて解析した。

(A)



(B)

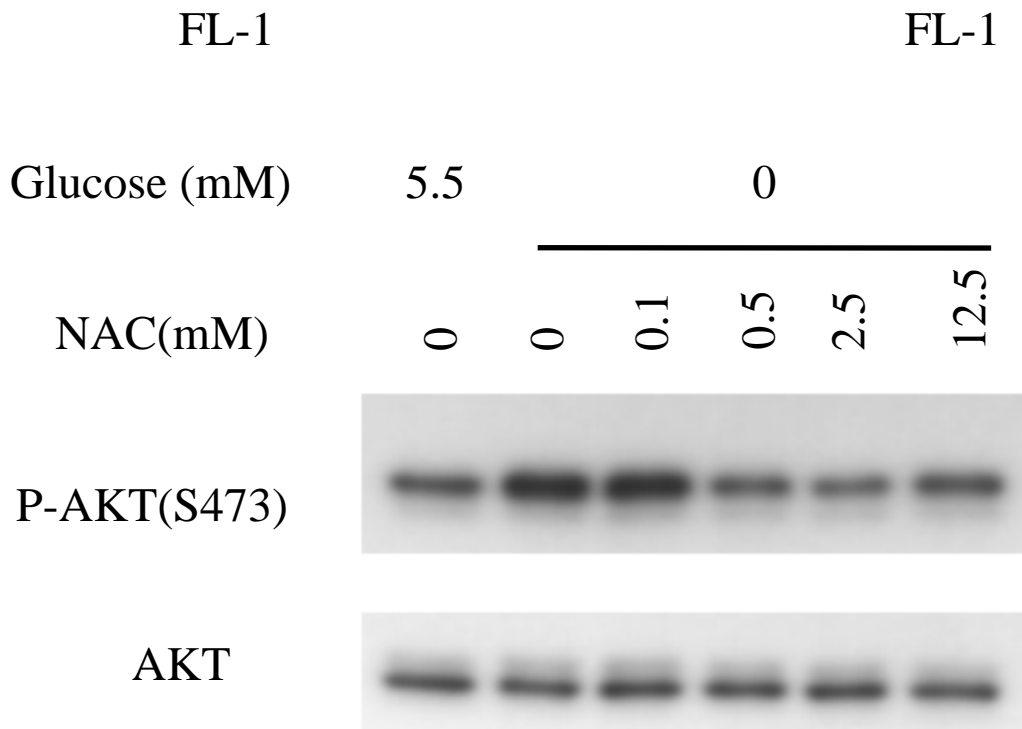


図10 (A) PANC-1細胞をグルコース含有培地または不含培地で30分間培養した後、フローサイトメーターを用いて細胞内過酸化水素を測定した。平均値 ± 標準誤差 n=3 (B)グルコース含有培地または不含培地に表記の終濃度でNACを処理し30分間培養した後、リン酸化AKT,AKTをイムノブロット法にて解析した。

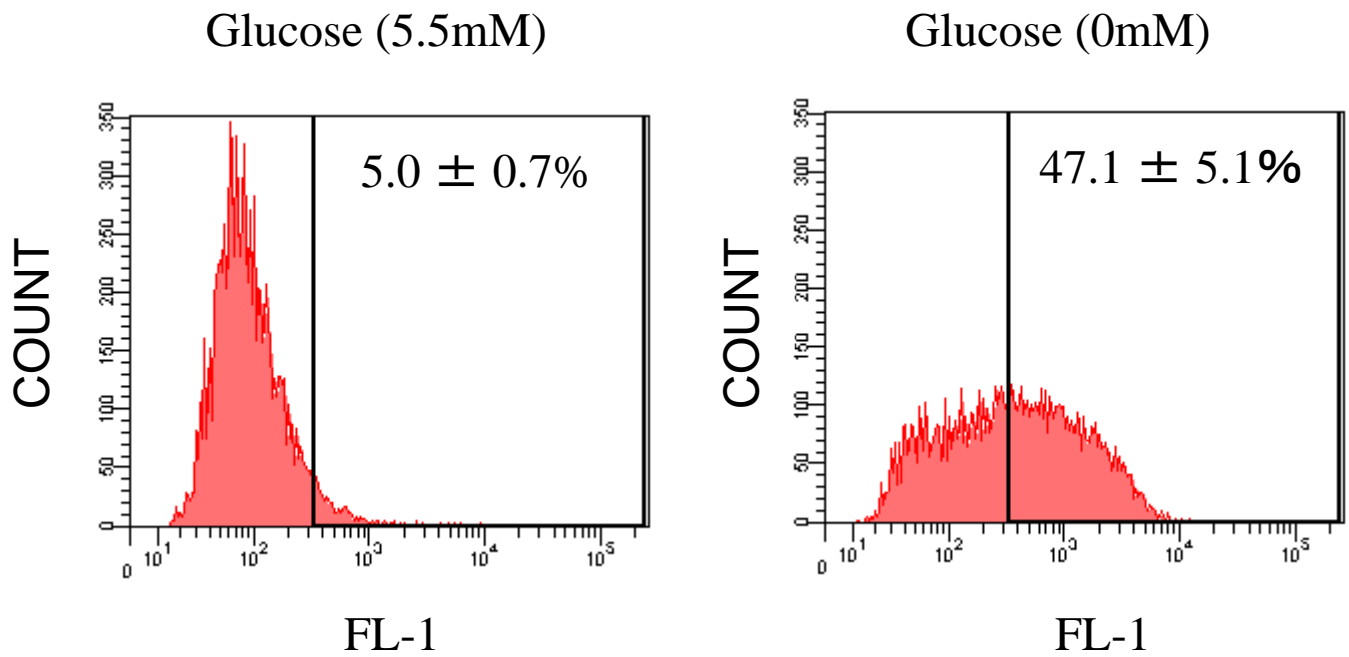


図11 ヒト正常しょう膜由来の繊維芽細胞をグルコース含有培地または不含培地で30分間培養した後、フローサイトメーターを用いて細胞内過酸化水素を測定した。平均値 ± 標準誤差 n=3

