

各種ステロイドホルモン受容体による 転写活性化のモジュレーターとしての ビタミン B₆

ビタミン B₆ (B₆) の活性型であるピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) は、B₆ 依存性酵素の補酵素としてアミノ酸代謝や神経系の機能において重要な役割を果たす。さらに、PLP はステロイドホルモンの作用に関して補酵素作用以外の機構で影響を及ぼす。即ち、PLP はステロイドホルモン受容体の立体構造とサブユニット組成を変化させたり、同受容体の DNA との結合ならびに核内への局在化を阻害したりすることが知られている¹⁾。

ステロイドホルモンは標的遺伝子の発現を通して生物学的効果を発揮する。そのため、ステロイドホルモン作用に対する PLP の影響は、ステロイドホルモンによるステロイドホルモン感受性遺伝子の転写誘導に対する PLP の効果に基づいて調べられてきた。グルココルチコイドによるチロシンアミノトランスフェラーゼ活性²⁾とアルカリホスファターゼ活性³⁾の誘導ならびにカゼイン mRNA の誘導⁴⁾は、B₆ の細胞培養液への添加により細胞内の PLP 濃度が上昇すると抑制され、反対に B₆ を制限した条件でこの誘導は増大した。最近、これらの知見がより確実になり、さらに B₆ のモジュレーション作用が広くステロイドホルモン受容体全般に及んでいることが明らかになった。

1990年に Allgood ら⁵⁾は HelaS₃ 細胞 (この細胞はグルココルチコイド受容体を持っているが、その他のステロイドホルモンの受容体を持っていない) にグルココルチコイド感受性でクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) 遺伝子をレポーターとして含むプラスミド (pGMCS) をトランスフェクトして、この細胞内でのグルココルチコイド受容体 (グルコ R) の機能に対する B₆ 濃度の影響を調べた。この細胞はピリドキシン (PN, 1 mM) あるいは 4-デオキシピリドキシン (DPN, 5 mM) で処理すると、細胞内の PLP 濃度がコントロール (0.175 ± 0.013 μmol/mg シトソールタンパク質) に比べ、それぞれ 0.461 ± 0.073 に増加あるいは 0.124 ± 0.028 に減少した。それに伴い、コントロールでデキサメタゾンによって誘導される CAT 活性 100% に対し、PN 処理では 50% に減少し、DPN 処理では 280% に増大した。これらの条件下でグルコ R mRNA レベル、グルコ

Rタンパク質濃度ならびにグルコ R のステロイドホルモン結合能 (解離定数と結合数) は変化しなかった。これらの結果は、PLP がグルコ R の核内への移行や DNA との結合を阻害することでグルコ R の作用に影響を及ぼしている可能性を強く支持する。

1992年に Allgood と Cidlowski⁶⁾は Hela 細胞以外の細胞について、PN 処理による細胞内の PLP 濃度の増加がそれら細胞中のグルコ R による転写活性化に及ぼす影響を調べた。また、グルココルチコイド以外のステロイドホルモン受容体により調節されている遺伝子発現に対して細胞内に蓄積した PLP が如何なる影響を及ぼすかも調べた。

ネズミ L929 繊維芽細胞に pGMCS をトランスフェクトした後、PN を含む培地で処理すると同細胞内に存在するグルコ R によって調節される転写レベルが 40~60% だけ抑制された。また、ともにグルコ R を生合成できない細胞である、ネズミ L929 繊維芽細胞由来の E8.2 細胞とヒト乳癌由来の T47D 細胞については、グルコ R 発現プラスミド (pRShGR) と pGMCS を同時にインフェクトさせて PLP の効果を調べた。その結果、この場合も PLP はグルコ R によって調節される転写レベルを抑制した。一方、これら 3 種類の細胞は DPN の添加によって細胞内の PLP レベルを下げると転写レベルが 60~110% だけ増大した。グルココルチコイドに依存しないで発現される低レベルの CAT 活性は細胞内 PLP 濃度によって変化しなかった。

次いでアンドロゲン、プロゲステロンならびにエストロゲン受容体による転写調節に及ぼす B₆ の効果を調べた。pGMCS はマウス乳癌ウイルス (MMTV) プロモーターを持っているためグルココルチコイドだけではなくアンドロゲンとプロゲステロンによっても、細胞内に各々のホルモンの受容体が存在すれば CAT 活性を発現する。そこでアンドロゲン受容体を持っているが、グルコ R やプロゲステロン受容体を持たない E8.2 細胞に pGMCS をインフェクトさせアンドロゲンにより CAT を転写発現させ、さらにこの転写に及ぼす B₆ の影響を調べた。同時に、プロゲステロン受容体は充分量持つが、グルコ R とアンドロゲン受容体を充分量持たない T47D 細胞でも同様に B₆ の効果を調べた。その結果、両細胞とも、各々のステロイドホルモン受容体によって仲介される遺伝子発現は PN 添加により抑えられ、DPN によって増大した。次いで MMTV プロモーターとは無関係のプロモ-

