

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06132

研究課題名(和文) PICT1を起点とした核小体ストレス経路の解明と癌制御

研究課題名(英文) Study of PICT1-mediated nucleolar stress response and tumorigenesis

研究代表者

前濱 朝彦 (Maehama, Tomohiko)

神戸大学・医学研究科・准教授

研究者番号：40322755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：核小体はリボソーム合成を担う場であるとともにリボソーム合成を監視する場でもある。リボソーム合成の異常は核小体ストレスと呼ばれる細胞応答を引き起こし、p53活性化を介した細胞周期の停止や細胞死誘導へとつながる。本研究では、(1) 核小体タンパク質PICT1とその安定化因子Xとの結合がリボソームRNA前駆体によって制御されていること、(2) 核小体ストレスに曝されリボソームRNA前駆体が減少するとPICT1-Xの解離が起ること、(3) その結果PICT1の分解からp53活性化につながる一連の応答が引き起こされることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、これまでほとんど解明されていなかった核小体ストレス応答の分子機構、特にストレスを検知する分子の同定に大きく近づいたと思われる。核小体ストレスはp53を活性化して細胞増殖の停止や細胞死誘導を引き起こす内在性の経路として近年注目されており、本研究によって同定された分子群を標的とした創薬、中でも抗がん薬の開発への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The nucleolus is a site for ribosome biogenesis and surveillance center for this process. Impaired ribosome biogenesis, which is detected in the nucleolus, induces nucleolar stress response, eventually leading to p53 activation, followed by cell cycle arrest and/or apoptotic cell death. In this study, we found that (1) a particular region of pre-rRNA regulates the binding of nucleolar protein PICT1 and its stabilizer X; (2) nucleolar stress decreased the amount of pre-rRNA to induce dissociation of PICT1-X complex; (3) the dissociated PICT1 became unstable and degraded then triggered the signal that led to p53 activation.

研究分野：生化学・分子腫瘍学

キーワード：核小体ストレス PICT1

1. 研究開始当初の背景

自然環境中で活動する個体・細胞は様々なストレスに曝されており、これらのストレスに対する様々な反応をおこすことによってその恒常性を維持している。真核細胞核内の小器官である核小体は古典的にはリボソーム生合成を担う場として認識されてきたが、近年ではストレス検知の場としての役割が大きく注目されている。核小体が検知するストレスは、主にリボソーム生合成の異常(リボソーム RNA (rRNA) 転写や rRNA プロセッシングなどの異常)によって惹起されるものであり、核小体ストレスあるいはリボソームストレスと呼ばれる。細胞が核小体ストレスを検知した場合、L11 や L5、S7 といったリボソームタンパク質群が核小体から核質へと移行し、これらが核質にある E3 リガーゼ MDM2 を阻害することで p53 活性化が誘導される。我々はこれまでの研究の中で、核小体ストレス応答において中心的な役割を担うリボソームタンパク質 L11 の動態が PICT1 によって制御されていることを見出した (Nat Med 17, 944)。PICT1 は L11 を核小体に繋ぎ留めて核質への流出を抑えているが、核小体ストレスに曝された場合には、PICT1 自身がプロテアソームによって分解されて消失してしまう (JBC 289, 20802)。その結果、L11 が核質へと移行し MDM2 の阻害を介して p53 を活性化する (図 1)。この PICT1 の分解は核小体ストレス応答において重要なプロセスであり、私達はこれまでに、(1) PICT1 は極めて不安定な天然変性タンパク質であること、(2) 細胞内には PICT1 に結合して PICT1 の安定化に寄与する安定化因子 X が存在すること、(3) PICT1 と X の結合は核小体ストレスに応答して解離すること、を見出している (図 2)。しかしながら細胞がどのようにして核小体ストレスを感知し、PICT1-X にシグナルを伝えているのかは未だ不明である。また、PICT1 は大腸癌等の予後決定する因子であることから (Nat Med 17, 944)、PICT1 下流の L11 を介した p53 制御が癌の進展等に関わっていることが予想されるが、核小体ストレス経路の異常と癌発症との関連性は不明である。