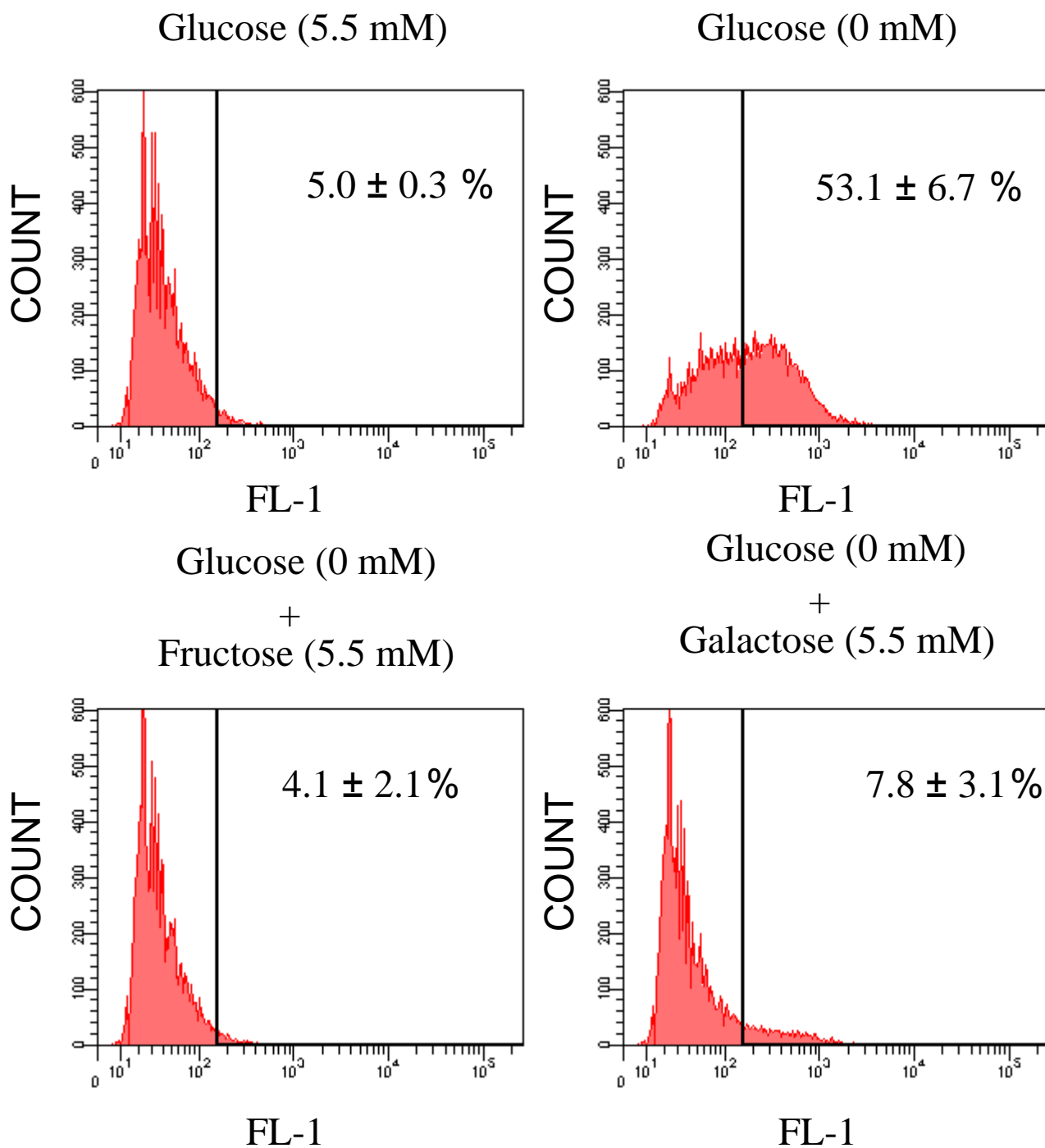
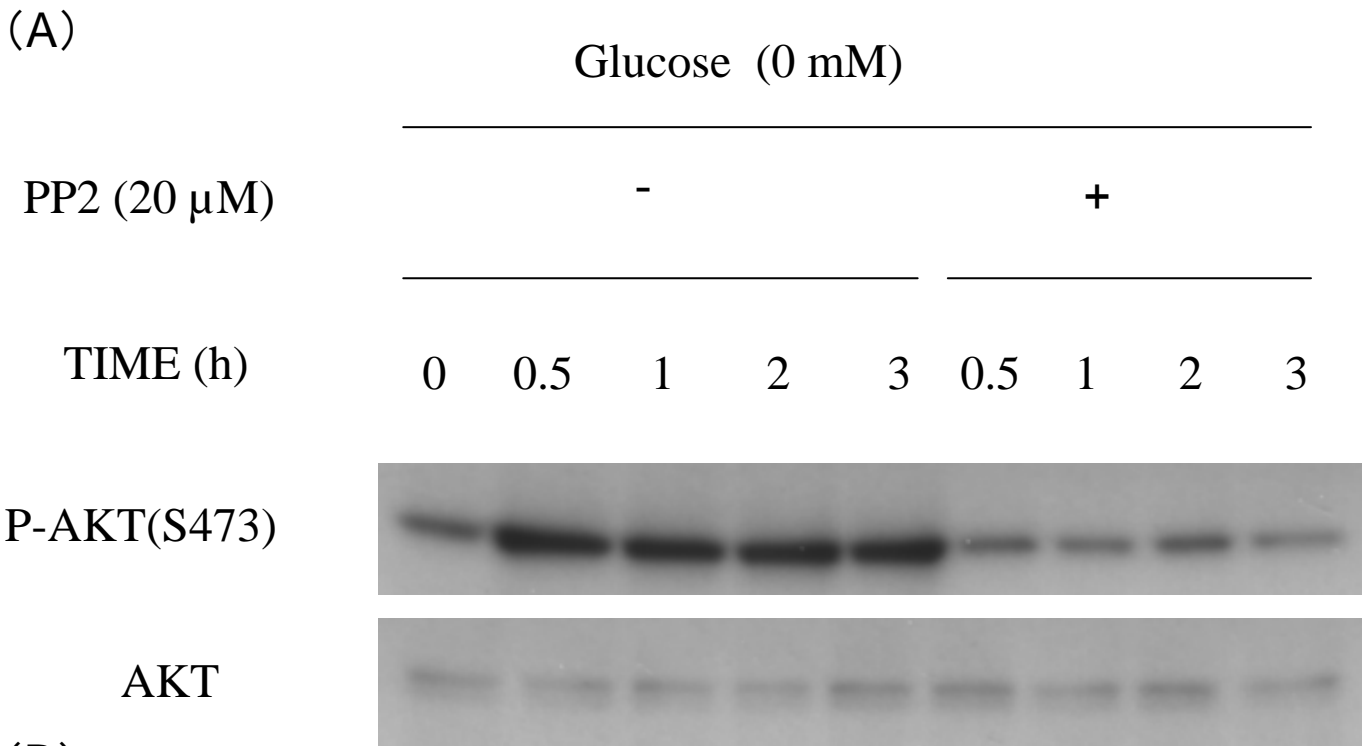


図12 表記の終濃度でグルコース、ガラクトース、フルクトースを培地に添加し、HepG2細胞を30分培養した後、フローサイトメーターを用いて、細胞内過酸化水素を測定した。 平均値 \pm 標準誤差 n=3



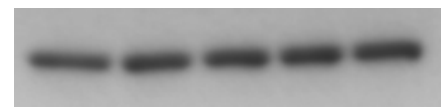
(B)

H ₂ O ₂ (mM)	0	0	0	0.6	0.6
PP2 (μ M)	0	0	20	0	20
GLUCOSE (mM)	5.5	0	0	5.5	5.5

P- SRC(Y416)



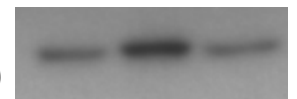
SRC



(C)

PP2 (20 μ M)	-	-	+
H ₂ O ₂ (0.6 mM)	-	+	+

p-AKT (S473)



AKT

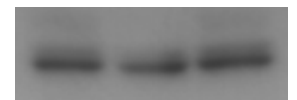


図13 リン酸化AKT,AKT,リン酸化SRC,SRCをイムノブロット法にて解析した。(A) グルコース欠乏培地に 表記の終濃度でPP2を処理し所定の時間HepG2細胞を培養した。(B)グルコース含有培地または不含培地に、H₂O₂またはPP2を表記の濃度で処理したHepG2細胞を30分間培養した。(C)グルコース含有培地にH₂O₂またはPP2を処理したHepG2細胞を30分間培養した。

