

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：34521

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590101

研究課題名(和文)アルギニンメチル化酵素による癌抑制因子 RASSF1A の機能制御

研究課題名(英文)Functional role of PRMT5 for the RASSF1A-mediated tumor suppressive functions

研究代表者

白木 孝 (SHIRAKI, Takashi)

姫路獨協大学・薬学部・准教授

研究者番号：10294208

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)：本研究ではタンデムアフィニティー精製により、アルギニンメチル化酵素であるPRMT5がRASSF1Aの新規結合蛋白質である事を見出した。細胞内局在解析により、PRMT5が微小管上でRASSF1Aと共局在している事を見出した。この事は、(1)中心体・微小管を反応の場として、RASSF1AがPRMT5のアルギニンメチル化によって機能制御されている可能性、さらに、(2)Hippoがん抑制情報伝達機構が中心体・微小管動態制御にも関与している可能性を示唆するものである。また、PRMT5がゴルジ蛋白であるGM130と共局在している事を明らかとし、ゴルジ体の安定化にも関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have identified protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) as a novel interacting protein with RASSF1A by peptide mass fingerprinting. Also, we found that co-expression of RASSF1A and PRMT5 in COS-7 cells led to partial re-localization of PRMT5 from cytosol to circular microtubule ring where it became strongly co-localized with RASSF1A. Also we found that the RASSF1A associated serine/threonine kinases; Mst1/2 and LATS, which were involved in the Hippo tumor suppressor pathway, translocated from cytosol to microtubule network on co-expression with RASSF1A. The results obtained suggest that RASSF1A links PRMT5 to microtubules and PRMT5-RASSF1A interaction plays a role in microtubule organization and that RASSF1A may play a novel role in bridging PRMT5 to arginine-methylation on microtubule, where it may play a role in modulating the RASSF1A-mediated tumor suppressive functions.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：RASSF1A PRMT5 微小管 蛋白質アルギニンメチル化

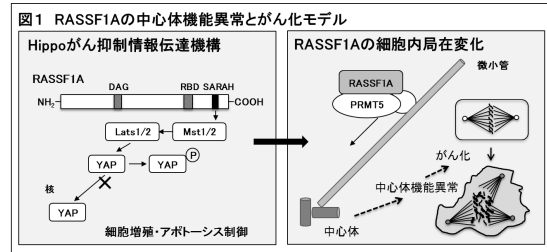
### 1. 研究開始当初の背景

中心体は動物細胞における主要な微小管形成中心であり、物質輸送、細胞分裂に重要な役割を担う細胞内小器官である。中心体は細胞分裂のM期が始まる前に倍加し、有糸分裂時の紡錘体の2極を形成した後、複製した染色体を分離して2個の娘細胞に分配される。多くの癌細胞では過剰中心体が認められ、中心体機能異常は染色体の不安定性を誘導し、細胞の癌化と密接に関連していると考えられている。例えば、中心体蛋白質であるAurora A キナーゼは乳癌細胞において発現が亢進しており、キナーゼ活性の亢進が過剰中心体を誘導する事により、有糸分裂時の多紡錘極を形成し、発癌の初期変化を誘導する可能性が示唆されている(図1右)。

