

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

# ゲノムワイド shRNA ライブラリーを用いた低酸素 適応遺伝子の網羅的探索と解析

氏名 芳野聖子

### 【背景】

好気性の生物にとって酸素はエネルギー産生に重要な役割を果たす。通常組織は比較的安定した酸素分圧下にあるが、一旦急性炎症や虚血性疾患などの病変が形成されると、これらの組織における酸素濃度は 1% O<sub>2</sub> に満たない低酸素状態へと変化する。細胞は、通常酸素分圧下ではミトコンドリア依存性のエネルギー代謝（酸化的リン酸化）を用いてエネルギー分子である ATP を大量に産生する。一方、低酸素下では酸素を利用出来ないことから、ATP 産生効率の悪い解糖系がエネルギー供給源となる。このように、酸素濃度の変化は細胞の生存・機能に大きな影響を与えられ考えられる。また、癌組織では十分な機能を保持した血管が形成されないため、激しい低酸素状態から比較的通常酸素分圧に近い箇所まで幅広い酸素濃度が組織内に存在し、長時間それぞれの酸素濃度にさらされる中で癌細胞は生存・増殖を続けている。

好気性生物は進化の過程で、自身を取り巻く細胞環境の酸素濃度を感知し応答するシステムを構築し、酸素利用度に合ったエネルギー産生系を稼働することで、様々なレベルの低酸素環境下の生存を図ってきた。低酸素環境下では、代謝調節、血管新生、アポトーシスの制御、細胞周期、タンパク合成の変化など多様な生理応答を誘発する。一方で、酸素は生体に取り込まれるとミトコンドリアのエネルギー産生の際、一部が過酸化水素や超酸化物イオンなどの活性酸素種に変化する。通常酸素下において、活性酸素種を適切に除去することは細胞増殖に重要であり、ここに異常が生じると老化や癌化を引き起こす。このように酸素依存性の細胞増殖の仕組みを理解することは、生理的、病的にも非常に重要なことであるが、我々の知見は限られたものである。そこで、どのような遺伝子が酸素応答性の細胞増殖に関わるかを解明するため、本研究ではゲノムワイド shRNA ライブラリーを用いた網羅的探索を行った。

## 【実験方法と実験結果】

### 1. 酸素依存性の細胞増殖に関わる遺伝子の同定

肺癌細胞株 PC8 にゲノムワイド shRNA ライブラリーである GeneNet™ Human 50K shRNA Library (SBI)を導入し、ライブラリー導入細胞を作製した。この癌細胞株を通常酸素下（酸素 21%）、低酸素下（酸素 1%）で培養した。ライブラリーの 10 倍以上の集団を常に保持した条件で 10 回継代し、total RNA を回収し、逆転写を行った。shRNA カセット部分を PCR で増幅し Affymetrix U133+2 GeneChip® Array で解析した。使用したライブラリーは各遺伝子に対し 4-5 の shRNA 配列を持つため、再現実験の確率を高めるために 4 つ以上の shRNA 配列が有意に変化したものを候補遺伝子として選出し、56 遺伝子を得た。アレイ解析により選出された候補遺伝子に対して、再度 shRNA を導入してノックダウン細胞を作製し、通常酸素下、低酸素下での増殖アッセイを行い、アレイ解析と同様の結果が出る遺伝子を同定した。また shRNA のオフターゲット効果を排除するため、異なるターゲット配列での shRNA を作製して同様の解析を行った。その結果、13 個の遺伝子が新たに酸素依存性の細胞増殖に影響を与えることが明らかとなった。これらの遺伝子の中には低酸素応答性アポトーシス阻害因子である BCL2L1 が含まれていた。一方で、他の 12 遺伝子は、酸素依存性の増殖に関する報告が過去に無い遺伝子群であった。このことから、本研究の目的である、酸素依存性の細胞増殖に影響を与える新規遺伝子を同定することが出来た。

### 2. RNF126 は通常酸素下で乳酸産生を制御する

続いて、これらの新規遺伝子の中から RNF126 に着目し、RNF126 がストレス応答にどのように関わり、癌細胞の生体での増殖にどのように影響しているのか解析を行った。まず、shRNA 発現レンチウイルスを用いて RNF126 の安定ノックダウン細胞を作製し、増殖アッセイを行った。RNF126 ノックダウン細胞では、通常酸素下での増殖が有意に減少することが明らかとなった。通常酸素下では、生存・増殖に必要なエネルギーは主にミトコンドリアの酸化的リン酸化で産生される。このことから、RNF126 ノックダウン細胞が通常酸素下の増殖に異常を示す原因として、通常酸素下のエネルギー代謝経路である解糖系と酸化的リン酸化の代謝バランスに問題が起きている可能性が考えられた。そこで、代謝変化と RNF126 について解析した。その結果、RNF126 ノックダウン細胞では解糖系の最終代謝産物である乳酸のレベルが上昇していた。一方で、グルコースの消費量には変化が無かった。