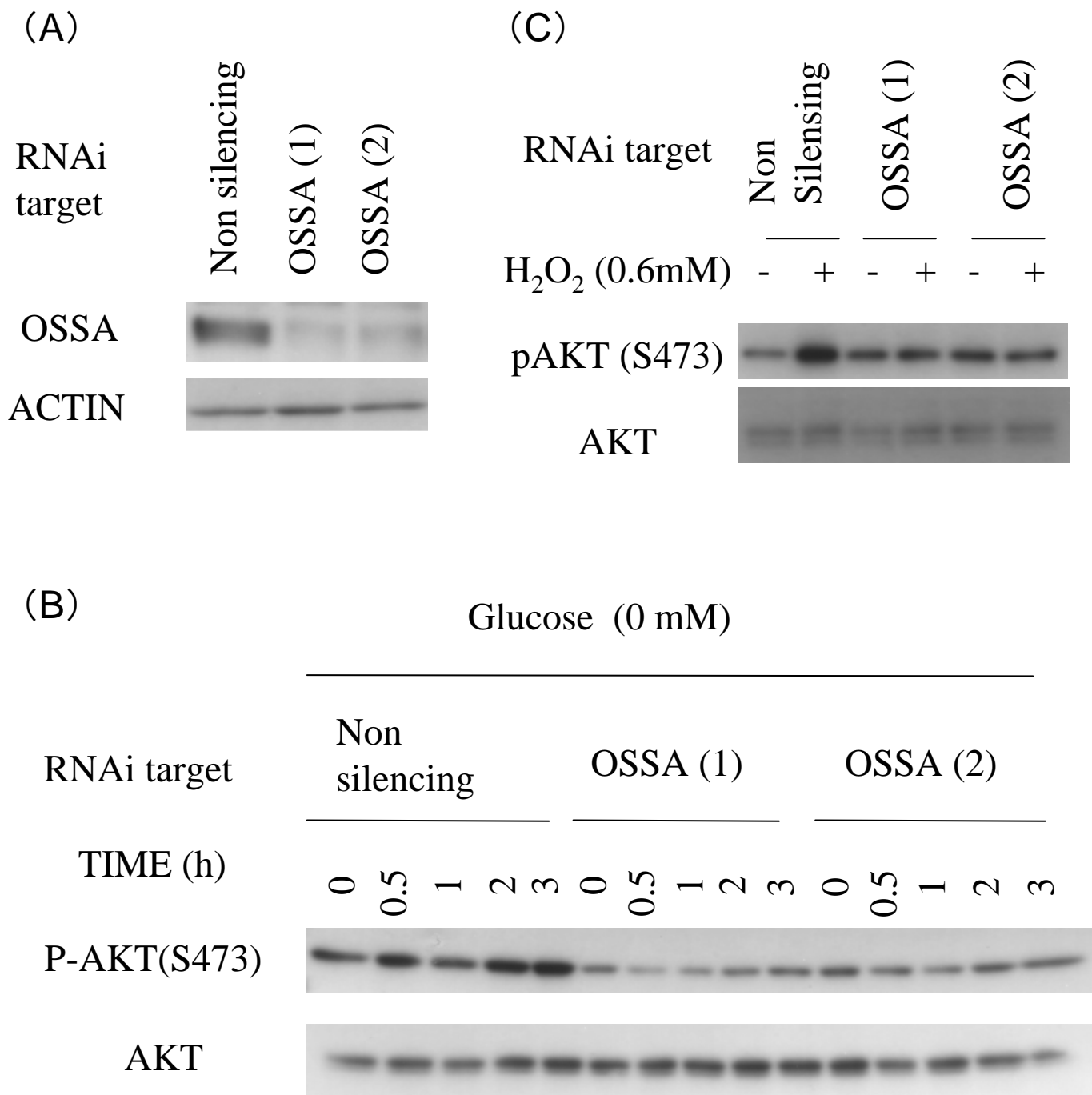
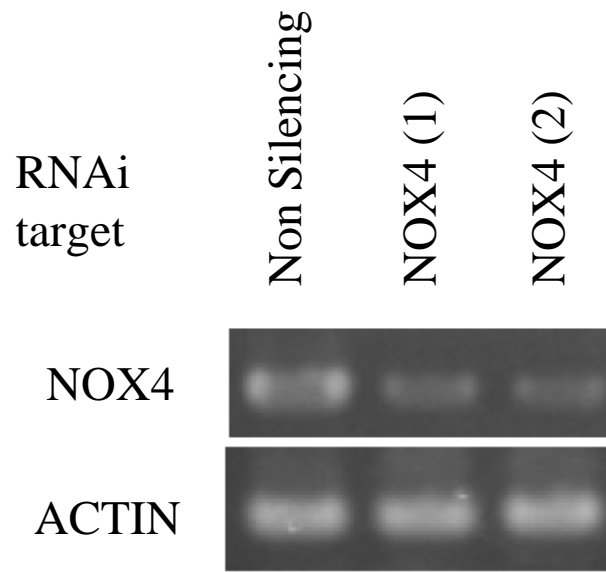


図14 リン酸化AKT,AKTをイムノブロット法にて解析した。(A)OSSAのノックダウン効率を検討した。(B) グルコース欠乏培地でOSSAをノックダウンしたHepG2細胞を所定の時間培養した。グルコース含有培地または不含培地に、H₂O₂またはPP2を表記の濃度で処理したHepG2細胞を30分間培養した。(C)表記の条件でOSSAをノックダウンしたHepG2細胞を30分間培養した。

(A)



(B)

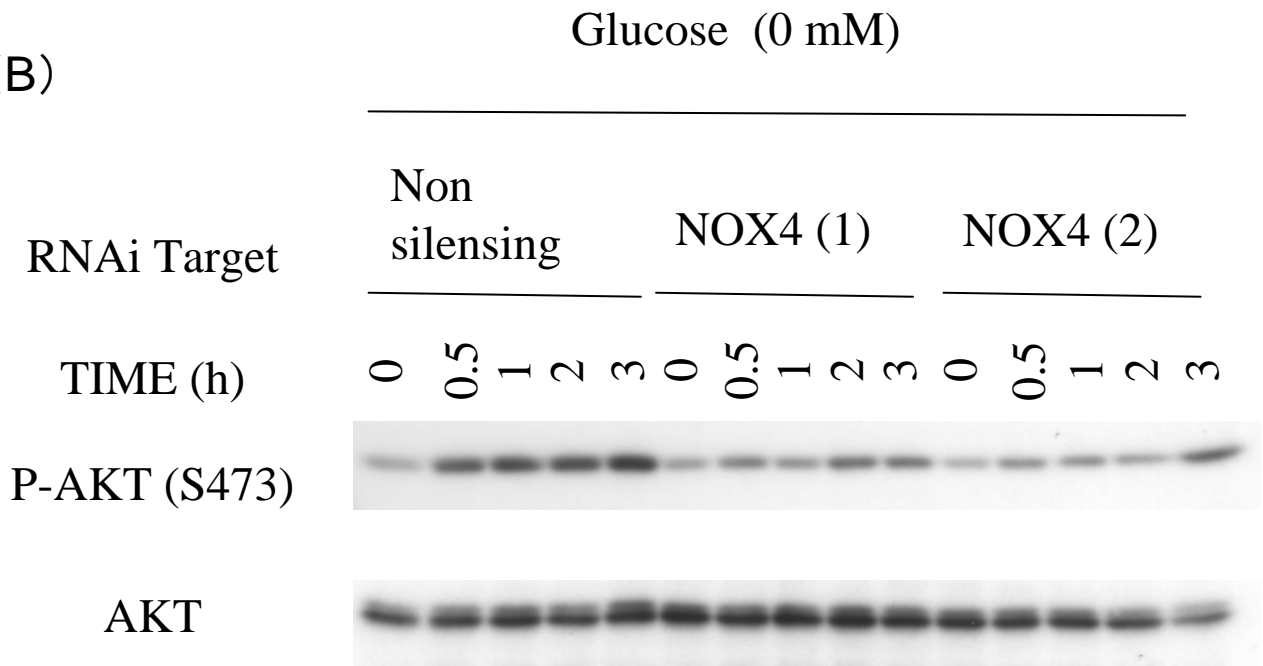
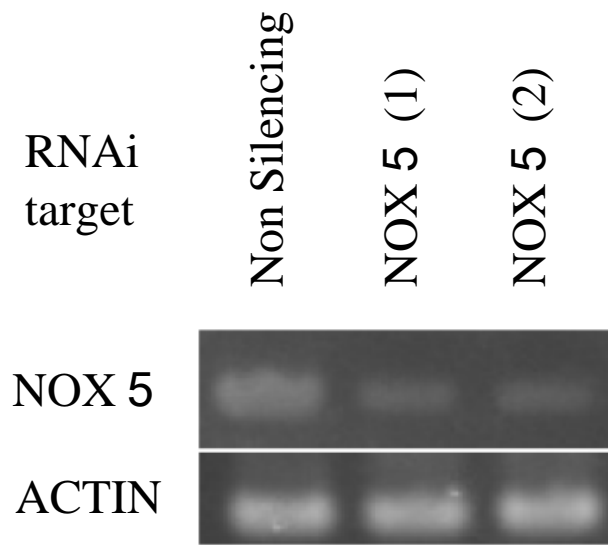


