

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15657

研究課題名(和文)新規原因遺伝子LZTR1によるNoonan症候群の発症機序解明

研究課題名(英文)Elucidation of pathogenesis of Noonan syndrome by novel causative gene LZTR1

研究代表者

阿部 太紀(Abe, Taiki)

東北大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40810594

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):ユビキチン修飾関連分子であるLZTR1は、RAS/MAPKシグナル伝達経路活性異常によって引き起こされる先天異常症候群RASopathiesの原因分子であるが、LZTR1とRAS/MAPKシグナル伝達経路の関係は不明であった。本研究では、LZTR1はがん原遺伝子産物であるRAS、ならびにPPP1CB/SHOC2/cRAF等の相互作用を介してRAS/MAPKシグナル活性を制御すること、LZTR1はRASのポリユビキチン修飾を促すことでユビキチン・プロテアソーム経路を介したRAS分解に関与す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

LZTR1はRASopathiesの原因分子であるとされていたもののRAS/MAPKシグナル伝達経路との関係は不明であった。そのため、治療法や治療薬の開発に際して治療標的分子を絞り込むことができず、各症状に対する対症療法以外に手立てがなかった。加えて、RASopathiesに分類される疾患は希少疾患であるためがんなどの大衆疾患に比べて研究開発が遅れている領域である。今回、LZTR1とRAS/MAPKシグナル伝達経路との関係が解明されたことで、治療薬開発における標的分子が明確となり、将来的な治療薬の開発が大いに期待される。

研究成果の概要(英文): Leucine zipper-like transcriptional regulator 1 (LZTR1) encodes a member of the BTB-Kelch superfamily, which interacts with the Cullin3 (CUL3)-based E3 ubiquitin ligase complex. LZTR1 is a causative gene of RASopathies, which are caused by germline mutations in genes encoding various components of the RAS/MAPK signaling pathway. However, no evidence regarding the functional interaction between LZTR1 and the RAS/MAPK signaling pathway had been reported. In this study, we revealed that (1) LZTR1 regulates RAS/MAPK signal activity through the interaction of RAS and PPP1CB/SHOC2/cRAF-complex, and (2) LZTR1 is involved in RAS degradation via the ubiquitin-proteasome pathway.

研究分野：分子生物学

キーワード：RASopathies Noonan症候群 ユビキチン・プロテアソーム経路 LZTR1 RAS/MAPK

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

RASopathies は、RAS/MAPK シグナル伝達経路に生殖細胞系列での変異を有する遺伝性疾患の総称であり、代表疾患として Noonan 症候群、Costello 症候群、CFC 症候群などの先天奇形症候群がある。次世代シーケンサーの普及に伴い、PPP1CB (protein phosphatase 1 catalytic subunit beta) や SHOC2 (suppressor of clear-2 homolog) などの新規原因遺伝子が同定され、疾患概念は拡大し続けている。しかし、疾患発症機序が解明されていない原因遺伝子も多く、RAS/MAPK 症候群発症機序の解明が強く求められている。本研究では、RASopathies に分類される Noonan 症候群とその原因遺伝子に LZTR1 (leucine zipper like transcription regulator 1) 注目した。Noonan 症候群は、相対的大頭、成長障害、先天性心疾患、精神運動発達遅滞、易発がん性などを呈する指定難病かつ小児慢性特定疾病である。LZTR1 は、2015 年に Noonan 症候群の新規原因遺伝子として報告された (J Med Genet, 2015.)。LZTR1 は BTB-Kelch スーパーファミリーに属するがん抑制遺伝子でもあり (J Biol Chem, 2006.)、通常の BTB-Kelch タンパク質とは異なり Kelch ドメインが N 端側に、BTB ドメインが C 端側に 2 つ存在する非常にユニークな分子である。LZTR1 は、全身に神経鞘腫を呈する Schwannomatosis ならびに Glioblastoma の原因遺伝子であることも報告されており (Nat Genet, 2013.)、悪性腫瘍形成の観点からも注目を浴びている。しかしながら、LZTR1 遺伝子変異による Noonan 症候群の発症機序、ならびに RAS/MAPK シグナル伝達経路への影響は未解明のままであった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、LZTR1 と RAS/MAPK シグナル伝達経路の関係を明らかにし、遺伝子変異獲得による Noonan 症候群の発症機序を解明することである。

