

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590387
 研究課題名（和文） DNA損傷応答に関わる蛋白REV7の細胞増殖・運動と個体発生における重要性の検討
 研究課題名（英文） Involvement of DNA repair protein REV7 in cell proliferation, mobility and organogenesis
 研究代表者
 村雲 芳樹 (Yoshiki Murakumo)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
 研究者番号：40324438

研究成果の概要：

REV7の個体発生における重要性を検討するために、REV7ノックアウトマウスの樹立を行った。ノックアウトベクターの作成、相同組み換えES細胞の同定、キメラマウスの作成を経て、REV7ヘテロノックアウトマウスまで確立した。ヘテロノックアウトマウスは外見上wild typeマウスと変わり無く、成長も正常で生殖能力もあることまで判明した。また、REV7の細胞レベルでの重要性を検討するために、マスペクトロトメリーを利用してREV7結合蛋白の同定を行い、DNA修復、発癌、遺伝子発現、シグナル伝達に関与する蛋白が複数同定された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：REV7、DNA修復、細胞周期調節、ノックアウトマウス、結合蛋白、マスペクトロトメリー

1. 研究開始当初の背景

REV7蛋白はDNA損傷応答と細胞周期調節に関わる蛋白であり、様々な蛋白と相互作用することにより、結合パートナーの機能に影響を与えていると考えられている。しかし、REV7が個体内においてどのような重要な機能を担っているのか、また、DNA損傷後の腫瘍発生における役割など、生物学的な機能の詳細はまだまだ解明されていない。

2. 研究の目的

(1) REV7ノックアウトマウスを樹立し、REV7の個体発生における重要性和、生体内での腫瘍発生に対する影響を検討する。

(2) 新規REV7結合蛋白を同定し、REV7が関与する細胞生物学的機能の全貌を明らかにする。

(3) 細胞増殖・運動など、細胞の腫瘍化におけるREV7の重要性を検討する。

3. 研究の方法

(1) REV7 ノックアウトマウス作成のためのターゲティングベクターの作成、ES細胞への導入、相同組み換え体の同定、キメラマウスの作成を経て、ヘテロノックアウトマウスを樹立する。そしてホモノックアウトマウスを作成し、その表現型を解析する。発癌との関連を解析するために、紫外線や種々の薬剤を投与して、その反応を検討する。ホモノックアウトマウスが胎生致死であった場合、胎児の段階で組織学的検討を行う。

(2) GST 融合蛋白の pull down、免疫沈降法を用いて、培養細胞内で REV7 と結合している蛋白を分離し、マスマスプロトメトリーを利用して REV7 結合蛋白を同定する。そして、その結合の意義を解明する。

(3) 蛍光蛋白を利用して REV7 の細胞内での局在の変化を解析する。REV7 ノックアウトマウスが樹立されれば、ノックアウトマウス由来線維芽細胞株を樹立し、細胞増殖能や細胞運動能などを検討する。

4. 研究成果

(1) REV7 ノックアウトマウスの樹立

REV7 遺伝子座のエクソン 3 から 6 までを欠損させる様にノックアウトベクターを構築してエレクトロポレーションにより ES 細胞に導入し、G418 耐性クローンを約 150 個クローニングした。サザンブロッティングにて相同組み換え体のスクリーニングを行ったところ、1 個の相同組み換え体が同定されたが、その後の染色体検査で異常が判明したため、このクローンでノックアウトマウスを樹立することは断念した。そして、新たに REV7 のスタートコドンに欠損させる様にノックアウトベクターを構築した。新たに構築したベクターを ES 細胞に導入後、G418 耐性クローンを約 260 個クローニングし、サザンブロッティングにて相同組み換え体のスクリーニングを行ったところ、2 個の相同組み換え体が同定された。染色体検査でも異常が認められなかったため、この 2 個の REV7 遺伝子相同組み換え体から C57BL/6 系マウスを用いてキメラマウスを合計 9 匹作成した。そのキメラマウスを C57BL/6 系マウスと交配させ、生まれてきた子供の genotype を PCR により確認したところ、REV7 のヘテロノックアウトマウスを得ることができた。ヘテロマウスは外見上 wild type マウスと大きな違いはなく、発育も順調であり、生殖能力もあることまで判明した。