図15 (A)PANC-1細胞を用い、NOX4のノックダウン効率をRT-PCR法にて解析した。(B)表記の条件で、NOX4をノックダウンしたPANC-1細胞を培養した後、イムノブロット方にてAKTリン酸化、AKTを検出した。

(A)



(B)

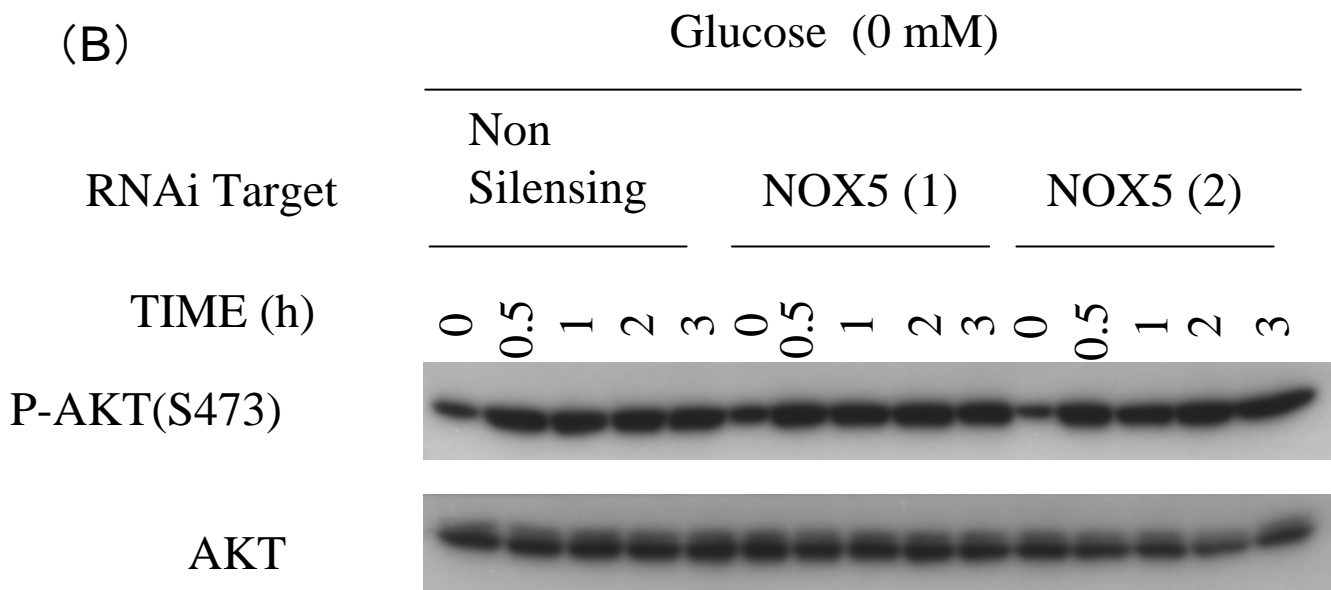
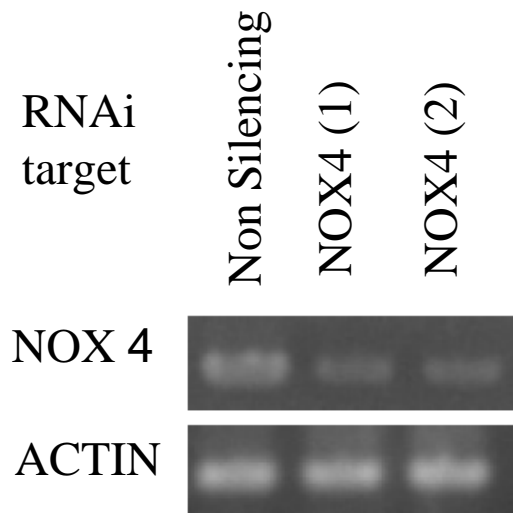
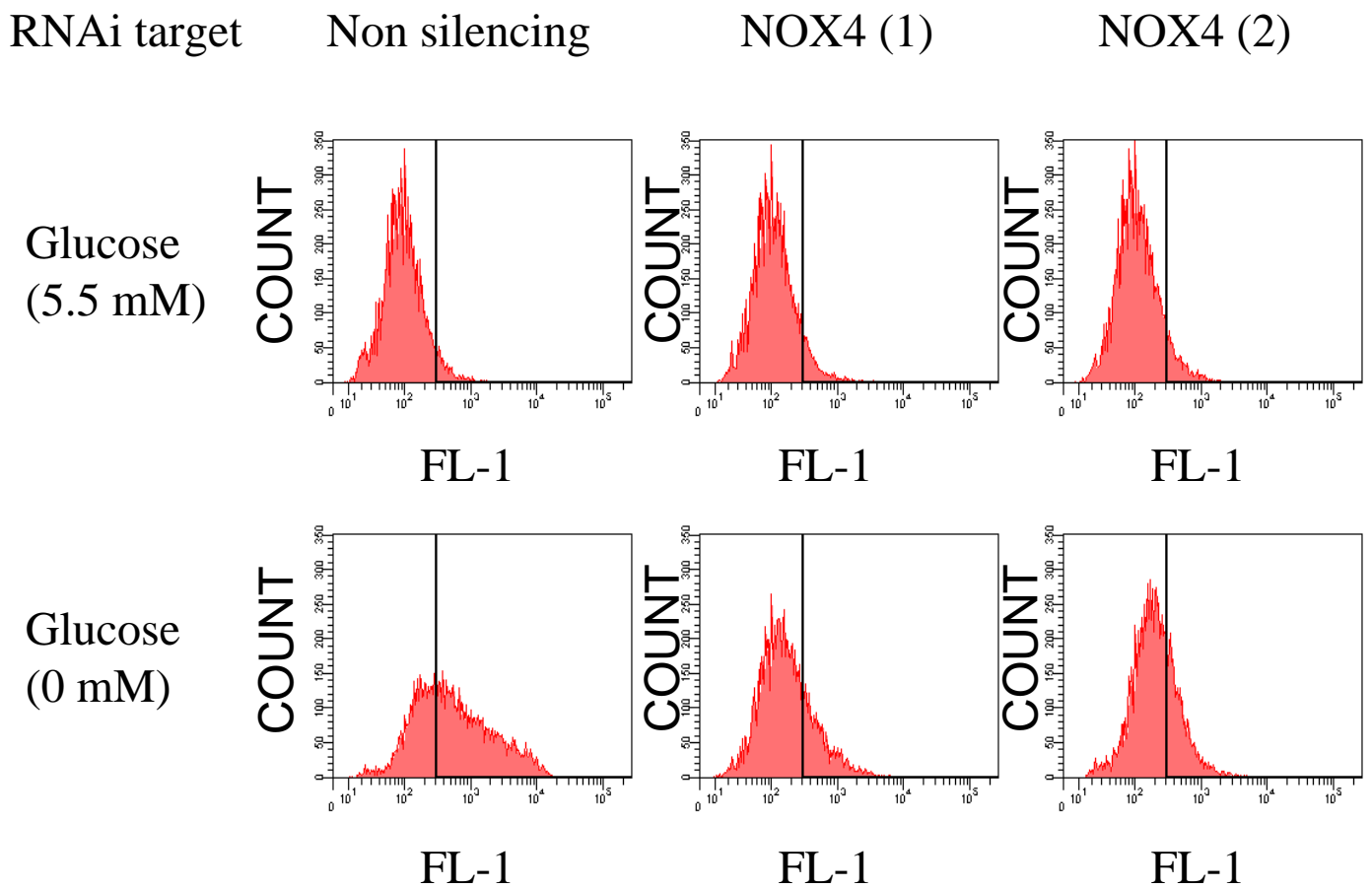


