

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501272

研究課題名(和文) 線虫を用いた RASSF と相互作用するチェックポイント分子の探索

研究課題名(英文) Search for RASSF-interacting molecules using *C. elegans*

研究代表者

堀 利行 (Hori, Toshiyuki)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：70243102

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：RASSFの線虫ホモログT24F1.3(*rasf-1*)と相互作用する分子をyeast two hybrid systemを用いてスクリーニングし、*rab-39*とF11E6.7を同定した。後者は酵母および哺乳類の*rif1*と最も近縁であることから*rif-1*と名付けた。HEK293T細胞での一過性発現系で哺乳類の相同体Rab39とRif1がRASSF1Aと結合することを観察した。それぞれの機能に関して、線虫の酸化ストレス応答において*Rasf-1*とRab-39が同一のシグナル伝達経路上に存在していること、*Rif-1*が哺乳類の*Rif1*と同様にDNA損傷修復に重要な役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We screened molecules interacting with *C. elegans* RASSF homolog, T24F1.3 (we named as *rasf-1*), by yeast two hybrid system and obtained *rab-39* and F11E6.7. We named F11E6.7 as *rif-1* because it is phylogenetically close to *rif1*. Transient expression in HEK293T cells and immunoprecipitation revealed that both mammalian homologs Rab39 and Rif1 bind to RASSF1A. As to the functions of Rab-39 and Rif-1, we demonstrated that *Rasf-1* and Rab-39 function in the same signaling pathway in response to oxidative stress and that *Rif-1* plays an important role in DNA damage repair as mammalian *Rif1*.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：がん細胞の特性 チェックポイント RASSF

1. 研究開始当初の背景

がん細胞は、DNA 損傷に対するチェックポイント機能が破綻し、染色体の数的異常、転座、特定遺伝子領域の欠損、増幅、単一塩基変異などさまざまな遺伝子異常が蓄積しやすくなっている。Rb や p53 などのがん抑制遺伝子産物をはじめとして多くの分子がチェックポイント機能に関わり、DNA 複製や染色体分離における DNA 異常を感知し細胞周期の停止やアポトーシスを誘導することが知られている。ヒトの多様ながんではこれらの遺伝子の欠損、発現低下、機能不全が高頻度に見られることから、がんの発症や悪性化にこれらの分子が関与していることが強く示唆される。

多くのがんでは欠損または発現低下が見られる RASSF1A が、MST-2 とその基質である Lats1 の相互作用を増強し Lats1 の活性化を介してアポトーシスを誘導することが示された (Mol Cell 27:962-975, 2007)。また、DNA 傷害性ストレスによって活性化される ATM が RASSF1A をリン酸化し、このことが MST2 と Lats1 の活性化と p73 の安定化を引き起こすことが報告された (Curr Biol 19:2020-2025, 2009)。以上のように、がん細胞の遺伝子の不安定化に RASSF1A の欠損、機能不全が関与して、その下流に MST (Hippo)、Lats (Warts)、YAP (Yorkie) を中核分子とするいわゆる Hippo シグナル伝達経路分子が介在していると推測されるが、RASSF1A を含めた RASSF ファミリー分子の機能については依然として不明な点が多い。

ヒトの RASSF ファミリーの遺伝子は 10 個あり、そこからさらにスプライシングの違いによっていくつかの異なったペプチドが生成される。このため、個々の RASSF 分子間の機能的重複や干渉の可能性を考慮する必要が生じ、ヒト RASSF ファミリー分子の機能解析を複雑なものにしている。そこで、われわれは、最も単純なモデル動物の一つである線虫 *C. elegans* を用いて、RASSF の本来的な機能と基本となるシグナル伝達経路を明らかにし、その結果を手がかりとしてヒトを含めた哺乳類の RASSF を含むチェックポイント機構の枢要部分の解明を試みることを思い立った。

2. 研究の目的

線虫 *C. elegans* の RASSF 相同体 T24F1.3 (*rasf-1* と命名した) の機能を個体レベルで解析し、RASSF が関与するシグナル伝達系において重要な役割を果たす未知の分子を yeast two hybrid 法を用いて探索する。同定した RASSF 関連分子の遺伝子について、feeding RNAi および遺伝子変異体との交配を用いた epistasis 解析により個体レベルでの機能を明らかにした上で、研究期間内にその遺伝子のマウスまたはヒトの相同体を単離して同様の機能が保存されているかを調べる。このようにして、単純なモデル動物で得られた知見を利用して、最終的にはヒトのがん細胞にお