この原因をさらに明らかにするため、細胞の解糖系と酸化的リン酸化の代謝バランスを制御する分子である、PDK1 と LDHA の発現解析を行った。PDK1(pyruvate dehydrogenase kinase 1)は、ピルビン酸からアセチル CoA に変換する酵素 PDH (pyruvate dehydrogenase) の阻害因子である。また、LDHA (Lactate dehydrogenase A)はピルビ

ン酸を乳酸へ変換する。PDK1 と LDHA は、低酸素下で発現誘導され、酸化的リン酸から解糖系への代謝シフトを促進する。RNF126 ノックダウン細胞において、PDK1 と LDHA の発現解析をした結果、PDK1 のタンパクレベルが上昇している事が明らかとなった。一方、LDHA の発現レベルに変化は無かった。リアルタイム PCR による解析から、RNF126 ノックダウン細胞の、PDK1 mRNA レベルに変化は無かったことから、RNF126 は転写レベルでは無く、タンパクレベルで PDK1 を調節していることが示唆された。このことから、PDK1 のタンパク安定性について解析するため、プロテアソーム阻害剤である MG132 を用いた実験を行った。その結果、MG132 で処理したコントロール細胞では、タンパクレベルが著しく上昇したのに対し、ノックダウン細胞ではわずかに上昇するのみであった。このことから、RNF126 は、PDK1 をプロテアソーム依存的に分解している可能性が示唆された。

### **3. RNF126 は PDK1 の E3 ユビキチンリガーゼである**

RNF126 は、E3 ユビキチンリガーゼに共通に見られる RING-finger ドメインを有することがアミノ酸配列から判断された。このことから、RNF126 は PDK1 のユビキチン化を促進するかどうか解析を行った。HEK293 細胞に、一過性に V5-RNF126、FLAG-PDK1 又は LDHA、HA-ユビキチンを共発現させた。FLAG 抗体で免疫沈降し HA 抗体で検出した。RNF126 は、PDK1 を特異的にポリユビキチン化することが明らかとなった。また、In vitro のユビキチンアッセイにおいても、RNF126 は PDK1 をユビキチン化することが示された。RING-finger ドメインは、E2 結合酵素と結合するだけでなく、酵素活性を持つ。RNF126 の RING-finger ドメイン欠損変異体では、PDK1 をユビキチン化出来ない事が分かった。

### **4. 低酸素下では PDK1 発現が著しく誘導され RNF126 の分解能を超える**

さらに、低酸素下で RNF126 は PDK1 を制御するのかについて検討した。PDK1 は低酸素下で発現が著しく上昇するのに対して、RNF126 ではほとんど変化は無かった。そこで、RNF126 ノックダウン細胞を低酸素下で処理すると、通常酸素下では PDK1 タンパクの増加が見られたのに対し、低酸素下ではほとんど変化が見られなくなる事が明らかとなった。このことから、低酸素下では PDK1 は HIF-1、Myc 等の誘導により高発現するため、RNF126 による PDK1 の分解が追いつかなくなる可能性が考えられた。

### **5. RNF126 は MDA-MB-231 細胞、A549 細胞の造腫瘍能に重要である**

続いて、RNF126 が造腫瘍性に関わるかどうか明らかにするため、MDA-MB-231、A431 細胞で、RNF126 ノックダウン細胞を作製した。そして、ヌードマウス皮下での造腫瘍能を解析した結果、RNF126 ノックダウン細胞では有意に造腫瘍能が低下している事が明らかとなった。また、RNF126 ノックダウン細胞では PDK1 タンパクレベルの増加が見られたことから、PDK1 が造腫瘍性に関わるかどうか検討した。PDK1 過剰発現細胞をヌードマウス皮下に移植し造腫瘍能を解析した結果、PDK1 過剰発現細胞では有意に造腫瘍能が

低下していた。この結果は、RNF126 ノックダウン細胞を用いた結果と一致していた。このことから、PDK1 タンパクレベルは造腫瘍性に重要であることが明らかとなった。

### 【結語】

本研究では、ゲノムワイド shRNA スクリーニングを用いて、酸素依存性の細胞増殖に重要な遺伝子の探索を行い、13 個の遺伝子を同定した。この中で、RNF126 は通常酸素下において PDK1 のタンパク分解を制御することで、解糖系と酸化的リン酸化のエネルギー代謝のバランスを調節し、癌細胞の造腫瘍性に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。RNF126/PDK1 経路は腫瘍形成における弱点であり、有望な治療標的となる可能性がある。また、本研究で得られた知見は、癌以外にも細胞増殖やエネルギー代謝の異常に起因する様々な疾患の研究にも貢献することが期待される。