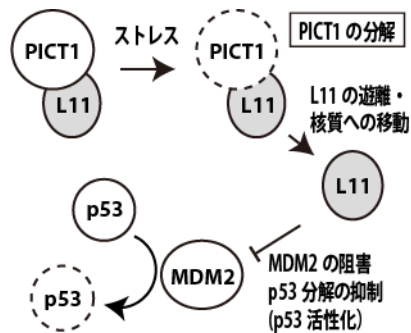


図 1. ストレスによる PICT1 分解および L11-MDM2 経路を介した p53 活性化

PICT1 自身がプロテアソームによって分解されて消失してしまう (JBC 289, 20802)。その結果、L11 が核質へと移行し MDM2 の阻害を介して p53 を活性化する (図 1)。この PICT1 の分解は核小体ストレス応答において重要なプロセスであり、私達はこれまでに、(1) PICT1 は極めて不安定な天然変性タンパク質であること、(2) 細胞内には PICT1 に結合して PICT1 の安定化に寄与する安定化因子 X が存在すること、(3) PICT1 と X の結合は核小体ストレスに

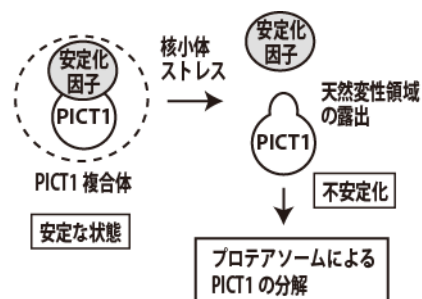


図 2. ストレスによる PICT1 安定化因子の解離、天然変性領域の露出、そしてプロテアソームによる分解

2. 研究の目的

本研究では、(1) 核小体ストレス応答の分子機構を明らかにするため、PICT1 を起点としてストレス感知を担う分子 (ストレスセンサー分子) の同定を行い、さらに、(2) 核小体ストレスの生理的意義、特に核小体ストレスによる癌制御を明らかにするため、PICT1 安定化因子 X の遺伝子改変マウスを作成する。

3. 研究の方法

(1) rRNA 前駆体の解析

U2OS 細胞にアクチノマイシン D (ActD) を 5 nM になるように添加し、0、2、4、8、12 時間後に細胞から RNA を調製した。RNA 調製には RNAiso を用いた。各 RNA から cDNA を合成した後、5' ETS、3' ETS、ITS1、ITS2、18S、28S 領域を標的とするプライマーを用いて qPCR を行い、それぞれの量の变化を解析した。B2M に対する qPCR も同時に行い、内部標準とした。

(2) 細胞内での PICT1-X 結合の解析

Myc タグを付加した PICT1 を安定発現する U2OS 細胞に ActD を 5 nM になるように添加し、0、2、4、8、12 時間後に細胞からライセートを調製した。抗 Myc 抗体による免疫沈降を行い、Myc-PICT1 に結合している X をウェスタンブロットによって検出し、PICT1-X 結合を評価した。

(3) PICT1、X、p53 発現量の解析

U2OS 細胞にアクチノマイシン D (ActD) を 5 nM になるように添加し、0、2、4、8、12 時間後に細胞からライセートを調製し、ウェスタンブロットによって PICT1、X、p53 の発現量を評価した。内部標準には GAPDH あるいは Actin を用いた。同様の処理をした細胞から RNA を調製し、cDNA を合成した後、qPCR を行い、PICT1、X の転写量には変化がないことを確認した。

(4) RNA-IP

Myc タグを付加した PICT1 を安定発現する U2OS 細胞に ActD を 5 nM になるように添加し、0、2、4、8、12 時間後に細胞からライセートを調製した。抗 Myc 抗体による免疫沈降を行い、Myc-

PICT1 に結合している RNA を抽出した後、cDNA 合成を行い、qPCR によって PICT1 に結合した RNA 量を解析した。qPCR のプライマーには 47S rRNA 前駆体の様々な領域を検出するものを用いた。

(5) リコンビナント PICT1 タンパク質の調製

ヒト PICT1 のコード領域を pET-28a に組み込んだプラスミド DNA を用いて大腸菌 Rosetta-gami2(DE3)株を形質転換し、常法に従って IPTG による発現誘導を行った。His タグが付加された PICT1 タンパク質は Ni-NTA ビーズを用いて 8 M 尿素存在下でアフィニティー精製を行った後、G-50 ゲルろ過カラムを用いたリフォールディングを行うことで調製した。