近年、変異体ショウジョウバエを用いた研究より、酵母から哺乳動物に至るまで高度に保存された、新たな癌抑制系情報伝達機構(Hippo-Salvador-Warts)が見出され、上皮細胞の増殖やアポトーシスに深く関与している事が明らかとなっている。Mst1/2、Ww45、Lats1/2は、それぞれHippo、Salvador、Wartsの哺乳動物におけるホモログ蛋白質である。Mst1/2 Lats1/2 YAPのリン酸化カスケードにより、癌遺伝子であるYAPの機能を阻害する事で、細胞増殖や発癌に抑制的に作用すると考えられている(図1左)。また、Ww45、RASSF1A、Mst1/2は、それぞれ保存されたカルボキシル末端のSARAH(Salvador, RASSF1, Hippo)ドメインを介して、蛋白質複合体を形成している事が生化学手法を用いて示されている。特に、RASSF1AはHippo-Salvador-Warts情報伝達経路の足場蛋白質(scaffolding protein)として、複数の情報伝達分子との蛋白質-蛋白質相互作用により、迅速な情報伝達に重要な役割を担っていると考えられている。RASSF1Aはアミノ末端にDAGドメイン、カルボキシル末端にRBD(Ras-binding domain)および、保存されたSARAHドメインを有したアダプター蛋白質である。RASSF(RAS-association domain family)は、低分子量GTP結合蛋白質Rasのエフェクターとして、新たに見出された情報伝達分子群で、RASSF1-8の8つのアイソフォームが存在する。B-RafやPI3-KなどのRasエフェクターが、遺伝子変異する事で発癌に関係するのと異なり、RASSFは癌抑制性の情報伝達分子であると考えられている。RASSF1Aはプロモーター領域のメチル化により、多くの癌細胞において発現が抑制されており、p53とならぶ主要な癌抑制遺伝子の一つである。

Hippo-Salvador-Warts情報伝達を構成する一連の情報伝達分子(Mst1/2、Ww45、Lats1/2、RASSF1A)は、それぞれ細胞周期の一時期に中心体に局在する事が報告されている。また、RASSF1A、Lats2は主要な中心体キナーゼであるAurora Aにより、リン酸化修飾される事が報告されており、

Hippo-Salvador-Warts情報伝達と中心体・微小管ネットワーク制御との関連が注目されている(図1右)。



### 2. 研究の目的

本研究では、分子生物学的、プロテオミクス技術を駆使して、RASSF1A-PRMT5複合体形成の分子メカニズムならびに、中心体・微小管ネットワーク制御における意義を明らかとする事を第一の目的とする。また、RASSF1Aの新規結合中心体蛋白質を同定・機能解析する事により、中心体・微小管制御ならびに、Hippo-Salvador-Warts情報伝達の新たな活性制御機構を見出す事を第二の目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) RASSF1Aの新規結合蛋白質の同定: FLAG、HAの二つのタグを融合したRASSF1A(FLAG-HA-RASSF1A)を用いた二段階免疫沈降法により、新規RASSF1A結合蛋白質を同定する。まず、FLAG-HA-RASSF1Aの過剰発現細胞を作製し、非変性条件下において可溶化し、抗FLAG、抗HA抗体を用い段階的に共免疫沈降する事により、FLAG-HA-RASSF1Aを構成成分とする蛋白質複合体を精製する。次に、電気泳動、質量分析法により分離蛋白質を解析する。

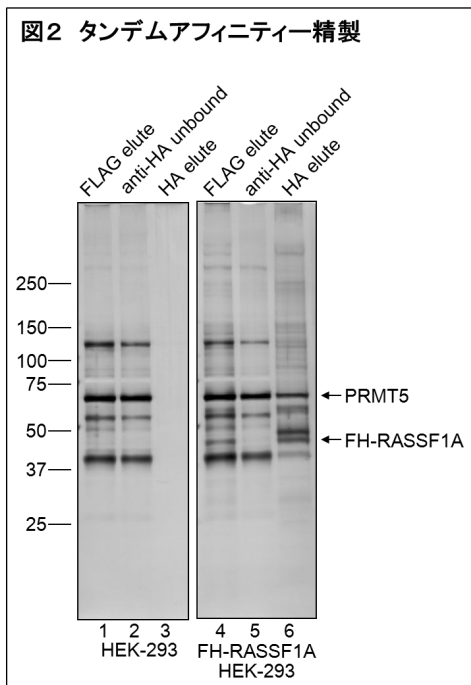
(2) RASSF1Aの細胞内局在変化の解析: 可視化蛍光技術による解析: 生細胞でリアルタイムにモニターするため、GFP融合蛋白質を発現させた哺乳動物細胞株を作製し、RASSF1Aの細胞内局在動態を解析する。免疫組織化学による解析: GFP融合蛋白質を用いた実験より見出した知見は、内在性蛋白質に対する抗体を用いて、実験結果の再現性を確認する。また、FLAG、HAなどの比較的小さいタグとの融合蛋白質を発現させた各種細胞株で、抗タグ抗体を用いて局在変化を解析する。また、適宜、電子顕微鏡を用いて局在特性の詳細を観察する。中心体・微小管動態変化の解析: 抗チューブリン抗体、抗チューブリン抗体を用いた免疫組織化学的解析により、中心体周期、微小管形成(星状体形成)を解析する。また、微小管形成阻害あるいは、安定化の各種薬剤を用いて、微小管動態変化とRASSF1Aの細胞内局在変化との関連を解析する。