3. 研究の方法

Noonan 症候群の発症には RAS/MAPK シグナル伝達活性異常が関与する。しかし、LZTR1 と RAS/MAPK シグナル伝達経路との関係はこれまで未解明であった。そこで、LZTR1 と RAS/MAPK シグナル伝達経路との関係性を以下の方法で解析した。

(1) 抗 LZTR1 抗体による免疫沈降物を nano-LC/MS/MS を活用した網羅的な相互作用分子の探索を実施した。(新規 LZTR1 相互作用分子の探索)

(2) nano-LC/MS/MS 解析により得られた RAS/MAPK 関連分子との相互作用を共免疫沈降により検証した。(新規 LZTR1 相互作用分子の同定)

(3) (1)、(2) で同定した新規 LZTR1 結合分子に対する LZTR1 発現量変化の影響をウェスタンブロットにより解析した。(LZTR1 と新規相互作用分子の関係解析)

(4) (3) で相互作用分子の発現量や細胞内局在に変化が認められた分子に対して、*in vivo* ubiquitination assay を実施し、LZTR1 による相互作用分子のユビキチン修飾レベルの変化を解析した。(LZTR1 による新規相互作用分子の翻訳後修飾への影響解析)

(5) LZTR1 により細胞内発現量の変化が認められた分子に関して、分解速度 (半減期) を求めるために cycloheximide chase assay を実施すると共にプロテアソーム阻害剤処置による発現量変化を評価した。(LZTR1 による新規相互作用分子の分解促進作用の解明)

4. 研究成果

(1) 新規 LZTR1 相互作用分子の探索

培養細胞株 HEK293 細胞より細胞抽出液を調整し、抗 LZTR1 抗体を用いて免疫沈降を実施した。抗 LZTR1 抗体免疫沈降物を使い nano-LC/MS/MS による質量分析を実施することで、複数の新規 LZTR1 相互作用分子を得た。この解析により RAS/MAPK シグナル伝達経路に関連する分子として、PPP1CB が同定された。PPP1CB は、Noonan 様症候群の原因遺伝子である SHOC2 と複合体を形成し、RAF の脱リン酸化を行うことで ERK を活性化すると報告されている。したがって、LZTR1 は PPP1CB を介して RAS/MAPK シグナル伝達経路の活性調節に関与することが示唆された。

(2) 新規 LZTR1 相互作用分子の同定

(1) の nano-LC/MS/MS 解析によって新規 LZTR1 相互作用分子候補としてピックアップされた分子や各分子との関連性が高い近傍分子は LZTR1 と細胞内で相互作用するか否かを共免疫沈降法により解析した。具体的には、HEK293 細胞に Flag-LZTR1 または Myc-LZTR1 ならびに Myc-tag、HA-tag、V5-tag のいずれかが付与された候補分子発現プラスミドを導入し、その細胞抽出液を用いて評価した。その結果、LZTR1 は PPP1CB/SHOC2/cRAF 複合体と相互作用すること、さらになん原遺伝子産物でありシグナルの最上流に位置する RAS とも相互作用することが明らかとなった。特に、RAS に関しては古典型 RAS である KRAS、NRAS、HRAS に加えて非古典型 RAS である MRAS の少なくとも 4 分子との相互作用が認められた。これらの結果より、LZTR1 は複数の RAS/MAPK シグナル伝達経路関連分子との結合を介してシグナル活性制御に関与する可能性が示された。