(6) リコンビナント X タンパク質の調製

ヒト X のコード領域を pMAL-cR1 に組み込んだプラスミド DNA を用いて大腸菌 BL21 株を形質転換し、常法に従って IPTG による発現誘導を行った。MBP タグが付加された X タンパク質は Amylose レジンをを用いたアフィニティー精製を行い調製した。

(7) RNA の合成

目的とする rRNA をコードする rDNA 領域を、5' 末端に T7 配列を付加して PCR にて増幅した。精製した PCR 産物を鋳型として RNA 合成を行った。RNA 合成には MEGAScript(T7)を用いた。

(8) *in vitro* PICT1-X 結合アッセイ

MBP-X タンパク質を固定した Amylose レジンに His-PICT1 タンパク質を加え、合成した RNA を添加した後、4 で 12 時間インキュベートした。遠心によってレジンを回収したのち、レジンをバッファーで洗浄し、レジンに残った MBP-X および PICT1 タンパク質をウェスタンブロットにより評価した。

(9) X 遺伝子改変マウスの作成

X 遺伝子への loxP 配列の導入 (エクソン 1-2 間のイントロン領域およびエクソン 5-6 間のイントロン領域) は CRISPR/Cas9 法を用いて行った。マウスの維持、生育、交配は常法に従って行った。

4. 研究成果

(1) 核小体ストレス応答の分子機構の解明

成熟したリボソームは 28S、18S、5.8S、5S の 4 種の rRNA を構成因子として有する。このうち 28S、18S、5.8S の 3 種は RNA ポリメラーゼ I (Pol I) によって転写される 47S rRNA 前駆体がプロセッシングを受けることで生成される。Pol I の阻害が核小体ストレスを強力に誘導することから、本研究ではまず Pol I 阻害による 47S rRNA 前駆体の減少と核小体ストレス応答の経時変化を比較検討した (図 3)。Pol I 阻害剤としてアクチノマイシン D (ActD) を用いたところ、ActD 処理後約 4-8 時間で rRNA 前駆体はほとんど消失し (図 3A)、8-12 時間で PICT1-X 結合の解離が起り (図 3B)、12 時間後に p53 応答が起ることを見出した (図 3B)。この結果は rRNA 前駆体の消失が PICT1-X 結合の解離を促していることを示唆している。一方、RNA 結合を予測するプログラムでの解析の結果、PICT1 が RNA 結合能を有している可能性が示された (図 4)。そこで RNA-

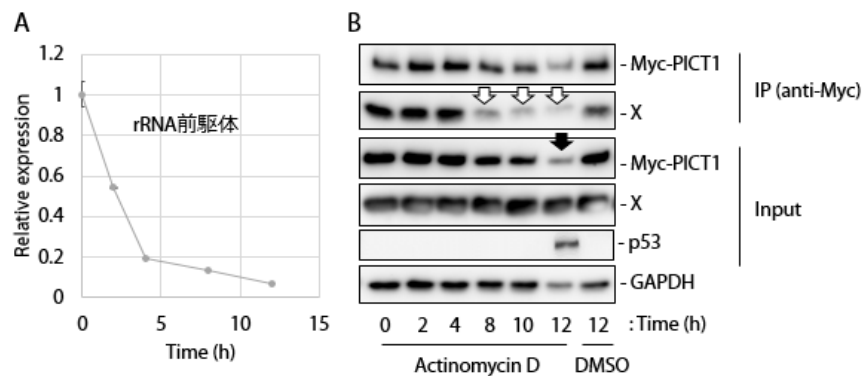


図3. 核小体ストレス(Actinomycin D処理)による (A) rRNA前駆体の減少および (B) PICT1-Xの解離、PICT1分解、p53活性化  
白矢印: PICT1に結合したXの解離、黒矢印: PICT1の分解

