

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570166

研究課題名(和文)核内に局在して発がんシグナルを制御する新規低分子量G蛋白質の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of an atypical nuclear small GTPase in the oncogenic signal

研究代表者

多胡 憲治 (Tago, Kenji)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：20306111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)： B-Rasは細胞内で恒常的にGTP結合型を示す低分子量GTP結合蛋白質で、その細胞内局在は結合するグアニンヌクレオチドにより制御される。私たちは、 B-Rasが発がんシグナルに深く関与することを見出した。R&#61518;&#61505;干渉法により、 B-Rasはがん遺伝子産物Ras (G12V) による形質転換に必須であることを明らかにした。さらに、 B-Rasの蛋白質複合体を精製した。 B-Rasの結合分子としてTRB3、DDB1を同定した。TRB3はRas (G12V) による形質転換を抑制した。TRB3は B-RasのSUMO化を促進し、がん抑制能を示すことが示唆された。

研究成果の概要(英文)： kappaB-Ras is a nuclear-cytoplasmic GTPase that mainly present as GTP-bound form with no stimulating conditions, and its cellular localization is regulated by its bound guanine nucleotides. Here, we found that kappaB-Ras is essential for Ras (G12V)-induced tumorigenesis, although kappaB-Ras itself lacks the oncogenic activities. To clarify the mechanism, by which kappaB-Ras is involved in Ras (G12V)-caused tumorigenesis, we purified the protein complexes including kappaB-Ras2, and identified novel interacting proteins of kappaB-Ras, such as TRB3 and DDB1. TRB3 exhibited the tumor suppressive activity against Ras (G12V). Furthermore, TRB3 induced SUMOylation of kappaB-Ras, and this seems to cause the inhibition of Ras (G12V)-induced transformation. These observations suggest that kappaB-Ras harbors the critical roles in tumorigenesis induced by oncogenic Ras, and this is most likely to be regulated by novel tumor suppressor TRB3 through the SUMOylation of kappaB-Ras.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：シグナル伝達 発がんシグナル Gタンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

低分子量 GTP 結合蛋白質は、GDP 結合型から GTP 結合型への変換により活性化される細胞内シグナル伝達経路の分子スイッチとして機能する。低分子量 GTP 結合蛋白質は、細胞の増殖や分化を誘導する重要なシグナル分子であり、低分子量 GTP 結合蛋白質の活性調節機構の破綻が様々な疾患に深く関与する。例えば、大腸がんや膵臓がんなど多くの固形癌では、低分子量 GTP 結合蛋白質 Ras の恒常的活性化を引き起こす Ras(G12V)などの突然変異が見出されている。また、これまでに数多くの低分子量 GTP 結合蛋白質が同定され、その機能が解析されてきたが、現在もその分子種と機能は多様性を広げている。

$\kappa$ B-Ras は Ghosh らのグループにより、転写因子 NF- $\kappa$ B を阻害する低分子量 GTP 結合蛋白質として同定された (Fenwick C. *et al. Science*, 2000)。これまでに私達は、 $\kappa$ B-Ras が、(1) GTP/GDP の結合状態に依存して、核と細胞質の間を移動すること、(2) 転写活性化因子 p300/CBP と NF- $\kappa$ B との結合を抑制することにより、NF- $\kappa$ B の活性化を阻害するという分子機構を明らかにした (Tago K. *et al. J. Biol. Chem.*, 2010)。

## 2. 研究の目的

最近になり、私達は  $\kappa$ B-Ras が、がん遺伝子 Ras (G12V) を起点とした発がんシグナルにおいても重要な役割を担っていることを見出した。Ras (G12V) はマウス線維芽細胞の形質転換 (がん化) を引き起こすが、shRNA による内在性  $\kappa$ B-Ras の発現抑制は、Ras (G12V) による形質転換を完全に阻害した。さらに、 $\kappa$ B-Ras を介した発がん機構を明らかにするため、私達は  $\kappa$ B-Ras の蛋白質複合体を精製した。その結果、 $\kappa$ B-Ras 結合分子として、細胞の生存、増殖シグナルなど様々な生理機能に関わることが報告されている様々な蛋白質を同定した。 $\kappa$ B-Ras はこれらの結合分子の機能を介して、発がんシグナルに関わっている可能性が考えられた。従って、本研究は  $\kappa$ B-Ras およびその結合分子の機能を明らかにし、 $\kappa$ B-Ras による発がんの分子機構を解明することを目的として行われた。