ター配列に基づいて転写活性化されるエストロゲン受容体による転写活性化調節に対する B_6 の効果を調べた。即ち、内在性のエストロゲン受容体を持たない Hela 細胞にヒトエストロゲン発現ベクター (pHEO) とエストロゲン応答性 CAT レポータープラスミド (pERENFICAT) を同時にトランスフェクトさせ、エストロゲンによる CAT 活性の発現に及ぼす PN と DPN の効果を調べた。その結果、この場合も前出のステロイドホルモンと同様に PN によって CAT 活性の発現が抑制され、DNP によって反対に増大した。

これらの結果と、従来の知見を照し合わせると B_6 がステロイドホルモン受容体を仲介とする転写活性化のレベルで色々なステロイドホルモン受容体の生物学的作用をモジュレートしていることがほぼ確実となった。今後、ステロイドホルモン受容体の構造と機能、さらに PLP との相互作用の関する研究の進展により B_6 の新規機能様式の解明が期待される。

(高知大農 生物資源科学 八木 年晴)

文 献

- 1) 拓殖治人: ビタミンハンドブック⑤ (日本ビタミン学会; 化学同人, 京都) pp. 105-111 (1989)
- 2) DiSorbo, D.M., Litwack, G.: Biochem. Biophys. Res. Commun., **99**, 1203-1208 (1981)
- 3) Compton, M.M., Cidlowski, J.A.: Endocrinol. Rev., **7**, 140-148 (1986)
- 4) Majunder, P.K., Joshi, J.B., Banerjee, M.R.: J. Biol. Chem., **258**, 6793-6798 (1983)
- 5) Allgood, V.E., Powell-Oliver, F.E., Cdlowski, J.A.: J. Biol. Chem., **265**, 12424-12433 (1990)
- 6) Allgood, V.E., Cidlowsky, J.A.: J. Biol. Chem., **267**, 3819-3824 (1992)

癌細胞における新規ビタミン B_6 代謝産物

ビタミン B_6 (B_6) は腫瘍や癌細胞においても生育に必須の因子であるが、その代謝は十分に解明されているわけではない。移植癌の Morris ヘパトーマ 7777 および 9618A₂ ではピリドキサル 5'-リン酸 (PLP) の生成に関与するピリドキサルキナーゼとピリドキサミン 5'-リン酸 (またはピリドキシン 5'-リン酸) オキシダーゼの酵素活性は著しく低く、PLP レベルも顕著に低い¹⁾。このようにヘパトーマは見かけ上 B_6 欠乏にあるにもかかわらず急速に増殖する。癌細胞や腫瘍における PLP 供給の機構についても未解決の点が多い。

Tryfiates らは種々の腫瘍や癌細胞においてピリドキシン (PN) は新規物質 (B_6X) に代謝されることを見だし、今後の研究の発展によっては B_6X は癌マーカーとして、あるいは癌の転移の検出に利用できるようになるであろうと述べている。以下に彼らの研究の概要を紹介する。

彼らは²⁾癌組織における B_6 の代謝を明らかにする目的で [³H] または [¹⁴C]PN を Morris ヘパトーマ 7777 担癌ラットに投与して、癌組織における放射性 PN の取り込みを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって調べた。その結果、PN は癌組織においては既知の B_6 化合物に加えて、それらとはクロマトグラフ的に異なる化合物 B_6X に代謝されることを明らかにした。また B_6X は癌組織のみならず宿主肝臓と腎臓にも存在した。しかし、正常ラットの組織や再生肝にはほとんど認めることができなかった。

B_6X はヒト腎腫瘍、HL-60 ヒト前骨髄性白血病、マウス Ag-8 骨髄腫および 3B3 マウス/ヒトハイブリドーマの細胞においても生成された。Morris ヘパトーマ 7777 細胞によって放射性 PN から生成された B_6X は、調製用逆相 HPLC によって精製、単離され、その構造が調べられた。ピリジン部分の構造は FTNMR スペクトルから、リン酸、硫化物、アミン、ペントースの存在は官能基試験から、シッフ塩基結合の存在は UV, IR スペクトルから明らかにされ、さらに MS のデータからその構造は adenosine-N⁶-methyl, propylthioether-N-pyridoximine 5'-phosphate と推測された。

上述のように、 B_6X はマウス骨髄腫 X63-Ag 8.653 細胞とヒトリンパ球を融合した 3B3 ハイブリドーマ細胞においても生成される。彼らは³⁾ハイブリドーマ細胞を単層培養した後、[G-³H]PN, [2,8-³H]アデノシン, [³⁵S]シスチン, [³⁵S]メチオニンまたは [U-¹⁴C]セリンを含む RPMI-C 培地に移して培養を行い、これらの B_6X への取り込みを調べるとともに PN の代謝産物を解析した。投与された [G-³H]PN の 14.2% が代謝された。代謝産物の内訳は PLP, 18.5%; ピリドキサル, 68.3%; ピリドキシン酸, 5.0%; B_6X 8.2% であったが、ピリドキサミンとピリドキサミン 5'-リン酸への変換率については記載がない。PN, アデノシン, シスチンおよびセリンはいずれも B_6X に取り込まれた。前 3 者とは異なり、セリンの最大の取り込みには 45 分間という長時間を要した。 B_6X の硫黄原子はメチニオンではなくシステ