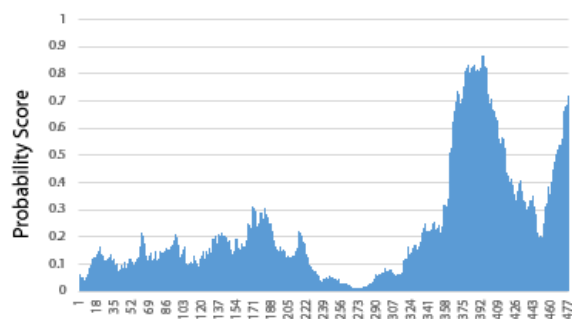


図4. DisorDPbindによるPICT1タンパク質のRNA結合領域予測

IP によって PICT1 と rRNA 前駆体との結合を検証したところ、PICT1 は rRNA 前駆体の特定の領域と結合することが明らかとなり、また ActD 処理による rRNA 前駆体の減少に伴って、その結合も減少することが示された。次に大腸菌の発現系を用いてリコンビナント PICT1 タンパク質および X タンパク質を調製し、*in vitro*での PICT1-X 結合に対する RNA 分子の影響を解析した。その結果、前述の RNA 分子の存在下では PICT1-X 結合が促進されることを新たに見出した。これらの結果から、(1) PICT1 - X 結合はある種の RNA 分子との結合によって維持されていること、(2) 核小体ストレス下ではこの RNA 量が減少することで PICT1 - X 結合の解離がおこること、(3) X の解離によって PICT1 が不安定化し、その後の p53 活性化につながることを強く示唆された。

