

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 23 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010~2011

課題番号：22790688

研究課題名（和文）心肥大・心不全における DA-Raf の生理機能とその作用機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of physiological function and mechanism of DA-Raf in cardiac hypertrophy and heart failure

研究代表者

高野 晴子 (TAKANO HARUKO)

千葉大学・バイオメディカル研究センター・機関研究員

研究者番号：40532891

研究成果の概要（和文）：

私たちが発見した DA-Raf は、A-Raf 遺伝子から選択的スプライシングにより生じ、上流の活性化 Ras に結合するが、下流にシグナルを伝えるキナーゼドメインを欠いている。DAraf を欠損するノックアウトマウスは、筋線維芽細胞の形成が抑制されるために肺気腫様の形態を示す。一方、DA-Raf が高発現する II 型肺胞上皮 (AE2) 細胞は、筋線維芽細胞へと上皮間充織転換 (EMT) を起こすが、DAraf の RNAi によってこの EMT が抑制された。したがって、DA-Raf は Ras-ERK カスケードに拮抗することにより、AE2 細胞から筋線維芽細胞への EMT を促し、肺胞形成に必須の役割を担っていると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

We have identified DA-Raf (deleted A-Raf), which is generated by alternative splicing from *Araf* gene. It contains the Ras-binding domain, but lacks the kinase domain. To elucidate physiological functions of DA-Raf and their mechanisms, we generated *DAraf* gene-deficient (KO) mice, in which *Araf* expression is not affected. Lung alveoli were poorly developed due to the lack of myofibroblasts in the KO mice. On the other hand, alveolar epithelial type 2 cells (AEC2), which expressed DA-Raf at high level, might transform by epithelial-mesenchymal transition to myofibroblasts. These results imply that DA-Raf plays essential roles in alveolarization by regulating the Ras-ERK pathway in AEC2-myofibroblast transition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子心臓病態学

1. 研究開始当初の背景

(1) DA-Raf は Ras-ERK カスケードの抑制因子である

増殖や分化など細胞の基本機能を制御する Ras-ERK カスケードは複数の負のシグナル制御因子によって複雑に調節されている。bFGF に代表される増殖因子のシグナルを受け取った Ras タンパク質は Raf ファミリータンパク質と結合し、活性化する。活性化した Raf は下流の MEK-ERK 経路を活性化し、遺伝子発現を調節する。Raf ファミリータンパク質は A-、B-、C-Raf と三種類から構成され、保存された領域として Ras や脂質との結合領域を含む CR1、セリンやスレオニンに富む CR2、キナーゼ領域を含む CR3 がある。申請者らが M-Ras に結合するタンパク質として同定した DA-Raf は A-Raf の新規スプライシングアイソフォームであり、下流の MEK をリン酸化するキナーゼドメインを欠いている (図 1)。この構造から、DA-Raf は Raf ファミリーの生理的ドミナントネガティブ体として機能し、Ras-ERK カスケードを負に調節すると考えられた。実際に、申請者のグループは、DA-Raf が活性化 Ras と結合することによって v-K-Ras でトランスフォームした NIH3T3 細胞のがん形質を低減させることや Ras-ERK カスケードが負に調節する筋細胞分化を促進す

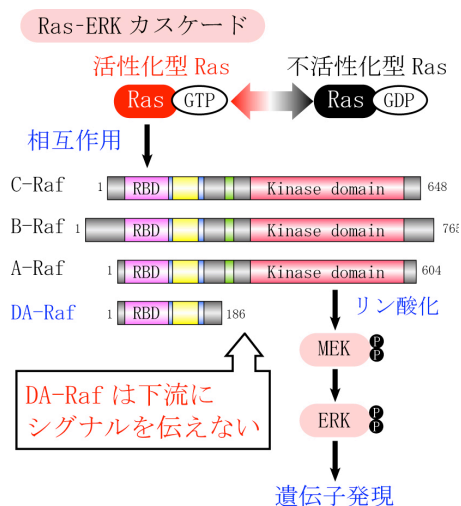


図 1

DA-Raf は活性化型 Ras に結合するが、キナーゼドメインを欠くために下流にシグナルを伝えないことを明らかにしている [引用 1]。

(2) DA-Raf ノックアウトマウスは発生異常を呈する

申請者は DA-Raf が *in vivo* においても Ras-ERK カスケードの生理的ドミナントネガティブ体として機能するかを検証するため、DA-Raf を特異的に欠損させたノックアウトマウスを作製した。このマウスは、体が小さく、活動性が亢進しており、生後一ヶ月ほどで死に至ることが明らかになった。正常マウスにおいて DA-Raf の発現部位を調べたところ、脳で高発現し、また肺や心臓でも中程度の発現が見られた。さらに、DA-Raf ノックアウトマウスの組織において、小脳の発達・分節不全、心肥大、肺の分枝不全が観察された。特に心肥大や肺の分枝不全は活性化型 Ras のトランスジェニックマウスでも観察されており [引用 2, 3]、DA-Raf の欠損が個体発生レベルで Ras-ERK カスケードの亢進に働いている可能性を強く支持している。しかしながら、正常マウスの心臓や肺における DA-Raf の生理的な発現量はそれほど多くなく、DA-Raf による Ras-ERK カスケードの抑制機構を発現量のみで説明することは困難である。そこで、DA-Raf による Ras-ERK カスケードの抑制機構を時空間的に捉えることが必須であると考えられた。