図16 (A)PANC-1細胞を用い、NOX5のノックダウン効率をRT-PCR法にて解析した。(B)表記の条件で、NOX5をノックダウンしたPANC-1細胞を培養した後、イムノブロット方にてAKTリン酸化、AKTを検出した。

(A)



(B)



(C)

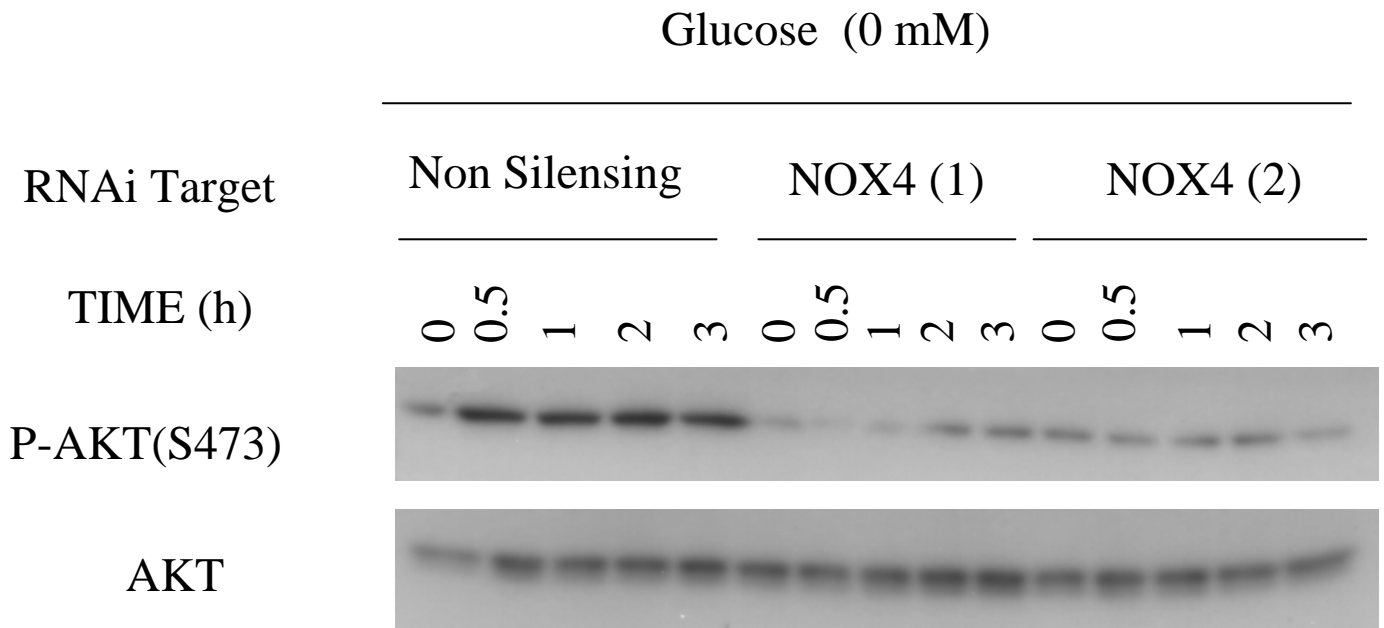


図17 (A)HepG2細胞を用い、NOX4のノックダウン効率をRT-PCR法にて解析した。表記の条件で、NOX4をノックダウンしたHepG2細胞を30分培養した後、(B)フローサイトメーターを用い細胞内過酸化水素を測定した。(C)イムノブロット方にてAKTリン酸化,AKTを検出した。平均値 ± 標準誤差 n=3

第四章 考察

4-1 細胞外グルコース濃度に応じた AKT リン酸化の意義

HepG2 細胞では細胞外グルコース濃度が 1.38 mM から、PANC-1 細胞では細胞外グルコース濃度 0.69 mM から AKT リン酸化の増加が観察された。この細胞間による違いは、樹立された細胞株の由来臓器に起因するものである可能性も考えられた。HepG2 細胞は肝細胞癌由来である。肝臓はグルコースに関しては最終の消費細胞としてより、全身のグルコース供給器官として機能しており、肝臓におけるグルコース応答は血糖値の低下により敏感に反応するため調節されている可能性がある。一方、PANC-1 細胞は膵管癌由来である。正常膵組織でもグルコース濃度は血中の三分の一から四分の一であることを考えると、さらに血糖値の八分の一までグルコースが欠乏した時に応答反応が始まるのは合理的と思われる。これらの点は、今後の研究で更に詳細に解明する必要がある。

グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化は、がん細胞だけでなく、正常線維芽細胞でも観察された。このことより、グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化機構は、がん細胞にのみ備わった応答ではなく、固型がん組織など病的な環境で生ずるグルコース欠乏ストレスに対する反応であることが示唆された。

4-2 グルコース代謝産物の増減による AKT リン酸化の制御

グルコーストランスポーターによって細胞内に取り込まれ、ヘキソキナーゼによりリン酸化を受ける 2-deoxyglucose 添加で、グルコース欠乏同様 AKT のリン酸化が亢進された。このことから、グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化には、グルコーストランスポーター及びヘキソキナーゼの寄与が否定された。さらに、AICAR 処理でも AKT リン酸化に変化がなかったことから、グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化には AMPK の寄与も否定された。一方、グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化は、ガラクトース、フルクトース、ピルビン酸添加により抑制された。これらのごとより、グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化は解糖系もしくはペントースリン酸回路の中間代謝産物を認識することにより制御されている可能性を示された。

代謝の中間産物が細胞の機能を制御する例として、プリン代謝の中間代謝産物である AICAR は AMPK の活性化剤として知られている (Mullane, K, 1993)。また、最近 AICAR の前駆体である SAICAR (succinylaminoimidazolecarboxamide ribose-5'-phosphate) が解糖系の代謝産物である PEP からピルビン酸への転換を介在する酵素 pyruvate kinase M2 (PKM2) の活性をアロステリックに制御することも報告された (Keller, K. E, 2012)。解糖系の中間代謝産物である GAP からはセリンが合成されるが、セリンも同

じく PKM2 の調節因子であることも明らかにされた (Chaneton, B, 2012)。

本研究では、これまで想定されていたヘキソキナーゼやグルコーストランスポーターなどのグルコース濃度感知に関わる因子経路ではなく、グルコースの中間代謝産物が AKT のリン酸化を制御していることを示し、グルコース欠乏に適応する新たな細胞内情報伝達系の存在を明らかにした。

4-3 活性酸素シグナルの伝わり方

本研究では、グルコース欠乏により増加する細胞内過酸化水素が、AKT リン酸化のメディエーターであることを示した。細胞が細胞外グルコース濃度の低下を伝えるためのメディエーターとして過酸化水素を用いることは非常に興味深い結果であった。生体内で産生される活性酸素種は、これまで酸化ストレスをもたらす有害物質と考えられてきたが、近年、細胞に非特異的な損傷をもたらす毒性因子としてではなく、精緻に制御されたシグナル伝達機構のメディエーターとして働くことも知られてきた (Nathan, C, 2003 ; D'Autreaux, B, 2007)。