#### (2) PICT1 安定化因子遺伝子改変マウスの作成

X 遺伝子のエクソン 1-2 間のイントロン領域およびエクソン 5-6 間のイントロン領域に loxP 配列を挿入した flox マウスを作出した。Rosa26:CreERT2 マウスとの交配により Cre-ERT2  $X^{flox/flox}$  マウスを作成し、タモキシフェン投与によって X 遺伝子の欠損（エクソン 2-5 の欠損）を誘導し、X 阻害による *in vivo*での核小体ストレスの生理的意義や癌制御の解析を可能とした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Omori Hirofumi, Nishio Miki, Masuda Muneyuki, Miyachi Yosuke, Ueda Fumihito, Nakano Takafumi, Sato Kuniaki, Mimori Koshi, Taguchi Kenichi, Hikasa Hiroki, Nishina Hiroshi, Tashiro Hironori, Kiyono Tohru, Mak Tak Wah, Nakao Kazuwa, Nakagawa Takashi, Maehama Tomohiko, Suzuki Akira	4. 巻 6
2. 論文標題 YAP1 is a potent driver of the onset and progression of oral squamous cell carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eaay3324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aay3324	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kato Wakako, Nishio Miki, To Yoko, Togashi Hideru, Mak Tak Wah, Takada Hidetoshi, Ohga Shouichi, Maehama Tomohiko, Suzuki Akira	4. 巻 24
2. 論文標題 MOB1 regulates thymocyte egress and T cell survival in mice in a YAP1 independent manner	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 485 ~ 495
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12704	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakada-Tsukui Kumiko, Watanabe Natsuki, Maehama Tomohiko, Nozaki Tomoyoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 Phosphatidylinositol Kinases and Phosphatases in Entamoeba histolytica	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 150
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2019.00150	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishio Miki, Miyachi Yosuke, Otani Junji, Tane Shoji, Omori Hirofumi, Ueda Fumihito, Togashi Hideru, Sasaki Takehiko, Mak Tak Wah, Nakao Kazuwa, Fujita Yasuyuki, Nishina Hiroshi, Maehama Tomohiko, Suzuki Akira	4. 巻 33
2. 論文標題 Hippo pathway controls cell adhesion and context dependent cell competition to influence skin engraftment efficiency	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 5548 ~ 5560
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1096/fj.201802005R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Maehama Tomohiko, Nishio Miki, Otani Junji, Mak Tak Wah, Suzuki Akira	4. 巻 112
2. 論文標題 The role of Hippo YAP signaling in squamous cell carcinomas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 51 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14725	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nishio Miki, To Yoko, Maehama Tomohiko, Aono Yukari, Otani Junji, Hikasa Hiroki, Kitagawa Akihiro, Mimori Koshi, Sasaki Takehiko, Nishina Hiroshi, Toyokuni Shinya, Lydon John P., Nakao Kazuwa, Wah Mak Tak, Kiyono Tohru, Katabuchi Hidetaka, Tashiro Hironori, Suzuki Akira	4. 巻 111
2. 論文標題 Endogenous YAP1 activation drives immediate onset of cervical carcinoma in situ in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3576 ~ 3587
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14581	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計18件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Maehama Tomohiko, Nishio Miki, Suzuki Akira
2. 発表標題 The tumor suppressor PTEN: its function and regulation
3. 学会等名 Tohoku Forum for Creativity "Cancer - from Biology to Acceptance" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Maehama Tomohiko, Nishio Miki, Miyachi Yosuke, Suzuki Akira
2. 発表標題 Regulation of nucleolar stress response and tumorigenesis by PICT1
3. 学会等名 Frontiers of Cell Signaling in 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前濱朝彦、西尾美希、宮地洋佑、大谷淳二、上田史仁、富樫英、鈴木聡
2. 発表標題 Hippoシグナル経路による細胞競合機構
3. 学会等名 第9回日本プロテインホスファターゼ研究会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前濱朝彦、西尾美希、藤庸子、清野透、田代浩徳、鈴木聡
2. 発表標題 子宮頸がん発症におけるHippo経路の役割
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前濱朝彦、宮地洋佑、西尾美希、大谷淳二、上田史人、鈴木聡
2. 発表標題 核小体ストレス-RNAを介した応答機構
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮地洋佑、前濱朝彦、西尾美希、鈴木聡
2. 発表標題 がん制御因子PICT1の安定化機構
3. 学会等名 第65回日本生化学会近畿支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福本未記、前濱朝彦、北山翔太、西尾美希、鈴木聡
2. 発表標題 HECT型E3リガーゼWWP2によるPTEN制御の分子機構解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青野ゆかり、西尾美希、藤庸子、前濱朝彦、清野透、片渕秀隆、田代浩徳、鈴木聡
2. 発表標題 子宮におけるがん抑制遺伝子MOB1の機能解析
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西尾美希、大森裕文、藤庸子、前濱朝彦、田代浩徳、鈴木聡
2. 発表標題 Hippoキナーゼ経路による生体制御
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 津久井久美子、渡辺菜月、前濱朝彦、野崎智義
2. 発表標題 赤痢アメーバ原虫のホスファチジルイノシトールシグナルと貪食胞成熟の分子機構
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 西尾美希、大森裕文、藤庸子、中谷圭祐、青野ゆかり、清野透、益田宗幸、中川尚志、片渕秀隆、田代浩徳、前濱朝彦、鈴木聡
2. 発表標題 Hippo経路分子Mob1変異による肝がん発症機構
3. 学会等名 第41回分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前濱朝彦、西尾美希、大森裕文、田代浩徳、中尾一和、鈴木聡
2. 発表標題 Hippo経路による扁平上皮癌の制御
3. 学会等名 第57回日本臨床分子医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前濱朝彦、西尾美希、大森裕文、鈴木聡
2. 発表標題 YAPの多段階活性化による扁平上皮癌の発症・進展の制御
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 前濱朝彦、西尾美希、大森裕文、鈴木聡
2. 発表標題 YAPの多段階活性化による扁平上皮癌の発症・進展の制御
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西尾美希、中谷圭佑、大谷淳二、日笠弘基、前濱朝彦、鈴木聡
2. 発表標題 YAP1/TAZ阻害による抗腫瘍作用を示す天然物の同定
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木 聡、西尾美希、藤 庸子、大森博文、田代浩徳、前濱朝彦
2. 発表標題 がん抑制遺伝子の機能解析
3. 学会等名 第19回日本産婦人科がん分子標的研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohiko Maehama, Miki Nishio, Hirofumi Omori, Akira Suzuki
2. 発表標題 Squamous cell carcinoma onset and progression driven by multistep YAP activation
3. 学会等名 The 14th International Conference on Protein Phosphatase (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 A natural product Alantolactone is a potent YAP1/TAZ inhibitor via ROS production
2. 発表標題 Junji Otani, Keisuke Nakatani, Tomohiko Maehama, Miki Nishio, Akira Suzuki
3. 学会等名 The 14th International Conference on Protein Phosphatase (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

頭頸部がん発症に重要な細胞内シグナルを発見（世界最速のがん発症モデルマウスを作製）  
[https://www.kobe-u.ac.jp/research\\_at\\_kobe/NEWS/news/2020\\_03\\_19\\_01.html](https://www.kobe-u.ac.jp/research_at_kobe/NEWS/news/2020_03_19_01.html)

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------