(3) DA-Raf の作用機序についての仮説

Raf ファミリーの活性化は複雑な多段階反応として理解される [引用 4]。Ras-ERK カスケードのシグナル構築基盤となる細胞膜への活性化 Raf の局在は、活性化 Ras タンパク質との親和性の向上、膜脂質への結合、リン酸化、二量体化などの要因により制御される。DA-Raf は活性化 Ras との結合や膜脂質への結合部位をもつものに対して、リン酸化や二量体化に必要な部分を欠いている。このことから、DA-Raf の細胞膜への局在は活性化 Ras や膜脂質との結合によって直接的に制御されたと考えられた。そこで、A-Raf の Ras 結合ドメイン (RBD) の結晶構造を基に、活性化 Ras や細胞膜との結合に重要と思われるアミノ酸に着目した。一方、ヒト A-Raf 遺伝子のデータベース検索から Ras 結合部位に含まれる 44 番目のセリンがフェニルアラニンに置換

した一塩基多型 (SNP) を発見した。そこで、この変異を導入した DA-Raf/S44F を作製し、活性化型 Ras に結合しないことを確認した。また、RBD に存在する 5 つの塩基性アミノ酸を酸性アミノ酸に置換した変異体

(DA-Raf/5E) を作製したところ、野生型 DA-Raf は膜脂質に強固に結合し、細胞膜に局在するのに対して、変異体 DA-Raf は細胞質に拡散した。以上のことから、DA-Raf は空間的に活性化 Ras との距離が近く、他の Raf ファミリーよりも早く活性化 Ras と結合し、効率的に Ras-ERK カスケードを抑制する可能性が考えられた。

[引用 1] *J. Cell Biol.* 17, 781-793 (2007)

[引用 2] *J. Biol. Chem.* 270, 23173-8 (1995)

[引用 3] *Genes Dev.* 21, 694-707 (2007)

[引用 4] *Mol. Cell* 17, 164-166 (2005)

2. 研究の目的

本研究では DA-Raf の生理機能を個体レベルで明らかにすること、及び、DA-Raf および Raf ファミリータンパク質の時空間的な作用機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は DA-Raf の遺伝子改変マウスを用いた解析と II 型肺胞上皮細胞株 RLE-6TN 細胞をモデルとして解析を行った。

4. 研究成果

成体マウス心臓を解析モデルとするため、129 系統への遺伝的背景の変換を行った。これにより、KO マウスの致死性は回避されたが、成体 KO マウスにおいて顕著な心肥大は認められなかった。この原因として、DA-Raf KO マウスでは肺気腫に起因する心肥大が誘導される可能性が示唆された。そこで、まず肺組織の発生異常について解析を行った。

マウスの肺胞形成は、初めに胎生 9.5 日ごろに気管支が食道から分岐し、芽がでるように分枝を繰り返す。その後、胎生 18.5 日ごろに袋状の肺胞が形成され、出生後に呼吸により肺胞内部が拡張する。さらに生後 2-5 日から肺胞隔壁が新生されることでぶどうの房状に細かく分割されていき、生後 30 日ごろに完成する。組織学的解析から、DA-Raf KO マウスでは胎生期に作られる未熟な肺胞の

形成に異常はないが、出生後に新生される小さな肺胞の形成に異常が認められ、肺胞細胞の増殖や肺胞隔壁の形成が顕著に抑制されていた。そこで、肺胞を構成する細胞のマーカータンパク質に対する抗体を用いた免疫組織染色を行ったところ、肺胞隔壁を形成する筋線維芽細胞が顕著に減少していた。また、BrdU の取り込み実験から肺胞形成過程で増殖が抑制された細胞は筋線維芽細胞であった。以上のことから、DA-Raf KO マウスの肺では出生後の肺胞形成の過程で筋線維芽細胞の増殖が顕著に抑制されたため、肺胞隔壁が形成不全になったと考えられた。その原因を明らかにするために、DA-Raf の発現を *in situ* hybridization 法と単離した肺胞上皮細胞を用いたウェスタンブロッティング法により解析したところ、DA-Raf は II 型肺胞上皮細胞に高発現していた (図 2)。さらに、発生過程における肺胞上皮細胞の MEK1/2 のリン酸化を免疫組織学的手法により検討したところ、正常マウスでは生後 2-5 日の II 型肺胞上皮細胞において MEK1/2 の顕著なリン酸化が観察され、その後の肺胞形成の進行と共に不活化された。これに対して、DA-Raf KO マウスでは、生後 7 日まで II 型肺胞上皮細胞において MEK1/2 の高レベルのリン酸化が維持されていた。一方、II 型肺胞上皮細胞株 RLE-6TN はトランスフォーミング増殖因子 (TGF- β 1) の刺激により筋線維芽細胞へと上皮間充織転換 (EMT) することが知られている。この細胞において siRNA により *DArf* をノックダウンすると TGF- β 1 で誘導される EMT が抑制された。さらに、bFGF などの Ras-ERK カスケードの活性化因子は TGF- β 1 で誘導される EMT を濃度依存的に抑制した。さらに、*DArf* をノックダウンした細胞に MEK1/2 のインヒビターである U0126 を添加すると EMT が回復した。以上の結果から、DA-Raf は Ras-ERK カスケードを抑制することによって、II 型肺胞上皮細胞から筋線維芽細胞への EMT を促進し、肺形成に必要な不可欠な役割を担うことが明らかになった (図 2)。