ける遺伝子変異蓄積に関わる新しい分子機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) *C. elegans* の RASSF 相同体遺伝子の単離と個体レベルでの機能の解析

C. elegans の RASSF 相同体 T24F1.3 (*rasf-1*) を単離し、個体レベルでの機能を調べた。具体的には、feeding RNAi による *rasf-1* のノックダウンが亜ヒ酸による酸化ストレス応答に対してどのような影響を与えるかを検討した。ナショナルバイオリソースプロジェクトから入手した遺伝子変異体と組み合わせることにより epistasis 解析を行った。

(2) Rasf-1 と相互作用する分子の探索

rasf-1 の cDNA の全長を bait として酵母発現ベクター-pGBKT7 に組み込み、yeast two-hybrid システムを用いて線虫 cDNA ライブラリー (理研より入手) からそれらと相互作用する分子のスクリーニングを行った。得られた候補遺伝子を HA タグ付き発現ベクターに組み込み、HEK293T 細胞へのトランスフェクションと共免疫沈降の実験を行って FLAG タグを付けた Rasf-1 蛋白と結合するかどうかを調べた。

(3) 個体レベルでの機能解析

得られた候補遺伝子 *rab-39* および F11E6.3 について個体レベルでの機能解析、すなわち、DNA 傷害性ストレス負荷の条件下で feeding RNAi によるノックダウン実験、さまざまな変異体との掛け合わせによる epistasis 解析を行った。

(4) マウスおよびヒトの相同体分子の同定と RASSF との相互作用

rab-39 と F11E6.3 のマウスおよびヒト相同体をホモロジー解析にて特定し、それぞれの cDNA より RT-PCR にてクローニングした。ヒトとマウスでは 10 個の RASSF ファミリー遺伝子が存在するが、そのうち代表的ながん抑制遺伝子として知られる RASSF1A の cDNA を単離して共免疫沈降を行って結合性を調べた。

4. 研究成果

(1) *rasf-1* をノックダウンした線虫の表現型の解析

線虫内での *rasf-1* の機能を把握するために、feeding RNAi (以下 RNAi) による線虫の *rasf-1* のノックダウンを行い、その表現型を観察した。RNAi を行った線虫では、コントロールと比べ、*rasf-1* 遺伝子の発現量が約 50% 低下していることを確認した。*rasf-1* のノックダウンでは、線虫の致死や、生育速度の減少等、顕微鏡による観察で確認できる変化は見られなかった。次に、酸化ストレス源として亜ヒ酸を使用し、線虫の酸化ストレスに対する感受性を評価した。*rasf-1* 野生型の線虫に対し、卵から *rasf-1* の RNAi を行った。そして、成虫まで生育した線虫を 5 mM 亜ヒ酸を含む NGM 寒天培地上に移し、経時ごとの線虫の生存率を求めた。その結果、36 時間経

過時で、コントロールの線虫の生存率は70%で、*rasf-1*のRNAiを行った線虫の生存率は50%であった。さらに、48時間経過時で、コントロールの線虫の生存率は約20%で、*rasf-1*のノックダウンを行った線虫の生存率は、約3%であった。以上の結果から、*rasf-1*のRNAiによるノックダウンは線虫の亜ヒ酸に対する感受性を上昇させることが判明した。

(2) Rasf-1と相互作用を行う分子の探索

Rasf-1と結合する分子を網羅的に解析するために、baitに*rasf-1*を、preyには線虫cDNAライブラリーを用いてyeast two hybridスクリーニングを行った。その結果、Rasf-1と結合する分子をコードする遺伝子として新たに11個の候補遺伝子を取得した。このうち、*rab-39*とF11E6.7について解析を行った。

(3) Rab-39とRasf-1の相互作用

哺乳類において、Rabは、小胞体とゴルジ体間の小胞の輸送に関わることが知られている。これまでにRab39とRASSFの相互作用については報告されていない。RASSFは、分子中にRAドメインを有しており、RAドメインを通じて低分子量Gタンパク質であるRasと直接結合することが報告されている。RAドメインは、Rasf-1においても保存されていることから、Rasスーパーファミリーの1種のRabタンパク質であるRab-39がRasf-1とRAドメインを介して結合することが期待された。そこでまず、HEK293T細胞における一過性発現系を用いてRasf-1とRab-39の相互作用について検証したところ、共免疫沈降とWestern解析によりRasf-1とRab-39の特異的な結合を確認することができた。