(2) 新規 REV7 結合蛋白の同定

REV7 の細胞生理学的機能を解明するため

に、新規 REV7 結合蛋白の同定を行った。まず、GST 融合 REV7 蛋白を恒常的に発現する細胞株を作成し、GST のみを発現する細胞株をコントロールとして pull down を行い、GST-REV7 と共に沈降してきた蛋白を電気泳動により分離し、コントロールと差が認められたバンドから蛋白を抽出して、マスマスプロトメトリーにて同定した。その結果、REV7 結合蛋白として転写因子が同定された。免疫沈降法を用いてその転写因子と REV7 との結合の再確認を行い、更に種々の欠損変異体を作成して結合ドメインを決定した。次に、その他の REV7 結合蛋白を網羅的に同定するために、GST-REV7 と共沈してきた蛋白を一度にマスマスプロトメトリーにて解析した。その結果、REV7 結合蛋白の候補として、DNA 修復・発癌・シグナル伝達に関わる蛋白を複数新たに同定した。

(3) 細胞増殖・運動への関与

REV7 ノックダウン細胞を用いて細胞増殖を検討したが、コントロール細胞と有意な差が得られなかった。REV7 過剰発現細胞では、細胞増殖が遅くなる傾向があった。

(4) 得られた成果の位置づけとインパクト

REV7 蛋白の機能について、近年、腫瘍発生や遺伝子発現への関与が新たに検討されているが、いずれも他の蛋白に結合することにより作用を及ぼしているものである。今回新たな REV7 結合蛋白を同定したことは REV7 の未知の機能の解明に繋がるものであり、REV7 研究においては非常に意義のあるものと考えられる。また、REV7 ヘテロノックアウトマウスの作成に成功し、生殖能力があることまで示したことは、今後ホモノックアウトマウスの作成への道を開くものであり、ひいては個体内での REV7 の機能解析が可能となり、個体発生における重要性や、腫瘍発生への関与の検討、また個体内での紫外線感受性や薬剤感受性などの検討が可能となってくる。REV7 ノックアウトマウスの報告は今までなされていないので、本研究でホモノックアウトマウスの作成への道を開いたことはインパクトが大きいと考えられる。

(5) 今後の展望

本研究の結果から考えられる展望として、REV7 ノックアウトヘテロマウスが生存でき、生殖能力があることまで判明したので、ホモノックアウトマウスの作成が期待される。そして、ホモノックアウトマウスが生まれてきたら、その表現型の解析、特に DNA 損傷後の発癌や老化などの解析を進めることにより、REV7 蛋白が個体においてどのような役割を担っているかを明らかにできることが期待される。ホモが生まれてこなかった場合

でも、胎生マウスの組織学的に観察により REV7 が個体形成のどの段階で重要な役割を担っているかを明らかにできることが期待できる。

更に新規 REV7 結合蛋白の候補が同定されたことから、REV7 過剰発現細胞やノックダウン細胞を用いて、同定された結合蛋白の機能に REV7 がどのように関わっているのかを検討することにより、REV7 の新たな細胞生理学的機能の推定ができる。

ノックアウトマウスを用いた解析と細胞生理学的な解析を進展させることができれば、REV7 の機能解明が大きく進むことが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