## 3. 研究の方法

### (1) $\kappa$ B-Ras の形質転換能への影響とそのシグナル伝達系の解析

$\kappa$ B-Ras および  $\kappa$ B-Ras 結合蛋白質、さらにはそれらに対する shRNA を発現するレトロウイルスをそれぞれ作成し、NIH-3T3 細胞に感染した。その後、Ras (G12V) による形質転換能に対する影響について軟寒天培地を用いたコロニーの形成アッセイにより評価した。また、細胞抽出液について、各種抗体を用いたイムノプロットによ

り、シグナル伝達系や各種蛋白質の発現レベルについて解析した。

### (2) $\kappa$ B-Ras 結合蛋白質の同定

$\kappa$ B-Ras の C 末端に FLAG タグおよび His タグをタンデムに付加した蛋白質を NIH-3T3 細胞に発現し、その後、二段階のアフィニティークロマトグラフィーにより、蛋白質複合体を精製した。得られた複合体をトリプシンで消化後、LC-MS 解析により含まれる  $\kappa$ B-Ras 結合蛋白質を同定した。

## 4. 研究成果

NIH-3T3 細胞に  $\kappa$ B-Ras を発現するレトロウイルスを感染し、Ras (G12V) による形質転換能に対する影響を検討した。 $\kappa$ B-Ras の強制発現は Ras (G12V) による形質転換能を顕著に促進した。一方、shRNA による内在性  $\kappa$ B-Ras の発現抑制は、Ras (G12V) による形質転換能を顕著に阻害した。興味深いことに、 $\kappa$ B-Ras の発現抑制は、Ras (G12V) によるプロテインキナーゼ mTORC1 の活性化を阻害していた。そこで、 $\kappa$ B-Ras を介した発がん機構を明らかにするため、私達は  $\kappa$ B-Ras の蛋白質複合体から同定されていた  $\kappa$ B-Ras 結合分子の中で、とくに細胞の生存、増殖シグナルなど様々な生理機能に関わることが報告されている小胞体 (ER) ストレス関連蛋白質 TRB3 (Tribbles-Homologue 3)、SmgGDS および DDB1 などに着目し、研究を行った。TRB3 と DDB1 の Ras (G12V) による形質転換能への影響を検討したところ、TRB3 は Ras (G12V) による発がんシグナルに対して抑制的に作用するのに対して、DDB1 はむしろ Ras (G12V) による形質転換能を促進するという逆の効果を示した。 $\kappa$ B-Ras はこれらの結合分子に対する機能制御を介して、Ras (G12V) による発がんシグナルに関わっている可能性が考えられた。 $\kappa$ B-Ras 結合蛋白質として TRB3 が同定された当初、私達は  $\kappa$ B-Ras が TRB3 によるがん抑制能を解除するのではないかと予想した。しかしながら、 $\kappa$ B-Ras の過剰発現は TRB3 による形質転換抑制能をわずかながら有意に解除することはできたものの、その効果は我々の予想したレベルよりはるかに低く、我々の当初の仮説を支持する実験結果は得られなかった。むしろ、TRB3 は  $\kappa$ B-Ras による形質転換促進効果を抑制することが明らかになり、TRB3 は  $\kappa$ B-Ras の抑制分子である可能性が示唆された。さらに、TRB3 を過剰発現した条件下では、 $\kappa$ B-Ras のバンドシフトが検出された。検討の結果、TRB3 は  $\kappa$ B-Ras の SUMO 化を促進することが明らかになり、 $\kappa$ B-Ras のバンドシフトの原因と考えられた。SUMO 化は様々な蛋白質の機能を修飾することが知られており、TRB3 は SUMO 化を誘導することによって  $\kappa$ B-Ras の機能を負に制御することで、Ras (G12V) 形質転換能を抑制している可能性が考えられた。SUMO と  $\kappa$ B-Ras の融合蛋白質を NIH-3T3 細胞に発現すると、Ras