次に、GxxxxGK(S/T)モチーフ内のセリンをアスパラギンに置換し、GEFとの結合能を失わせたRab-39 (GDP-bound form) および、DxxGQモチーフ内のグルタミンをロイシンに置換し、GAPとの結合能を失わせたRab-39 (GTP-bound form) を作成し、Rasf-1との結合を調べた。HEK293T細胞に、HA-Rab-39の野生型、GDP-bound formもしくはGTP-bound formとFLAG-Rasf-1を共発現させ、anti-FLAG抗体で免疫沈降を行った。免疫沈降後を行ったサンプルに対し、anti-HA抗体を用いてウェスタンブロットングを行った。その結果、Rasf-1は、GTP型のRab-39とのみ結合し、GDP型のRab-39とは結合しないことが示唆された。

(4) Rab-39はストレス応答に関与する

続いて、*rab-39*をRNAiによりノックダウンした線虫の亜ヒ酸に対する感受性の評価を行った。成虫まで成育した野生型の線虫に対し、*rab-39*のRNAiを行い、2日後、線虫を5 mM 亜ヒ酸を含むNGM寒天培地上に移した。そして経時ごとに線虫の生存数を確認し、生存率を算出した。36時間経過時でコントロールの線虫の生存率は約50%で、*rab-39*のRNAiを行った線虫の生存率は約30%であっ

た。以上の結果より、*rab-39*のRNAiによるノックダウンは、線虫の亜ヒ酸に対する感受性を上昇させた。この結果は、*rasf-1*のRNAiを行った結果と一致しており、*rab-39*が*rasf-1*と同様に、線虫の酸化ストレスに対する応答に関与している可能性が示唆された。

(5) *rab-39*変異体の酸化ストレス感受性

*rab-39*を変異させた線虫においても*rab-39*をノックダウンした場合と同様に、亜ヒ酸による酸化ストレスに対する感受性が上昇するかを調べた。そのために、*rab-39*遺伝子の第1エキソンから第2エキソンにかけて欠失している*rab-39(tm2466)*を用いて、亜ヒ酸に対する感受性の評価を行った。成虫まで生育した野生型および*rab-39(tm2466)*の線虫を5 mM 亜ヒ酸を含むNGM寒天培地上に移した。そして、経時ごとに線虫の生存数を計測し、生存率を算出した。その結果、48時間経過時で、*rab-39(tm2466)*の生存率は、約25%で、野生型の線虫の生存率は約45%であった。したがって、*rab-39(tm2466)*は、野生型よりも、亜ヒ酸に対して強い感受性を示すということが示され、*rab-39*を変異させた線虫でも*rab-39*をノックダウンした線虫と同様に、酸化ストレスに対して弱くなるということが明らかとなった。

(6) *rab-39*と*rasf-1*のepistasis解析

*rasf-1*変異体に*rab-39*のRNAi処理を行ったものとコントロールで亜ヒ酸の酸化ストレスに対する感受性を比較した。その結果、*rasf-1*の変異体の感受性をさらに低下させることはなかった。このことから、*rab-39*と*rasf-1*が酸化ストレス応答において共通のシグナル伝達経路で働いている可能性が示唆された。

(7) F11E6.7は*rif1*の線虫ホモログである

F11E6.7のホモロジー検索および系統解析により、ホモロジーは低いのが哺乳類の*rif1*と最も近縁であることが判明した。今後、我々はこの遺伝子を*rif-1*と名付けることにした。分裂酵母においてRif1はテロメア複合体の一部でありテロメアの長さを調節するのに対して、最近の研究によれば、哺乳類のRif1は正常のテロメアには局在せず、S期内チェックポイント、DNA複製タイミング、そしてDNA2本鎖切断修復に関与する。Rif-1の機能を評価するために、我々は10 - 20 μMのcamptothecin存在下における野生型と*rif-1*変異型の線虫の孵化率を測定し、その結果、孵化率は変異型で低下していたことから、Rif-1がDNA損傷修復に重要な役割を果たすことが示唆された。また、HEK293T細胞におけるHAタグ付きのRassf1Aの発現とそれに続く抗Rif1抗体による共免疫沈降実験の結果、Rassf1Aが特異的にRif1と結合することが明らかとなった。すなわち、これらのタンパク質間の相互作用が種を越えて保存されていることが明らかとなった。

(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1件)

Motohiko Takenaka, Hideki Inoue, Atsushi Takeshima, Tomonori Kakura and Toshiyuki Hori. *C. elegans* Rassf homolog, *rasf-1*, is functionally associated with *rab-39* Rab GTPase in oxidative stress response. *Genes to Cells* 査読有 18, 2013, 203-210 (doi: 10.1111/gtc.12028).