- ① Hagiwara S, Murakumo Y, Sato T, Shigetomi T, Mitsudo K, Tohnai I, Ueda M, Takahashi M. Upregulation of CD109 expression is associated with carcinogenesis of the squamous epithelium of the oral cavity. *Cancer Sci*, **99**: 1916-23, 2008. 査読有.
- ② 村雲芳樹, 高橋雅英: RET チロシンキナーゼの生理機能. 細胞, 40 巻 14 号、600-603、2008. 査読無.
- ③ Hasegawa T, Enomoto A, Kato T, Kawai K, Miyamoto R, Jijiwa M, Ichihara M, Ishida M, Asai N, Murakumo Y, Ohara K, Niwa Y, Goto H, Takahashi M. Roles of induced expression of MAPK phosphatase-2 in tumor development in RET-MEN2A transgenic mice. *Oncogene*, **27**: 5684-95, 2008. 査読有.
- ④ Hasegawa M, Moritani S, Murakumo Y, Sato T, Hagiwara S, Suzuki C, Mii S, Jijiwa M, Enomoto A, Asai N, Ichihara S, Takahashi M. CD109 expression in basal-like breast carcinoma. *Pathol Int*, **58**: 288-94, 2008. 査読有.
- ⑤ Jijiwa M, Kawai K, Fukihara J, Nakamura A, Hasegawa M, Suzuki C, Sato T, Enomoto A, Asai N, Murakumo Y, Takahashi M. GDNF-mediated signaling via RET tyrosine 1062 is essential for maintenance of spermatogonial stem cells. *Genes Cells*, **13**: 365-74, 2008. 査読有.
- ⑥ Jiang P, Enomoto A, Jijiwa M, Kato T, Hasegawa T, Ishida M, Sato T, Asai N, Murakumo Y, Takahashi M. An actin-binding protein Girdin regulates the motility of breast cancer cells. *Cancer Res*, **68**: 1310-8, 2008. 査読有.
- ⑦ Suzuki C, Murakumo Y, Kawase Y, Sato T, Morinaga T, Fukuda N, Enomoto A, Ichihara M, Takahashi M. A novel GDNF-inducible gene, BMZF3, encodes a transcriptional repressor associated with KAP-1. *Biochem Biophys Res Commun*, **366**: 226-32, 2008. 査読有.
- ⑧ Ichihara M, Murakumo Y, Masuda A, Matsuura T, Asai N, Jijiwa M, Ishida M, Shinmi J, Yatsuya H, Qiao S, Takahashi M, Ohno K. Thermodynamic instability of siRNA duplex is a prerequisite for dependable prediction of siRNA activities. *Nucleic Acids Res*, **35**: e123, 2007. 査読有.
- ⑨ 村雲芳樹, 高橋雅英: CD109 病理診断とがん研究への応用. 病理と臨床, 25 巻 10 号: 1058-1059、2007. 査読無.
- ⑩ Dambara A, Morinaga T, Fukuda N, Yamakawa Y, Kato T, Enomoto A, Asai N, Murakumo Y, Matsuo S, Takahashi M. Nucleolin modulates the subcellular localization of GDNF-inducible zinc finger protein 1 and its roles in transcription and cell proliferation. *Exp Cell Res*, **313**: 3755-66, 2007. 査読有.
- ⑪ Sato T, Murakumo Y, Hagiwara S, Jijiwa M, Suzuki C, Yatabe Y, Takahashi M. High-level expression of CD109 is frequently detected in lung squamous cell carcinomas. *Pathol Int*, **57**: 719-24, 2007. 査読有.
- ⑫ Ishikawa K, Ishii H, Murakumo Y, Mimori K, Kobayashi M, Yamamoto K, Mori M, Nishino H, Furukawa Y, Ichimura K. Rad9 modulates the P21WAF1 pathway by direct association with p53. *BMC Mol Biol*, **8**: 37, 2007. 査読有.
- ⑬ Ishida M, Ichihara M, Mii S, Jijiwa M, Asai N, Enomoto A, Kato T, Majima A, Ping J, Murakumo Y, Takahashi M. Sprouty2 regulates growth and differentiation of human neuroblastoma cells through RET tyrosine kinase. *Cancer Sci*, **98**: 815-21, 2007. 査読有.
- ⑭ Hasegawa M, Hagiwara S, Sato T, Murakumo Y, Maeda M, Moritani S, Ichihara S, Takahashi M. CD109, a new marker for myoepithelial cells of mammary, salivary, and lacrimal glands and prostate basal cells. *Pathol Int*, **57**: 245-50, 2007. 査読有.

[学会発表] (計 16 件)

- ① 花房朋, 村雲芳樹, 土生敏行, 原幸大, 橋本博, 大橋英治, 大森治夫: ヒト REV7 及び MAD2 タンパク質の結合モチーフ配列の部分的オーバーラップ

- グ. 第31回日本分子生物学会、神戸(平成20年12月9~12日、神戸).
- ②長谷川正規, 森谷鈴子, 村雲芳樹, 市原周, 高橋雅英:皮膚腫瘍におけるCD109の発現(CD109 expression in skin tumor). 第67回日本癌学会総会、平成20年10月28~30日、名古屋.
- ③高橋雅英, 長谷川太作, 榎本篤, 加藤琢哉, 石田麻紀, 時々輪真由美, 浅井直也, 村雲芳樹, 後藤秀実: 遺伝性の癌その研究と臨床の最前線 RET チロシンキナーゼのシグナル伝達と発がん (Forefront of Basic and Clinical Researches in Hereditary Cancer Role of RET tyrosine kinase signaling in tumor development). 第67回日本癌学会総会、平成20年10月28~30日、名古屋.
- ④加藤琢哉, 下野洋平, 榎本篤, 時々輪真由美, 村雲芳樹, 高橋雅英: TBP-2 の発現抑制に関わる転写複合体の解析 (Characterization of the transcription complex involved in the TBP-2 repression). 第67回日本癌学会総会、平成20年10月28~30日、名古屋.
- ⑤萩原純孝, 村雲芳樹, 重富俊雄, 光藤健司, 藤内祝, 上田実, 高橋雅英: 口腔癌における CD109 の発現 (CD109 expression in oral cancer). 第67回日本癌学会総会、平成20年10月28~30日、名古屋.
- ⑥長谷川正規, 森谷鈴子, 三井伸二, 佐藤朋子, 時々輪真由美, 村雲芳樹, 市原周, 高橋雅英: 基底細胞型乳癌の新しいマーカーとしての CD109. 第97回日本病理学会総会、平成20年5月15~17日、金沢.
- ⑦時々輪真由美, 市原周, 長谷川正規, 佐藤朋子, 鈴木智景, 三井伸二, 榎本篤, 森谷鈴子, 浅井直也, 村雲芳樹, 高橋雅英: 乳腺腺筋上皮腫 (adenomyoepithelioma) の1例. 第97回日本病理学会総会、平成20年5月15~17日、金沢.
- ⑧鈴木智景, 岩田洋介, 村雲芳樹, 榎本篤, 三井伸二, 下山芳江, 長坂徹郎, 高橋雅英: Choroid plexus papillary carcinoma の一例. 第97回日本病理学会総会、平成20年5月15~17日、金沢.
- ⑨Murakumo Y, Sato T, Hashimoto M, Zhang J, Takahashi M. High-level expression of CD109 is frequently detected in lung squamous cell carcinomas. *99th Annual Meeting, American association for Cancer Research*. April 12-16, 2008, San Diego, USA.
- ⑩長谷川正規, 森谷鈴子, 佐藤朋子, 時々輪真由美, 村雲芳樹, 市原周, 高橋雅英: 基底細胞型乳癌の新規マーカーとしての CD109. 第66回日本癌学会総会、平成19年10月6~8日、横浜.
- ⑪石田麻紀, 市原正智, 三井伸二, 時々輪真由美, 浅井直也, 榎本篤, 加藤琢哉, 村雲芳樹, 高橋雅英: Sprouty2 は RET チロシンキナーゼ下流シグナルによる神経芽細胞種の増殖と分化を調節する. 第66回日本癌学会総会、平成19年10月6~8日、横浜.
- ⑫長谷川太作, 榎本篤, 川井久美, 加藤琢哉, 時々輪真由美, 浅井直也, 村雲芳樹, 後藤秀実, 高橋雅英: MAPK ホスファターゼ-2(MKP2)は MEN2A トランスジェニックマウス由来の乳癌細胞の増殖とアポトーシスを制御する. 第66回日本癌学会総会、平成19年10月6~8日、横浜.
- ⑬佐藤朋子, 村雲芳樹, 萩原純孝, 時々輪真由美, 矢田部恭, 高橋雅英: 肺扁平上皮癌における CD109 の発現. 第66回日本癌学会総会、平成19年10月6~8日、横浜.
- ⑭鈴木智景, 村雲芳樹, 市原正智, 高橋雅英: 神経栄養因子 GDNF によって発現誘導される遺伝子 BMZF-3 の機能解析. 第66回日本癌学会総会、平成19年10月6~8日、横浜.
- ⑮加藤琢哉, 時々輪真由美, 川井久美, 村雲芳樹, 高橋雅英: 転写制御因子 RFP による細胞増殖制御. 第66回日本癌学会総会、平成19年10月6~8日、横浜.
- ⑯村雲芳樹, 高橋雅英: hREV7 とクラスリン軽鎖間の相互作用の解析. 第66回日本癌学会総会、平成19年10月6~8日、横浜.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村雲 芳樹 (MURAKUMO YOSHIKI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 40324438

(2) 研究分担者

時々輪 真由美 (JIJIWA MAYUMI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・COE
特任講師

研究者番号: 50378006