活性酸素種が細胞内センサータンパク質の化学修飾を介してシグナルを伝達する機構が報告されている。システイン残基の側鎖に由来するタンパク質チオール基は、他のアミノ酸側鎖に比べて酸化還元反応に対する反応性が高く、様々な活性酸素種と反応して修飾を受ける。活性酸素種によってチオール基が修飾されたタンパク質は、様々な機能制御を受ける。標的となるタンパク質には、リン酸化酵素、脱リン酸化酵素、受容体、転写因子などが知られている (Spickett, C. M, 2006)。

チオール基が活性発現に必須な場合、活性酸素によって修飾を受けることにより、活性の上昇もしくは低下がもたらされる。このようなタンパク質として、リン酸化酵素である MEKK1 (Cross, J, 2004) や脱リン酸化酵素である PTB1B (Brandes, N, 2009) が報

告されている。このような場合、活性酸素種によるチオール基の修飾が直接リン酸化シグナルの制御に関わると考えられる。チオール基の修飾はまた、タンパク質間相互作用に影響して、タンパク質機能制御に関わることも知られている (Jones, D. P, 2008 ; Winterbourn, C. C, 2008)。このような例として Keap1 が挙げられる。Keap1 は、転写因子 Nrf2 を結合しその転写活性を負に制御しているタンパク質である。Keap1 のチオール基が修飾を受けると Nrf2 から解離し抗酸化酵素などの遺伝子発現が誘導される。

本研究で、グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化には SRC が必須の分子であることを明らかにした。SRC も酸化還元感受性のシステイン残基を有しており、活性酸素種のシグナルによりチオール基が修飾を受け活性化することが知られている (Giannoni, E, 2005)。グルコース欠乏により増加する過酸化水素のセンサータンパク質として SRC が働いていることも考えられるが、今回この点については実証することはできず、今後の課題である。

細胞全体にグルコースの枯渇を瞬時に伝えるためには広範なセンサータンパク質を同時に制御する必要があると考えられ、そのメディエーターとして過酸化水素を用いることは理にかなったシステムであるかもしれない。更に、過酸化水素は細胞膜を透過することが知られており、一つの細胞が発生したシグナルが効率よく組織レベルで共有される可能性もある。このような観点で、代謝ストレス下における過酸化水素の役割を解明すれば、単一細胞レベルでなく組織微小環境における新しい生物学に到達できること

も期待される.

4-4 グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化の生理的意義

これまで、PANC-1 細胞はグルコース欠乏に対し耐性を示し、このメカニズムの一部に AKT のリン酸化が関わるということが報告されている (Izuishi K, 2000)。

AKT の下流には、細胞の生存や増殖に関わる 160 以上の基質が同定されている。また AKT は細胞の生存に寄与するだけではない、他の機能にも影響している可能性も考えられる。AKT の下流因子として知られる AS160 (AKT substrate of 160 kDa)が活性化すると Glut4 (glucose transporter 4) が細胞膜にトランスロケーションされ、グルコースの取り込み能が亢進する (Watson, R. T, 2006)。細胞外グルコース濃度が低下すると、細胞は上述のメカニズムなどによってグルコースの取り込み能を亢進させ、細胞外のグルコース濃度を維持することも考えられる。

本研究ではグルコース欠乏条件に曝露後きわめて短時間のうちに AKT のリン酸化が生じることを示したが、PANC-1 細胞において、グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化が 24 時間後も維持されていることも示されている (久保田 修士論文 2007)。これらの知見も踏まえ、今後グルコース欠乏により誘導される AKT リン酸化の生理的意義を検討する必要がある。

4-5 NOX4 の制御機構

本研究ではグルコース欠乏下で増加する細胞内過酸化水素の産生場所の同定も行った。ミトコンドリアは様々な系で活性酸素種産生への関与が知られている。グルコース欠乏により増加する細胞内過酸化水素の産生場所もミトコンドリアであるならば、ミトコンドリアを欠失した細胞では細胞内過酸化水素の増加は見られなくなるはずである。須藤はミトコンドリア DNA を欠失させた rho-0 PANC-1 細胞を作製したが、この細胞をグルコース欠乏培地に曝露すると、グルコース欠乏により誘導されるものよりもはるかに大量の細胞内過酸化水素が観察された (須藤, 修士論文 2011)。このため、グルコース欠乏により増加する細胞内過酸化水素の産生場所としてのミトコンドリアの寄与については rho-0 PANC-1 細胞を用いた解析はできなかった。

次に、細胞内活性酸素種の産生場所として NOX4 の関与を検討した。NOX4 のノックダウンによりグルコース欠乏により増加する細胞内過酸化水素及び AKT リン酸化は顕著に抑制され、NOX4 が細胞内活性酸素種の産生に深く関わっていることが明らかになった。グルコース欠乏により増加する細胞内過酸化水素の産生場所が NOX4 であることは、予想外の結果であった。

NOX ファミリーは NADPH を基質として、電子を供与された酸素分子からスーパーオキシドを産生する。NOX1 から NOX4 は二回膜貫通タンパク質である p22phox と

恒常的に会合しており、NOXの安定性に寄与することが知られている。NOX1からNOX3では、活性化タンパク質として p47phox, p67phox, p40phox, Noxa1 などが同定され、活性制御機構が存在する。一方、NOX4は2000年に腎臓と甲状腺で同定され、その生成物としてスーパーオキシドではなく過酸化水素を直接生成している点が他のNOXファミリーと異なっている。また、先に述べたように p22phox との結合は確認されるものの、その活性には p22phox との会合を必要としない。さらにその他のNOXファミリーと異なり、p47phox、p67phoxなどのタンパク質にその活性は依存せず、恒常的に活性化しているとされてきた。ただし近年、増殖因子の刺激によりNOX4の活性化がおこることが報告され、NOX4の活性を制御する機構が存在する可能性も考えられる。細胞内におけるグルコース代謝の中間産物濃度の変動がNOX4の制御に関わっている可能性も考えられ、今後検討する必要がある。一方で、細胞内活性酸素の増大はNOX4など産生系の機能亢進のみならず、細胞の抗酸化能が低下することにより引き起こされることも考えられる。細胞内過酸化水素の総量は、酵素の活性、基質の量に依存する。今後、これらの可能性を考慮し、メタボローム解析などを用い代謝産物全体の動きを検討し何がいかんにして制御物質になっているのかを明らかにする必要がある。

総括

本研究では、細胞外グルコース濃度感知機構の解明を、主になん細胞を用いてグルコース欠乏により誘導される **AKT** リン酸化を一つの指標として取り組んだ。グルコース欠乏により誘導される **AKT** リン酸化は、細胞が解糖系もしくはペントースリン酸回路の中間代謝産物の増減を認識することにより制御されていることを明らかにした。また、過酸化水素がグルコース欠乏により誘導される **AKT** リン酸化のメディエーターとして働き、その産生場所として **NOX4** を同定した。

謝辞

本稿を終えるにあたりまして、国立がん研究センター東病院長 江角浩安先生には、熱心なご指導を賜りましたことを深謝いたします。東京大学大学院 新領域創成科学研究科 土原一哉准教授からは、様々なご助言をいただきました。東京大学大学院 新領域創成科学研究科 落合淳志先生には、実験のことのみならず、国立がん研究センター東病院、臨床開発センター TR 分野の皆様には、研究を進める上で大変お世話になりました。温かく見守っていただいたことを感謝いたします。