[学会発表](計14件)

安田有、渡辺大悟、安藤有美、大賀美咲、香座知典、井上英樹、堀利行: LATS2とE3プロテインリガーゼPIAS2の相互作用. 第36回日本分子生物学会年会 2013年12月5日 神戸ポートピアホテル(兵庫県)

鎌田顕志、井上英樹、今田遼介、竹中元彦、堀利行: *C. elegans* の Rif1 相同体 F11E6.6 (*rif-1*) の同定と特性化. 第36回日本分子生物学会年会 2013年12月4日 神戸ポートピアホテル(兵庫県)

道上康平、竹島淳史、渡辺大悟、井上英樹、堀利行: Tet-On 発現誘導システムを用いた TRIM3 の機能解析. 第36回日本分子生物学会年会 2013年12月4日 神戸ポートピアホテル(兵庫県)

渡辺大悟、道上康平、竹島淳史、大島遥香、前田木実、井上英樹、堀利行: TRIM3 による LATS2 タンパク質安定化の分子機構. 第36回日本分子生物学会年会 2013年12月4日 神戸ポートピアホテル(兵庫県)

鎌田顕志、井上英樹、今田遼介、竹中元彦、堀利行: 線虫と哺乳類における Rassf と Rif1 の相互作用. 第72回日本癌学会学術総会 2013年10月3日 パシフィコ横浜(神奈川県)

井上英樹、香座知典、竹島淳史、堀利行: TRIM/RBCC E3 リガーゼ NHL-1/TRIM3 は DAF-16/FOXO タンパク質の安定化を介してインスリンシグナルを制御する. 第72回日本癌学会学術総会 2013年10月3日 パシフィコ横浜(神奈川県)

Hideki Inoue, Tomonori Kakura, Atsushi Takeshima, Kouhei Michiue, Daigo Watanabe, Toshiyuki Hori. TRIM3, a TRIM/RBCC protein, interacts with LATS2 and regulates the downstream signals of the Hippo pathway. *Keystone Symposia "The Hippo Tumor Suppressor Network"*, May 20, 2013, Monterey, USA

竹島淳史、井上英樹、香座知典、道上康平、渡辺大悟、堀利行: TRIM/RBCC タンパク質 TRIM3 は YAP の局在転移を介して Hippo 経路シグナルに影響する. 第35回日本分子生物学会年会 2012年12月13日 福岡国際会議場(福岡県)

井上英樹、香座知典、竹島淳史、堀利行: TRIM/RBCC E3 リガーゼ、NHL-1/TRIM3 は DAF-16/FOXO タンパク質の安定化を介して insulin/IGF シグナルを制御する. 第35回日本分子生物学会年会 2012年12月13日 福岡国際会議場(福岡県)

井上英樹、香座知典、竹島淳史、竹中元彦、堀利行: TRIM/RBCC protein, TRIM3, regulates localization of Yes-associated protein 1 (YAP1). 第71回日本癌学会学術総会 2012年9月21日 ロイトン札幌(北海道)

竹中元彦、井上英樹、香座知典、堀利行: Small GTPase Rab39 を介する RASSF の機能解析. 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月16日 パシフィコ横浜(神奈川県)

竹島淳史、村田大樹、竹中元彦、香座知典、井上英樹、堀利行: 線虫と哺乳類における RASSF と Rab-1 の相互作用. 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月16日 パシフィコ横浜(神奈川県)

井上英樹、香座知典、竹中元彦、堀利行: *C. elegans* TRIM/RBCC protein, NHL-1, is involved in heat stress resistance. 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月16日 パシフィコ横浜(神奈川県)

竹中元彦、井上英樹、香座知典、堀利行: *C. elegans* において RASSF 相同体 T24F1.3 は Rab GTPase と機能的に相互作用する. 第70回日本癌学会学術総会 2011年10月3日 名古屋国際会議場(愛知県)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀利行 (HORI TOSHIYUKI)
立命館大学・生命科学部・教授
研究者番号: 70243102

(2) 研究分担者

井上英樹 (INOUE HIDEKI)
立命館大学・生命科学部・助教
研究者番号: 20550156