(G12V) による形質転換能および mTORC1 の活性化が顕著に阻害されることが分かった。TRB3 は、ER ストレスに応答して発現するがん抑制蛋白質として同定されたが、未だにその機能、発がんシグナルを抑制する作用機序は報告されていない。本研究により、TRB3 が SUMO 化を介して機能する新しいタイプのがん抑制遺伝子産物であることが示された。現在まで、TRB3 が  $\kappa$ B-Ras の SUMO 化を促進する分子機構は明らかでなく、今後はその解明が重要であると考えられる。また、その他の  $\kappa$ B-Ras 結合蛋白質、とくに DDB1 や SmgGDS の機能解析も今後の重要な課題と考えられる。

## 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 11 件)

Effect of chemical modification on the ability of pyrrolidinium fullerene to induce apoptosis of cells transformed by JAK2 V617F mutant. Funakoshi-Tago M, Tsukada M, Watanabe T, Mameda Y, Tago K, Ohe T, Nakamura S, Mashino T, Kasahara T. *Int Immunopharmacol.* 20(1):258-263. (2014) doi: 10.1016/j.intimp.2014.02.035.

Arf tumor suppressor disrupts the oncogenic positive feedback loop including c-Myc and DDX5. Tago K, Funakoshi-Tago M, Itoh H, Furukawa Y, Kikuchi J, Kato T, Suzuki K, Yanagisawa K. *Oncogene*, (2014) doi: 10.1038/onc.2013.561.

Increased ubiquitination and the crosstalk of G protein signaling in cardiac myocytes: Involvement of Ric-8B in Gs suppression by Gq signal. Jenie R, Nishimura M, Fujino M, Nakaya M, Mizuno N, Tago K, Kurose H, Itoh H. *Genes to Cells* 18 (12): 1095-1106. (2013) doi: 10.1111/gtc.12099.

Critical role of FANCC in JAK2 V617F mutant-induced resistance to DNA cross-linking drugs. Ueda F, Sumi K, Tago K, Kasahara T, Funakoshi-Tago M. *Cell Signal.* 25(11): 2115-2124. (2013) doi: 10.1016/j.cellsig.2013.07.003.

Critical roles of Myc-ODC axis in the cellular transformation induced by myeloproliferative neoplasm-associated JAK2 V617F mutant. Funakoshi-Tago M, Sumi K, Kasahara T, Tago K. *PLoS One.* 8(1): e52844. (2013) doi: 10.1371/journal.pone.0052844.

Rab33a mediates anterograde vesicular transport for membrane exocytosis and axon outgrowth. Nakazawa H, Sada T, Toriyama M, Tago K, Sugiura T, Fukuda M, Inagaki N. *J Neurosci.* 32(37):

12712-12725. (2012) doi: 10.1523/JNEUROSCI.0989-12.2012.

Phosphorylation of doublecortin by protein kinase A orchestrates microtubule and actin dynamics to promote neuronal progenitor cell migration. Toriyama M, Mizuno N, Fukami T, Iguchi T, Toriyama M, Tago K, Itoh H. *J Biol Chem.* 287(16): 12691-12702. (2012) doi: 10.1074/jbc.M111.316307.

Fullerene derivative prevents cellular transformation induced by JAK2 V617F mutant through inhibiting c-Jun N-terminal kinase pathway. Funakoshi-Tago M, Nagata T, Tago K, Tsukada M, Tanaka K, Nakamura S, Mashino T, Kasahara T. *Cell Signal.* 24(11): 2024-2034. (2012) doi: 10.1016/j.cellsig.2012.06.014.

Aurora kinase A critically contributes to the resistance to anti-cancer drug cisplatin in JAK2 V617F mutant-induced transformed cells. Sumi K, Tago K, Kasahara T, Funakoshi-Tago M. *FEBS Lett.* 585(12): 1884-1890. (2011) doi: 10.1016/j.febslet.2011.04.068.

Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, Apigenin, Luteolin and Fisetin. Funakoshi-Tago M, Nakamura K, Tago K, Mashino T, Kasahara T. *Int Immunopharmacol.* 11(9): 1150-1159. (2011) doi: 10.1016/j.intimp.2011.03.012.

Akt activation through the phosphorylation of erythropoietin receptor at tyrosine 479 is required for myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant-induced cellular transformation. Kamishimoto J, Tago K, Kasahara T, Funakoshi-Tago M. *Cell Signal.* 23(5): 849-856 (2011) doi: 10.1016/j.cellsig.2011.01.009.

### [学会発表](計 10 件)

核内における IL-33 の機能解析 . 発表者 : 太田 聡、多胡憲治、多胡めぐみ、松儀実広、柳澤 健 . 第 36 回日本分子生物学会年会 (2013 年 12 月、神戸)   
がん化型 Ras 変異体が誘起する発がんシグナルは TNF $\alpha$  による NF- $\kappa$ B の活性化を増強する . 発表者 : 多胡憲治、多胡めぐみ、太田聡、松儀実広、柳澤 健 . 第 86 回日本生化学会大会 (2013 年 9 月、横浜)

心筋細胞の G タンパク質シグナルにおける Ric-8B の機能 . 発表者 : Riris I. Jenie、仲矢道雄、水野憲一、多胡憲治、黒瀬 等、伊東 広 . 第 86 回日本生化学会大会 (2013 年 9 月、横浜)

がん抑制遺伝子産物 Arf は c-Myc と DDX5 により構成されるポジティブフィードバックループを抑制する . 発表者 : 多胡憲治、多胡めぐみ、伊東 広、

古川雄祐、菊池次郎、加藤高晴、鈴木浩一、柳澤 健．第 35 回日本分子生物学会年会（2012 年 12 月、福岡）

細胞のがん化における IL-33 の役割の解析．発表者：太田 聡、多胡憲治、多胡めぐみ、松儀実広、柳澤 健．第 35 回日本分子生物学会年会（2012 年 12 月、福岡）

低分子量 G 蛋白質  $\kappa$ B-Ras は TRB3 および DDB1 と結合して発がんシグナルに参与する．発表者：多胡憲治、多胡めぐみ、柳澤 健、杉山直之、冨田 勝、水野憲一、伊東 広．第 85 回日本生化学会大会（2012 年 12 月、福岡）

慢性骨髄増殖性腫瘍由来 JAK2 変異体のがん化シグナルにおける c-Myc-ODC 経路の役割．発表者：多胡めぐみ、鷲見和也、多胡憲治、笠原 忠．第 85 回日本生化学会大会（2012 年 12 月、福岡）

Functional involvement of an atypical nuclear-cytoplasmic small GTPase  $\kappa$ B-Ras in oncogenic signaling pathway．発表者：多胡憲治、多胡めぐみ、深尾陽一朗、杉山直之、冨田 勝、水野憲一、伊東 広．第 34 回日本分子生物学会年会（2011 年 12 月、横浜）

G タンパク質シグナルにより制御される SUMO 化とその分子機構の解析．発表者：多胡憲治、多胡めぐみ、Susanna Chiocca、水野憲一、伊東 広．第 84 回日本生化学会大会（2011 年 9 月、京都）  
微小管結合タンパク質 doublecortin の PKA によるリン酸化を介した新規アクチン骨格制御．鳥山真奈美、猪口徳一、深見岳史、多胡憲治、水野憲一、伊東 広．第 84 回日本生化学会大会（2011 年 9 月、京都）

〔図書〕（計 0 件）

該当なし

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.jichi.ac.jp/biochem/kozo/Structural\\_Biochem/HOME.html](http://www.jichi.ac.jp/biochem/kozo/Structural_Biochem/HOME.html)

6．研究組織

(1) 研究代表者

多胡 憲治 (TAGO Kenji)  
自治医科大学・医学部・講師  
研究者番号：20306111

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし