

機関番号： 32620

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20590316

研究課題名 (和文) 腫瘍抑制遺伝子 BHD 産物が制御するシグナル伝達系の解明

研究課題名 (英文) Elucidation of signal transduction systems which are regulated by BHD tumor suppressor protein

研究代表者

小林 敏之 (KOBAYASHI TOSHIYUKI)

順天堂大学大学院・医学研究科・准教授

研究者番号：40260070

研究成果の概要 (和文) : 遺伝性に腫瘍を発生する Birt-Hogg-Dubé 症候群の責任遺伝子が作る蛋白(BHD 蛋白)の量が低下することにより、mTOR 蛋白リン酸化酵素の複合体(mTORC1)量の減少が生ずると共に、細胞分裂を促進するサイクリン D1 蛋白の量が増加することがわかった。責任遺伝子の変異が、サイクリン D1 の伝達 RNA の量を調整する信号伝達系の異常を引き起こし、そのため細胞分裂が促進され腫瘍発生の要因となっている可能性が示唆された。この信号伝達系が病気の予防・治療に向けた新たな薬剤開発の対象となることが期待される。

研究成果の概要 (英文) : It was found that the suppression of BHD (Birt-Hogg-Dubé syndrome gene) tumor suppressor protein expression reduced the amount of mTOR complex (mTORC1) and induces cyclin D1 protein level. It is suggested that the *BHD* mutation induces dysregulation of a signal transduction system regulating cyclin D1 mRNA level and leads to tumorigenesis through aberrant cell cycle. This regulatory system for cyclin D1 expression may be a novel target to develop therapeutic drug for BHD and other tumor predisposing diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：分子腫瘍学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：家族性腫瘍、遺伝性腎癌、動物モデル、*BHD* 遺伝子、*TSC2* 遺伝子、mTOR キナーゼ、AMP 依存性キナーゼ、サイクリン D1

1. 研究開始当初の背景

Birt-Hogg-Dubé(BHD)症候群は、腎癌や毛嚢腫などの腫瘍性病変の他、自然気胸を発生することを特徴とする常染色体優性遺伝病である。BHD 症候群の原因遺伝子(*BHD*)は腫瘍抑制遺伝子としての特徴を示すことが報告されているが、現在のところその産物(folliculin、以下 Flcn)の機能的側面については全くわかっていない。

我々は遺伝性腎癌モデル動物を用いて多段階発がん機構の解明を進めている。それらのモ

デルのうち Eker ラットはヒト結節性硬化症(TSC)原因遺伝子ホモログ(*Tsc2*)の、Nihon ラットは BHD 遺伝子ホモログ(*Bhd*)の生殖細胞系列変異が原因となっていることを明らかにして研究を進めている。*TSC2* 遺伝子の産物(tuberin)は、細胞増殖やストレス応答などに関わる様々なシグナル伝達系において中心的な役割を果たす mTOR キナーゼが形成する二つの複合体(mTORC1 と mTORC2)のうち、mTORC1 に対する負の制御因子として働いていることがわかっている。一方、我々は Flcn が mTORC1 依存性のリ

ン酸化を受けていること、Flcn の発現抑制による S6K1 リン酸化(mTORC1 基質)の低下を見出した。

これまで TSC や各種腫瘍発生を伴う疾患に mTORC1 阻害薬(rapamycin 等)の投与が治療の一環として試みられているが、限られた効果にとどまっていることから、多剤併用等を目的とした新規分子標的の同定が望まれる。Rapamycin 関連薬剤の副作用もあり、mTOR が関わる経路における新たな分子標的の候補の探索も期待されている。Flcn の機能解明はそのような観点からも重要な課題と言える。

2. 研究の目的

上記のような背景のもと、本研究は Flcn の機能を明らかにし、病態発生機構の解明と治療法の開発を目指すものである。mTOR の制御機構との関連をはじめとした研究を進めるとともに、BHD の治療を目指し、新たな分子標的の候補を見出すことを目的とする。

(1)これまで独自に見出した Flcn 結合蛋白(FnipL)、Flcn 発現抑制による S6K1 リン酸化の変化を手がかりに、Flcn が機能するシグナル伝達系の解明を目指す。具体的には、Flcn の発現や翻訳後修飾による mTOR 複合体の動態変化、Flcn-FnipL 発現による mTOR 関連以外のシグナル伝達系の変化を明らかにする。

(2)BHD 遺伝子の機能抑制により発現に変動の見られる蛋白の検索において、細胞増殖制御に関わるサイクリン D1 量の発現増加の傾向を認めたことから、その発現制御機構に関わるシグナル伝達系の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1)細胞培養、プラスミド作製と安定細胞株の樹立: HeLa、293、COS7 細胞は DMEM/10%FCS で培養した。Flcn 発現コンストラクトは完全長ラット *Bhd* cDNA を pCND3.1 ベクターに組み込んで作製した。Flcn 発現系を導入した安定細胞株は NR32 (Nihon ラット腎癌細胞)より樹立し、DMEM(高グルコース)/10%FCS/geneticine(最終濃度 100 μ g/ml)で培養した。N 末に FLAG タグを付加したラット Flcn の発現系、Myc を付加したヒト Fnip1、ヒト FnipL、ラット AMPK α サブユニットの発現系は各 cDNA を pCAG-GS ベクターに組み込むことにより作製した。リン酸化部位の変異体は部位特異的変異を持つプライマーを利用した PCR 法により作製した。

(2)抗体: 抗リン酸化 S6K(Thr389)、抗リン酸化 Akt(Ser473)、抗 Akt、抗 raptor、抗リン酸化 rictor(Thr1135)、抗 rictor、抗 mTOR、

抗リン酸化 4E-BP1(Thr37/46)、抗 4E-BP1 の各抗体は Cell Signaling Tech 社のものを使用した。抗 S6K1、抗サイクリン D1、抗 p27 抗体は Santa Cruz 社のものを使用した。抗 β アクチン、抗 FLAG、抗 Myc 抗体は Sigma 社のものを使用した。抗 Flcn 抗体(C 末端ペプチド抗体)と抗リン酸化 tuberin 抗体(AMPK リン酸化部位の抗体)は独自に作製したのを用いた。

(3)ウェスタンブロット: ウェスタンブロットに用いる細胞抽出液は、蛋白を SDS-PAGE サンプルバッファーで溶かすことにより得た。DC プロテインアッセイ(Bio-Rat)でタンパクを定量した。同量のタンパクを SDS-PAGE により分離し、電気泳動的にナイロン膜に転写した。1%スキムミルクを含む 1 \times TBS-T に室温 2 時間浸してブロッキングを行った後、抗体反応を行った。二次抗体以降の検出系には Envision(Dako) またはビオチン化抗マウス IgG とストレプトアビジン HRP(Amersham)を用いて行い ECL システム(Amersham)を用いて発光反応を行った。

(4)免疫沈降: mTOR 複合体の免疫沈降については細胞を 100mm プレートで培養し、CHAPS lysis バッファー (20 mM Tris-HCl pH7.4、120 mM NaCl、1 mM EDTA、5 mM EGTA、50 mM NaF、0.3% CHAPS、50 mM β -glycerophosphate、1 mM DTT、4 μ g/ml aprotinin、4 μ g/ml leupeptin)で可溶化し、抗体とプロテイン G+プロテイン A アガロース(Calbiochem)で一晩 4 $^{\circ}$ C で混和することにより沈降操作を行った。Flcn 変異体の結合実験の免疫沈降は NP40 を含む可溶バッファーを用い、同様な手法により行った。

(5)RNAi: Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen)と OPTI-MEM(Gibco)を用い、最終濃度 25 nM で *BHD* siRNA(センス鎖: 5' -GGUACAGCAUCAUCACCAUTT-3')とコントロール RNA(センス鎖: 5' -GCGCAAUCGAUUGAUAG-CTT-3')を細胞に導入した。siRNA を導入して 24 時間後、あるいは 48 時間後にタンパクを抽出した。

(6)RNA 抽出、cDNA 合成、qRT-PCR: トータル RNA は FastPure RNA kit(Takara)で抽出し、cDNA は SuperScript II Reverse Transcriptase Kit(Invitrogen)を使用し合成した。qRT-PCR は Power SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies)を用いて 95 度 10 分、40 サイクルの 95 度 15 秒、60 度 1 分で行った。miRNA の抽出は miRNAeasy(Promega)を用い、qPCR は NCodeVIL0 mRNA cDNA synthesis kit と EXPRESS SYBR GreenER miRNA qRT-PCR kit

(Invitrogen)を用いて行った。

(7) レポーターコンストラクトの作製：サイクリン D1 プロモーター領域は HEK293 細胞 genomic DNA より増幅し、Nhe I, HindIII で処理後 pGL4.10 ベクター (Promega) に組み込んだ。サイクリン D1 3' UTR1 (1-1026) および 3' UTR2 (894-2253) は HEK293 細胞 genomic DNA より増幅し、Xba I で処理後、pGL4.10 + cyclin D1 promoter ベクターに組み込んだ。Cyclin D1 3' 非翻訳領域遠位 1.8kb をエンコードするプラスミド cDNA (HIBBN77) は ATCC より入手した。サイクリン D1 3' UTR3 (2209-3171) は HIBBN77 より増幅し、Xba I で処理後、pGL4.10 + サイクリン D1 promoter ベクターに組み込んだ。完全長のサイクリン D1 3' UTR を組み込んだプラスミドはサイクリン D1 3' UTR1、3' UTR2、3' UTR3 を含む 3 つのプラスミドを Pst I、Nco I サイトで組換えて作製した。

(8) ルシフェラーゼアッセイ：HeLa 細胞を Lipofectamine RNAiMAX にてノックダウンした。その 6 時間後、培地交換し、翌日 1 μ g の pGL4.10 ベクター、pGL4.10 + cyclin D1 プロモーターベクター、3' UTR を組み込んだプラスミドのいずれかを 20ng の Renilla ルシフェラーゼ発現プラスミドとともに Fugene 6 (Roche) を用いてトランスフェクションし、24 時間後に溶解、解析を行った。解析にはピッカジーン・シーパンジーデュアル発光キット (Toyo B net) を使用し、Firefly および Renilla ルシフェラーゼ活性を測定した。Firefly ルシフェラーゼ活性値は Renilla ルシフェラーゼ活性値で標準化した。

4. 研究成果

(1) mTORC1 キナーゼが関わる経路による Flcn リン酸化と AMPK、Fnip1、FnipL との複合体形成：これまで見出している Flcn リン酸化 (Ser62 と Ser302) にどのような機能的意義があるのかわかっていなかった。Flcn は mTOR の負の制御因子である AMPK と結合することが知られている。そこで、AMPK に対するフィードバック機構の存在を予想し、各リン酸化部位にアラニン置換 (非リン酸化体、以下 A 変異)、アスパラギン酸置換 (リン酸化模倣体、以下 D 変異) を導入した Flcn の発現系を用い、AMPK α サブユニットとの結合を調べた。また Fnip1、FnipL との結合も調べた。その結果、Fnip1、FnipL に対する変異の影響は検出されなかったものの、AMPK α との結合は S62 の D 変異体、S302 の A 変異体に対して増強されることがわかった。とりわけ、S62 の場合は顕著であった (図 1)。それぞれのリン酸化が AMPK との結合に影響を与えることが考えら

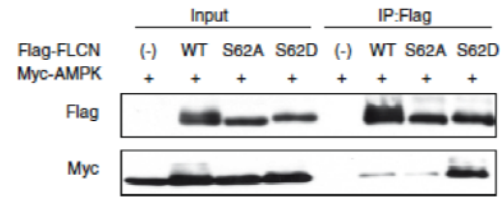


図 1 S62 変異体と AMPK α の結合

れ、mTORC1 依存性のリン酸化による AMPK へのフィードバック機構の存在が示唆された。そこで Flcn リン酸化が AMPK の活性に影響を与えている可能性を調べた。とりわけ mTORC1 の負の制御因子である tuberin が AMPK によるリン酸化で活性化されることが知られており、AMPK リン酸化部位に対する特異抗体を作製し調べた。しかしながら、その部位のリン酸化に対して変異 Flcn の発現は大きな影響を示さなかった。最近、AMPK が直接 mTORC1 サブユニットの raptor をリン酸化し、機能制御を行っていることも報告されている。今後、それらの新規の基質などを含めた分析が必要である。

(2) Flcn の発現抑制による mTOR 複合体の変化：これまで HeLa 細胞において Flcn の発現抑制を行うことにより mTORC1 の基質である S6K1 のリン酸化の抑制を観察していた。その機構を明らかにするため、mTORC1 特異的抗体 (抗 raptor)、mTORC2 特異的抗体 (抗 rictor) を用いた免疫沈降により mTORC1 の複合体形成の様子を調べた。Flcn 発現を抑制することにより、mTORC1 複合体形成が抑制されることがわかった (図 2)。

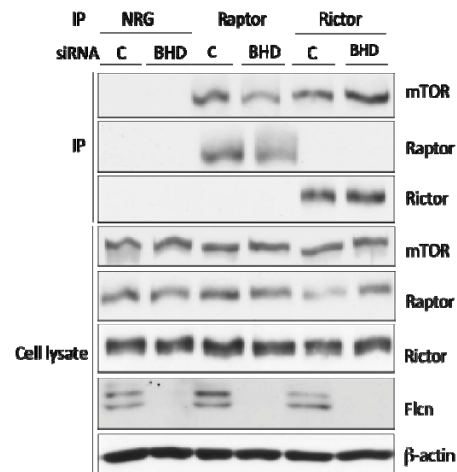


図 2 Flcn 抑制による mTOR 複合体の変化

従って、Flcn は mTORC1 複合体の形成を促進あるいは維持する役割を果たしていることが示唆される。Flcn の抑制時にはウェスタンブロットにおいて Raptor のバンドが移動度の遅い側にシフトする様子が認められた。Raptor は AMPK によるリン酸化による機能抑制を受けることが報告されており、Flcn 抑制においてその機構が働いていることが予想され、今後の検討課題と言える。一方、異なる細胞種や培養条件では Flcn 抑制において rictor のリン酸化が亢進する様子も観察された。mTORC1 の活性化による rictor のリン酸化と抑制の報告がされているが、条件次第では S6K1 のリン酸化の様子と rictor リン酸化の様に乖離が認められることもあり、rictor リン酸化の制御の詳細も今後の検討課題と言える。

(1)(2)の分析から、Flcn が mTOR 複合体、とりわけ mTORC1 形成に役割を果たしていることが考えられ、AMPK へのフィードバックがそれに関与している可能性が考えられる。TSCや各種のがん発生において mTORC1 の活性化が要因の一つとなっているが、Flcn の機能を何らかの様式で人為的に修飾することにより、mTORC1 制御を通じて各種病態発生の抑制を行うことが可能性の一つとして期待される。

(3)Flcn 発現抑制によるサイクリン D1 蛋白の発現亢進とその分子機構

①Flcn 発現抑制によるサイクリン D1 発現亢進：mTOR 関連分子のみならず、Flcn の機能に関連する分子を探索する途上、HeLa 細胞において siRNA による Flcn 発現抑制を行った場合にサイクリン D1 蛋白量が増加することを見出した(図 3)。

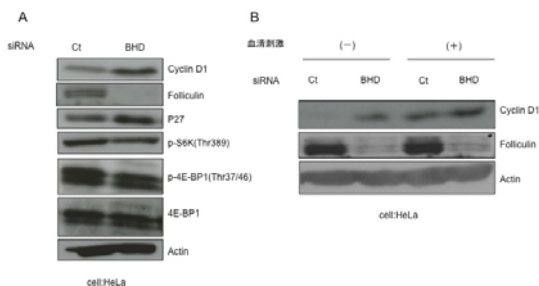


図 3 Flcn 発現抑制によるサイクリン D1 蛋白の増加

Bhd欠損ラット腎癌細胞にFlcn発現系を導入した細胞株では、親株に比べてサイクリン D1 蛋白量が低下することも確認された。この

ことから Flcn の下流においてサイクリン D1 の発現が制御されていることが示唆された。その機構を調べるため、まず、mRNA 量に変化が生じているか qRT-PCR 法により調べた。その結果、Flcn 発現抑制によりサイクリン D1 mRNA 量が増加することが明らかとなった。一方、蛋白合成阻害剤を用いた分析により、蛋白の分解が著しく抑制されている傾向は認められなかった。従って、転写から翻訳のレベルでの制御が予想された。

②サイクリン D1 プロモーター活性の分析：これまでにヒトサイクリン遺伝子の転写開始点から上流約 1kb のプロモーター領域が発現に重要な役割を果たしていることが知られていた。そこで、その領域をルシフェラーゼ・レポータープラスミドにクローニングし、HeLa 細胞における Flcn 発現抑制時にプロモーター活性に変化が生ずるか調べた。しかしながら、大きな変化は認められなかった。

③3' 非翻訳領域の分析：サイクリン D1 の mRNA には約 3kb の長い 3' 非翻訳があり、その中に mRNA 量を調節する配列が存在することが報告されている。そこで、その領域の全長、あるいは部分配列をレポータープラスミドのルシフェラーゼ・コーディング領域の下流にクローニングし、HeLa 細胞において Flcn 発現抑制を行うことによりレポーター活性の変化を調べた。興味あることに、全長約 3kb をほぼ三等分したうちの中央の約 1kb を導入した場合に、通常認められるレポーター活性の抑制が Flcn ノックダウンにより認められなくなることがわかった(図 4)。全長を導入した際も同様であった。

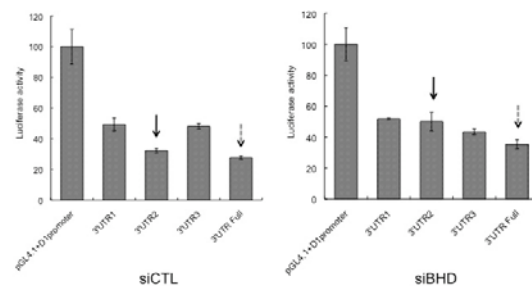


図 4 サイクリン D1 cDNA の 3' 非翻訳領域がレポーター活性に与える影響

これらの結果は mRNA の 3' 非翻訳領域に存在する配列に作用し、mRNA 量を負に制御する因子が Flcn によって制御されている可能性を示唆する。

④miRNA の発現解析：mRNA の 3' 非翻訳領域

に作用する因子として、近年 miRNA が注目されている。サイクリン D1 の 3' 非翻訳領域についても miRNA が作用するという報告がされている。Flcn ノックダウンによる miRNA 量の変化を qRT-PCR により調べたが、これまでに分析した 20 種の候補の中で有意に発現変化を示すものは見つからなかった。

現時点ではサイクリン D1 mRNA の発現量を直接制御する因子はまだ不明であるものの、*BHD* 遺伝子の変異が、サイクリン D1 の mRNA の量を調整するシグナル伝達系の異常を引き起こし、そのため細胞分裂が促進され腫瘍発生の要因となっている可能性が示唆された。