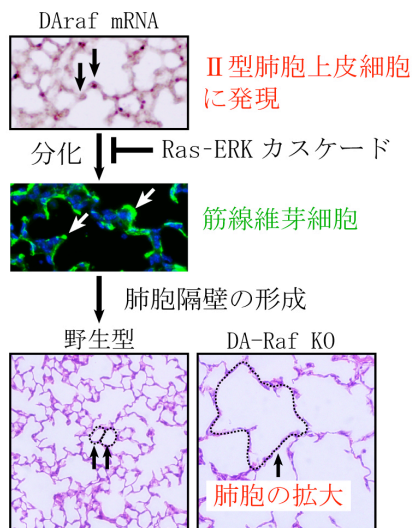


図 2

DA-Raf は II 型肺胞上皮細胞に発現し、Ras-ERK カスケードを抑制することで、II 型肺胞上皮細胞から筋線維芽細胞への上皮間充織転換を促進する

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 4 件)

- (1) Kinoshita T, Nohata N, Watanabe-Takano H, Yoshino H, Hidaka H, Fujimura L, Fuse M, Yamasaki T, Enokida H, Nakagawa M, Hanazawa T, Okamoto Y, Seki N. 査読有 Actin-related protein 2/3 complex subunit 5 (ARPC5) contributes to cell migration and invasion and is directly regulated by tumor-suppressive microRNA-133a in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Oncol.* doi: 10.3892/ijo.2012.1390. (2012)
- (2) Kinoshita T, Nohata N, Fuse M, Hanazawa T, Kikkawa N, Fujimura L, Watanabe-Takano H, Yamada Y, Yoshino H, Enokida H, Nakagawa M, Okamoto Y, Seki N. 査読有 Tumor suppressive microRNA-133a regulates novel targets: Moesin contributes to cancer cell proliferation and invasion in head and neck squamous cell carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 418(2), 378-383 (2012)

- (3) Yoshida N, Kitayama D, Arima M, Sakamoto A, Inamine A, Watanabe-Takano H, Hatano M, Koike T, Tokuhisa T. 査読有 CXCR4 expression on activated B cells is downregulated by CD63 and IL-21. *J. Immunol.*, 186(5), 2800-2808 (2011)
- (4) Takano K, Watanabe-Takano H, Suetsugu S, Kurita S, Tsujita K, Kimura S, Karatsu T, Takenawa T, and Endo T. 査読有 Nebulin and N-WASP cooperate to cause IGF-I-induced sarcomeric actin filament formation. *Science*, 330(6010), 1536-1540 (2010)

[学会発表] (計 4 件)

- (1) ○渡邊-高野晴子, 横山隆志, 幡野雅彦, 徳久剛史, 高野和儀, 遠藤剛「Ras-ERK カスケードのアンタゴニスト DA-Raf は肺胞形成に不可欠である」第 84 回日本生化学会大会 (2011, 9/23, 京都)
- (2) ○渡邊-高野晴子, 横山隆志, 幡野雅彦, 徳久剛史, 高野和儀, 遠藤剛「Ras-ERK カスケードの拮抗因子 DA-Raf は肺胞形成に必須の役割を担っている」第 63 回日本細胞生物学会大会 (2011, 6/28, 札幌)
- (3) ○渡邊-高野晴子, 横山隆志, 幡野雅彦, 徳久剛史, 高野和儀, 遠藤剛「Ras-ERK カスケードのアンタゴニスト DA-Raf は肺形成を制御している」BMB2010 (第 33 回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, 12/10, 神戸)
- (4) ○渡邊-高野晴子, 幡野雅彦, 横山隆志, 藤村理紗, 徳久剛史, 高野和儀, 遠藤剛「遺伝子ノックアウトマウスを用いた DA-Raf の生理的機能の解析」第 62 回日本細胞生物学会大会 (2010, 5/21, 大阪)

[図書] (計 1 件)

- (1) 高野和儀, 渡邊-高野晴子, 遠藤剛「Nebulin と N-WASP の複合体が IGF-1 による筋原線維のアクチン線維形成を担う」実験医学, 29(8) (5 月号) 羊土社, 1273-1276 (2011)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高野 晴子 (TAKANO HARUKO)

千葉大学・バイオメディカル研究センター・機関研究員

研究者番号：40532891

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：