参考文献

- Alessi, D. R., M. Andjelkovic, B. Caudwell, P. Cron, N. Morrice, P. Cohen, and B. A. Hemmings, 1996, Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1: *Embo Journal*, v. 15, p. 6541-6551.
- Alvarez-Tejado, M., A. Alfranca, J. Aragonés, A. Vara, M. O. Landazuri, and L. del Peso, 2002, Lack of evidence for the involvement of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in the activation of hypoxia-inducible factors by low oxygen tension: *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 13508-13517.
- Bang, O. S., B. G. Ha, E. K. Park, and S. S. Kang, 2000, Activation of Akt is induced by heat shock and involved in suppression of heat-shock-induced apoptosis of NIH3T3 cells: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 278, p. 306-311.
- Boiteux, A., and B. Hess, 1981, DESIGN OF GLYCOLYSIS: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, v. 293, p. 5-22.
- Bratanova-Tochkova, T. K., H. Y. Cheng, S. Daniel, S. Gunawardana, Y. J. Liu, J. Mulvaney-Musa, T. Schermerhorn, S. G. Straub, H. Yajima, and G. W. G. Sharp, 2002, Triggering and augmentation mechanisms, granule pools, and biphasic insulin secretion: *Diabetes*, v. 51, p. S83-S90.
- Brandes, N., S. Schmitt, and U. Jakob, 2009, Thiol-Based Redox Switches in Eukaryotic Proteins: *Antioxidants & Redox Signaling*, v. 11, p. 997-1014.
- Brown, J. M., and A. J. Giaccia, 1998, The unique physiology of solid tumors: Opportunities (and problems) for cancer therapy: *Cancer Research*, v. 58.
- Brown, J. M., and W. R. William, 2004, Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment: *Nature Reviews Cancer*, v. 4, p. 437-447.
- Burgering, B. M. T., and P. J. Coffer, 1995, PROTEIN-KINASE-B (C-AKT) IN PHOSPHATIDYLINOSITOL-3-OH INASE SIGNAL-TRANSDUCTION: *Nature*, v. 376.
- Cantley, L. C., 2002, The phosphoinositide 3-kinase pathway: *Science*, v. 296, p. 1655-1657.
- Carling, D., 2004, The AMP-activated protein kinase cascade - a unifying system for energy control: *Trends in Biochemical Sciences*, v. 29, p. 18-24.
- Chaneton, B., P. Hillmann, L. Zheng, A. C. L. Martin, O. D. K. Maddocks, A. Chokkathukalam, J. E. Coyle, A. Jankevics, F. P. Holding, K. H. Vousden, C. Frezza, M. O'Reilly, and E. Gottlieb, 2012, Serine is a natural ligand and allosteric activator of pyruvate kinase M2: *Nature*, v. 491, p. 458-+.
- Chayen, J., D. W. Howat, and L. Bitensky, 1986, CELLULAR BIOCHEMISTRY OF

GLUCOSE-6-PHOSPHATE AND 6-PHOSPHOGLUCONATE

DEHYDROGENASE-ACTIVITIES: *Cell Biochemistry and Function*, v. 4, p. 249-253.

Cho, J.-I., N. Ryoo, T.-R. Hahn, and J.-S. Jeon, 2009, Evidence for a role of hexokinases as conserved glucose sensors in both monocot and dicot plant species: *Plant signaling & behavior*, v. 4, p. 908-10.

Crane, R. K., and A. Sols, 1954, The non-competitive inhibition of brain hexokinase by glucose-6-phosphate and related compounds: *The Journal of biological chemistry*, v. 210, p. 597-606.

Cross, J. V., and D. J. Templeton, 2004, Oxidative stress inhibits MEKK1 by site-specific glutathionylation in the ATP-binding domain: *Biochemical Journal*, v. 381, p. 675-683.

D'Autreaux, B. Elsas, L. J., and K. Lai, 1998, The molecular biology of galactosemia: *Genetics in Medicine*, v. 1, p. 40-48.

Esposito, F., G. Chirico, N. M. Gesualdi, I. Posadas, R. Ammendola, T. Russo, G. Cirino, and F. Cimino, 2003, Protein kinase B activation by reactive oxygen species is independent of tyrosine kinase receptor phosphorylation and requires Src activity: *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, p. 20828-20834.

Erlandsen, H., E. E. Abola, and R. C. Stevens, 2000, Combining structural genomics and enzymology: completing the picture in metabolic pathways and enzyme active sites: *Current Opinion in Structural Biology*, v. 10, p. 719-730.

Esumi, H., J. Lu, Y. Kurashima, and T. Hanaoka, 2004, Antitumor activity of pyrvinium pamoate, 6-(dimethylamino)-2-(2-(2,5-dimethyl-1-phenyl-1H-pyrrol-3-yl)ethenyl)-1-methyl-quinolinium pamoate salt, showing preferential cytotoxicity during glucose starvation: *Cancer Science*, v. 95, p. 685-690.

Flick, K. M., N. Spielewoy, T. I. Kalashnikova, M. Guaderrama, Q. Z. Zhu, H. C. Chang, and C. Wittenberg, 2003, Grr1-dependent inactivation of Mth1 mediates glucose-induced dissociation of Rgt1 from HXT gene promoters: *Molecular Biology of the Cell*, v. 14, p. 3230-3241.

Franke, T. F., D. R. Kaplan, and L. C. Cantley, 1997, PI3K: Downstream AKTion blocks apoptosis: *Cell*, v. 88.

Gao, D., S. Nong, X. Huang, Y. Lu, H. Zhao, Y. Lin, Y. Man, S. Wang, J. Yang, and J. Li, 2010, The Effects of Palmitate on Hepatic Insulin Resistance Are Mediated by NADPH Oxidase 3-derived Reactive Oxygen Species through JNK and p38(MAPK) Pathways: *Journal of Biological Chemistry*, v. 285, p. 29965-29973.

Gatenby, R. A., and R. J. Gillies, 2004, Why do cancers have high aerobic glycolysis?: *Nature Reviews Cancer*, v. 4, p. 891-899.

Giannoni, E., F. Buricchi, G. Raugei, G. Ramponi, and P. Chiarugi, 2005, Intracellular reactive oxygen species activate Src tyrosine kinase during cell adhesion and anchorage-dependent cell growth: *Molecular and Cellular Biology*, v. 25.

Ha, J., S. Daniel, S. S. Broyles, and K. H. Kim, 1994, CRITICAL PHOSPHORYLATION SITES FOR ACETYL-COA CARBOXYLASE ACTIVITY: *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 22162-22168.

Hanke, J. H., J. P. Gardner, R. L. Dow, P. S. Changelian, W. H. Brissette, E. J. Weringer, K. Pollok, and P. A. Connelly, 1996, Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor - Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation: *Journal of Biological Chemistry*, v. 271.

Hardie, D. G., 2004, The AMP-activated protein kinase pathway - new players upstream and downstream: *Journal of Cell Science*, v. 117, p. 5479-5487.

Hirayama, A., K. Kami, M. Sugimoto, M. Sugawara, N. Toki, H. Onozuka, T. Kinoshita, N. Saito, A. Ochiai, M. Tomita, H. Esumi, and T. Soga, 2009, Quantitative Metabolome Profiling of Colon and Stomach Cancer Microenvironment by Capillary Electrophoresis Time-of-Flight Mass Spectrometry: *Cancer Research*, v. 69.

Hunter, T., 1987, A TAIL OF 2 SRCS - MUTATIS MUTANDIS: *Cell*, v. 49, p. 1-4.

Ide, T., H. Tsutsui, S. Kinugawa, H. Utsumi, D. C. Kang, N. Hattori, K. Uchida, K. Arimura, K. Egashira, and A. Takeshita, 1999, Mitochondrial electron transport complex I is a potential source of oxygen free radicals in the failing myocardium: *Circulation Research*, v. 85, p. 357-363.

Inagaki, N., T. Gono, J. P. Clement, N. Namba, J. Inazawa, G. Gonzalez, L. Aguilarbryan, S. Seino, and J. Bryan, 1995, RECONSTITUTION OF I-KATP - AN INWARD RECTIFIER SUBUNIT PLUS THE SULFONYLUREA RECEPTOR: *Science*, v. 270, p. 1166-1170.