(4)まとめと今後の展望：本研究では未知の Flcn (BHD 産物)の機能を明らかにすることを目的として研究を進めた。TSCをはじめ種々の病態発生に関わる mTOR の制御機構野中で、Flcn は mTORC1 活性制御の役割を果たしていることがわかってきた。Flcn の機能修飾を通じて、これまでとは異なる見地から mTOR の活性制御を人為的に行う方法を開発することが期待される。一方、Flcn がサイクリン D1 の発現を抑制するシグナル伝達系を制御することがわかってきた。mTOR 関連シグナルとのクロストークを含め、BHD の発症機序を解明していく上で、このシグナル伝達系の解明は新たな重要な課題となった。今後さらに、その詳細を明らかにし、新規の分子標的の候補を同定していくことが可能になる。

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 6 件)

1. Wang L, Kobayashi T, Piao X, Shiono M, Takagi Y, Mineki R, Taka H, Zhang D, Abe M, Sun G, Hagiwara Y, Okimoto K, Matsumoto I, Kouchi M, Hino O. Serine 62 is a phosphorylation site in folliculin, the Birt-Hogg-Dubé gene product. FEBS Lett, 584:39-43 (2010) 査読有

2. Kunogi M, Kurihara M, Ikegami TS, Kobayashi T, Shindo N, Kumasaka T, Gunji Y, Kikkawa M, Iwakami S, Hino O, Takahashi K, Seyama K. Clinical and genetic spectrum of Birt-Hogg-Dubé syndrome patients in whom pneumothorax and/or multiple lung cysts are the presenting feature. J Med Genet 47:281-287 (2010) 査読有

3. Piao X, Kobayashi T, Wang L, Shiono M, Takagi Y, Sun G, Abe M, Hagiwara Y, Zhang

D, Okimoto K, Kouchi M, Matsumoto I, Hino O. Regulation of folliculin (the BHD gene product) phosphorylation by Tsc2-mTOR pathway. Biochem Biophys Res Commun 389:16-21 (2009) 査読有

4. Takagi Y, Kobayashi T, Shiono M, Wang L, Piao X, Sun G, Abe M, Hagiwara Y, Takahashi K, Hino O. Interaction of folliculin (Birt-Hogg-Dubé gene product) with a novel Fnip1-like (FnipL/Fnip2) protein. Oncogene 27:5339-5347 (2008) 査読有

[学会発表] (計 9 件)

1. 小林敏之、朴香花、正岡亜希子、大倉英浩、大澤麻記、樋野興夫「Functions of mTOR complexes and mTOR-related tumor suppressor proteins (tuberin and folliculin) in differentiation of skeletal muscle cells」第 33 日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会・合同大会 (2010)

2. 小林敏之「Tsc2-mTOR axis の異常が関わる病態発生病態機構」第 40 回日本腎臓学会東部学術大会・教育講演 (2010)

3. 朴香花、王璐、沖本一夫、河内眞美、松本泉美、小林敏之、樋野興夫「Regulation of complex formation of FLCN-AMPK by FLCN phosphorylation」第 32 回日本分子生物学会年会 (2009)

4. 小林敏之、高木裕美子、樋野興夫「Fnip 蛋白による folliculin の局在とリン酸化の調節」第 67 回日本癌学会学術総会 (2008)

5. 王璐、朴香花、塩野雅俊、高木裕美子、高ひかり、峯木礼子、小林敏之、樋野興夫「Bhd 蛋白のリン酸化部位の同定とリン酸化酵素の解明」第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会・合同大会 (2008)

[その他]

ホームページ等

http://www.juntendo.ac.jp/graduate/laboratory/lab0/bunshi_byori/k4.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 敏之 (KOBAYASHI TOSHIYUKI)

順天堂大学大学院・医学研究科・准教授
研究者番号：40260070