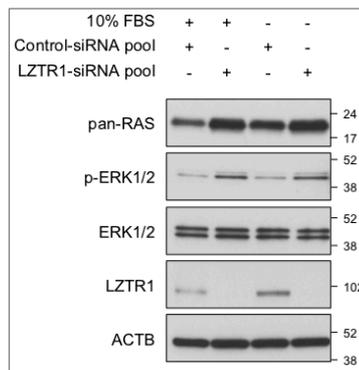
(3) LZTR1 と新規相互作用分子の関係解析

LZTR1 と PPP1CB/SHOC2/cRAF 複合体ならびに RAS との関係性を明らかにするために、LZTR1 発現増減時の RAS/MAPK シグナル伝達経路関連分子のリン酸化レベル、発現量の変動をウェスタンブロットによりより評価した。その結果、LZTR1 の発現誘導時において RAS の著しい発現低下が認め

られた。一方で LZTR1 標的 siRNA によるノックダウン系では、RAS の高発現、ERK1/2 のリン酸化レベルの増加が認められた。RAS の発現増加は、ゲノム編集により LZTR1 を欠損させた HEK293-KO 細胞でも認められ、LZTR1 発現低下は RAS の異常蓄積と MAPK シグナル伝達経路の異常活性化を引き起こすことが示された。また PPP1CB/SHOC2/cRAF 複合体において、LZTR1 の発現低下は cRAF リン酸化レベルを変化させることも確認している。

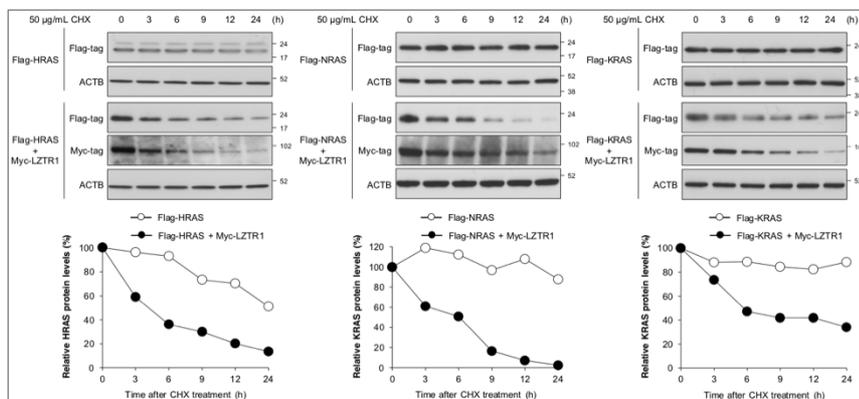
(4) LZTR1 による新規相互作用分子の翻訳後修飾への影響解析

(3) の結果より、LZTR1 は RAS の発現変動に関与し、RAS は LZTR1 による RAS/MAPK シグナル伝達活性制御における主要標的である可能性が示された。続いて、LZTR1 はどのように RAS の発現制御に関与するかを検討した。LZTR1 は、翻訳後修飾の 1 つであるユビキチン修飾反応においてユビキチン E3 リガーゼ複合体の基質アダプターとして機能することがこれまでに報告されている。そこで、LZTR1 は RAS のユビキチン修飾を促すか否かを *in vivo* ubiquitination assay により評価した。その結果、LZTR1 は相互作用の認められた 4 種 RAS 分子のポリユビキチン修飾レベルを著しく増加させ、RAS のポリユビキチン修飾レベルの増加は野生型のみならずがん原変異体においても同様に認められた。したがって、LZTR1 は E3 リガーゼ複合体の基質アダプターとして機能する際に RAS を捕捉することで RAS のポリユビキチン修飾に関与することが示された。



(5) LZTR1 による新規相互作用分子の分解促進作用の解明

タンパク質の翻訳後修飾において、ユビキチン修飾反応は細胞内局在の変化、タンパク質分解、分子間相互作用の変化などをもたらす。タンパク質のポリユビキチン修飾は、プロテアソームを介したタンパク質分解への関与が知られている。そこで、cycloheximide chase assay により RAS 分解速度の変化、プロテアソーム阻害剤 MG132 処置により RAS 発現変動の有無について LZTR1 発現誘導系により評価した。その結果、LZTR1 の発現誘導により RAS の分解速度は著しく増加し、LZTR1 発現誘導による RAS 発現量低下は MG132 処置により回復した。これらの結果より、LZTR1 はユビキチン・プロテアソーム分解経路を介して RAS の分解促進に寄与することが示された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Umeki Ikumi, Niihori Tetsuya, Abe Taiki, Kanno Shin-ichiro, Okamoto Nobuhiko, Mizuno Seiji, Kurosawa Kenji, Nagasaki Keisuke, Yoshida Makoto, Ohashi Hirofumi, Inoue Shin-ichi, Matsubara Yoichi, Fujiwara Ikuma, Kure Shigeo, Aoki Yoko	4. 巻 138
2. 論文標題 Delineation of LZTR1 mutation-positive patients with Noonan syndrome and identification of LZTR1 binding to RAF1-PPP1CB complexes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Human Genetics	6. 最初と最後の頁 21 ~ 35
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00439-018-1951-7	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 -

1. 著者名 Niihori Tetsuya, Nagai Koki, Fujita Atsushi, Ohashi Hirofumi, Okamoto Nobuhiko, Okada Satoshi, Harada Atsuko, Kihara Hiroataka, Arbogast Thomas, Funayama Ryo, Shirota Matsuyuki, Nakayama Keiko, Abe Taiki, Inoue Shin-ichi, Tsai I-Chun, Matsumoto Naomichi, Davis Erica E., Katsanis Nicholas, Aoki Yoko	4. 巻 104
2. 論文標題 Germline-Activating RRAS2 Mutations Cause Noonan Syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The American Journal of Human Genetics	6. 最初と最後の頁 1233 ~ 1240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajhg.2019.04.014	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 Abe Taiki, Umeki Ikumi, Kanno Shin-ichiro, Inoue Shin-ichi, Niihori Tetsuya, Aoki Yoko	4. 巻 27
2. 論文標題 LZTR1 facilitates polyubiquitination and degradation of RAS-GTPases	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Death & Differentiation	6. 最初と最後の頁 1023 ~ 1035
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41418-019-0395-5	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 梅木郁美, 新堀哲也, 阿部太紀, 長崎啓祐, 井上晋一, 藤原幾磨, 吳繁夫, 青木洋子
2. 発表標題 Noonan症候群の原因遺伝子LZTR1 臨床的特徴と結合タンパクRAF1/PPP1CBの同定
3. 学会等名 日本内分泌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 青木洋子, 梅木郁美, 阿部太紀, 岡本伸彦, 水野誠司, 黒澤健司, 長崎啓祐, 吉田真, 大橋博文, 井上晋一, 松原洋一, 藤原幾磨, 呉繁夫, 新堀哲也
2. 発表標題 Noonan症候群類縁疾患の網羅的解析とLZTR1の機能解明
3. 学会等名 日本遺伝カウンセリング学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Taiki Abe, Ikumi Umeki, Shin-ichiro Kanno, Shin-ichi Inoue, Tetsuya Niihori, Yoko Aoki
2. 発表標題 LZTR1 facilitates polyubiquitination and degradation of RAS-GTPases
3. 学会等名 Tohoku University Thematic Forum for Creativity Cancer from Biology to Acceptance (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 阿部太紀, 梅木郁美, 菅野新一郎, 井上晋一, 新堀哲也, 青木洋子
2. 発表標題 Noonan症候群原因遺伝子産物LZTR1によるRAS分解促進機構の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------------------------	-----------------------	----