Izuishi, K., K. Kato, T. Ogura, T. Kinoshita, and H. Esumi, 2000, Remarkable tolerance of tumor cells to nutrient deprivation: Possible new biochemical target for cancer therapy: *Cancer Research*, v. 60, p. 6201-+.

Jain, R. K., 2003, Molecular regulation of vessel maturation: *Nature Medicine*, v. 9.

Jones, D. P., 2008, Radical-free biology of oxidative stress: *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, v. 295, p. C849-C868.

Keller, K. E., I. S. Tan, and Y.-S. Lee, 2012, SAICAR Stimulates Pyruvate Kinase Isoform M2 and Promotes Cancer Cell Survival in Glucose-Limited Conditions: *Science*, v. 338, p. 1069-1072.

Kim, J. H., J. Polish, and M. Johnston, 2003, Specificity and regulation of DNA binding by the yeast glucose transporter gene repressor Rgt1: *Molecular and Cellular Biology*, v. 23, p. 5208-5216.

Kresge, N., R. D. Simoni, and R. L. Hill, 2005, Bernard L. Horecker's contributions to elucidating the pentose phosphate pathway: *Journal of Biological Chemistry*, v. 280.

Less, J. R., T. C. Skalak, E. M. Sevick, and R. K. Jain, 1991, MICROVASCULAR ARCHITECTURE IN A MAMMARY-CARCINOMA - BRANCHING PATTERNS AND VESSEL DIMENSIONS: *Cancer Research*, v. 51.

Maeda, H., Y. Futkuyasu, S. Yoshida, M. Fukuda, K. Saeki, H. Matsuno, Y. Yamauchi, K. Yoshida, K. Hirata, and K. Miyamoto, 2004, Fluorescent probes for hydrogen peroxide based on a non-oxidative mechanism: *Angewandte Chemie-International Edition*, v. 43, p. 2389-2391.

Mochizuki, T., S. Furuta, J. Mitsushita, W. Shang, M. Ito, Y. Yokoo, M. Yamaura, S. Ishizone, J. Nakayama, A. Konagai, K. Hirose, K. Kiyosawa, and T. Kamata, 2006, Inhibition of NADPH oxidase 4 activates apoptosis via the AKT/apoptosis signal-regulating kinase 1 pathway in pancreatic cancer PANC-1 cells: *Oncogene*, v. 25, p. 3699-3707.

Mullane, K., D. Bullough, and D. Shapiro, 1993, FROM ACADEMIC VISION TO CLINICAL REALITY - A CASE-STUDY OF ACADESINE: *Trends in Cardiovascular Medicine*, v. 3, p. 227-234.

Nathan, C., 2003, Specificity of a third kind: reactive oxygen and nitrogen intermediates in cell signaling: *Journal of Clinical Investigation*, v. 111, p. 769-778.

Nomura, M., A. Kaji, W. Y. Ma, S. P. Zhong, G. M. Liu, C. T. Bowden, K. Miyamoto, and Z. G. Dong, 2001, Mitogen and stress-activated protein kinase 1 mediates activation of Akt by ultraviolet B irradiation: *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, p. 25558-25567.

Ozcan, S., and M. Johnston, 1999, Function and regulation of yeast hexose transporters: *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 63, p. 554-+.

Racker, E., 1974, History of the Pasteur effect and its pathobiology: *Molecular and cellular biochemistry*, v. 5, p. 17-23.

Rolland, F., J. Winderickx, and J. M. Thevelein, 2001, Glucose-sensing mechanisms in eukaryotic cells: *Trends in Biochemical Sciences*, v. 26, p. 310-317.

Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, S. M. Ali, and D. M. Sabatini, 2005, Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex: *Science*, v. 307, p. 1098-1101.

Skulachev, V. P., 1996a, Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants: *Quarterly Reviews of Biophysics*, v. 29, p. 169-202.

Smith, L. K., C. J. Vlahos, K. K. Reddy, J. R. Falck, and C. W. Garner, 1995, WORTMANNIN AND LY294002 INHIBIT THE INSULIN-INDUCED DOWN-REGULATION OF IRS-1 IN 3T3-L1 ADIPOCYTES: *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 113, p. 73-81.

- Spickett, C. M., A. R. Pitt, N. Morrice, and W. Kolch, 2006, Proteomic analysis of phosphorylation, oxidation and nitrosylation in signal transduction: *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, v. 1764, p. 1823-1841.
- Stefanelli, C., I. Stanic, F. Bonavita, F. Flamigni, C. Pignatti, C. Guarnieri, and C. M. Caldarera, 1998, Inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis with 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase: *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 243, p. 821-826.
- Sumimoto, H., 2008, Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species: *Febs Journal*, v. 275, p. 3249-3277.
- Tanaka, M., K. Sasaki, R. Kamata, Y. Hoshino, K. Yanagihara, and R. Sakai, 2009, A Novel RNA-Binding Protein, Ossa/C9orf10, Regulates Activity of Src Kinases To Protect Cells from Oxidative Stress-Induced Apoptosis: *Molecular and Cellular Biology*, v. 29, p. 402-413.
- Suzuki, A., G. Kusakai, A. Kishimoto, J. Lu, T. Ogura, M. F. Lavin, and H. Esumi, 2003b, Identification of a novel protein kinase mediating Akt survival signaling to the ATM protein: *Journal of Biological Chemistry*, v. 278, p. 48-53.
- Suzuki, A., H. Lu, G. I. Kusakai, A. Kishimoto, T. Ogura, and H. Esumi, 2004b, ARK5 is a tumor invasion-associated factor downstream of Akt signaling: *Molecular and Cellular Biology*, v. 24, p. 3526-3535.
- Suzuki, A., G. Kusakai, A. Kishimoto, Y. Shimojo, S. Miyamoto, T. Ogura, A. Ochiai, and H. Esumi, 2004a, Regulation of caspase-6 and FLIP by the AMPK family member ARK5: *Oncogene*, v. 23, p. 7067-7075.
- Suzuki, A., G. Kusakai, A. Kishimoto, J. Lu, T. Ogura, and H. Esumi, 2003a, 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*, v. 22, p. 6177-6182.
- Thomas, S. M., and J. S. Brugge, 1997, Cellular functions regulated by Src family kinases: *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 13, p. 513-609.
- Thomlinson, R. H., and L. H. Gray, 1955, The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy: *British journal of cancer*, v. 9.
- Tower, D. B., 1958, The effects of 2-deoxy-D-glucose on metabolism of slices of cerebral cortex incubated in vitro: *Journal of neurochemistry*, v. 3, p. 185-205.
- Warburg, O., 1956, On the origin of cancer cells: *Science (New York, N.Y.)*, v. 123, p. 309-14.
- Watson, R. T., and J. E. Pessin, 2006, Bridging the GAP between insulin signaling and GLUT4 translocation: *Trends in Biochemical Sciences*, v. 31, p. 215-222.

Winterbourn, C. C., and M. B. Hampton, 2008, Thiol chemistry and specificity in redox signaling: *Free Radical Biology and Medicine*, v. 45, p. 549-561.

Zhang, R. L., M. L. Brennan, Z. Z. Shen, J. C. MacPherson, D. Schmitt, C. E. Molenda, and S. L. Hazen, 2002, Myeloperoxidase functions as a major enzymatic catalyst for initiation of lipid peroxidation at sites of inflammation: *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, p. 46116-46122.

久保田秀行 (2007) がん細胞での栄養飢餓反応のシグナル伝達解析 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 修士論文

須藤夏希 (2011) KigamicinD により glucose 欠乏選択的に増大する活性酸素種の細胞死における役割と発生機構の解明 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 修士論文