(3) アルギニンメチル化の解析: PRMT5による、RASSF1Aのアルギニンメチル化は、抗メチル化アルギニン抗体(SYM10)を用いて、

免疫生化学的に解析する。

#### 4. 研究成果

(1) タンデムアフィニティー精製により、アルギニンメチル化酵素である PRMT5 (protein arginine methyltransferase 5) が、RASSF1A の新規結合蛋白質である事を見出した(図2)。アルギニンメチル化は翻訳後修飾の一つとして、転写因子、ヒストン蛋白質など、様々な蛋白質の機能制御における役割が注目されている。PRMTs (PRMT1-9) はアルギニン残基にメチル基を転移させる酵素ファミリーであり、ヒストン蛋白質・mRNA スプライシング因子・転写因子など核内蛋白質の機能制御に関与している事が知られている。一方、細胞内局在解析により PRMTs は細胞質内にも多く分布しており、核内と同様に細胞質も PRMT の主要な反応の場である可能性が示唆されている。また、他の PRMT と異なり PRMT5 はゴルジ蛋白質、クロマチンリモデリング因子、がん抑制因子 p53 など、多くの蛋白質と相互作用し細胞増殖・アポトーシス誘導に関与している事が報告されており、がん抑制の標的分子としても注目されている。PRMT5 との相互作用は RASSF1A の細胞内局在変化ならびに、Hippo-Salvador-Warts 情報伝達の新たな活性制御機構である可能性が示唆された。



(2) RASSF1A の細胞内局在解析: PRMT5 は細胞質ならびに核に局在する蛋白質であるが、RASSF1A と共発現させる事により PRMT5 は微小管上で RASSF1A と共局在する事を見出した(図3A)。次に、微小管の安定化が PRMT5 の局在変化(細胞質あるいは核 微小管)を引き起こした可能性に注目し、微小管安定化剤(Taxol)を用いて同様の解析を行った(図3B)。内在性の RASSF1A を発現していない

哺乳動物細胞を Taxol で前処置し微小管の安定化を引き起こしたが、PRMT5 の微小管への局在変化は認められなかった。この事は、PRMT5 の微小管への局在変化には、RASSF1A の関与が必須である可能性を示唆するものである。また、中心体・微小管を反応の場として、RASSF1A あるいは他の Hippo 情報伝達分子が、PRMT5 のアルギニンメチル化によって機能制御されている可能性、さらに、Hippo ががん抑制情報伝達機構が中心体・微小管動態制御に関与している可能性を示唆するものである。

図3A PRMT5とRASSF1Aの共局在

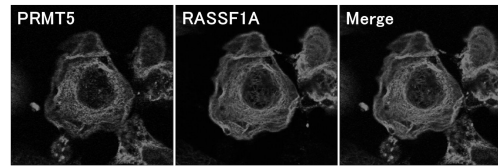
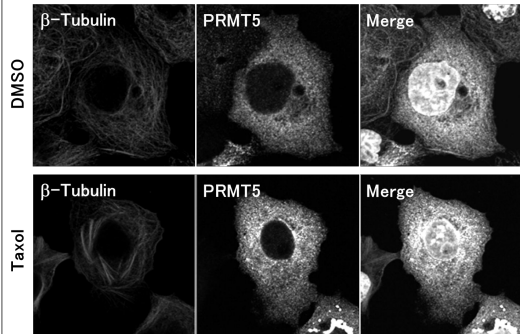
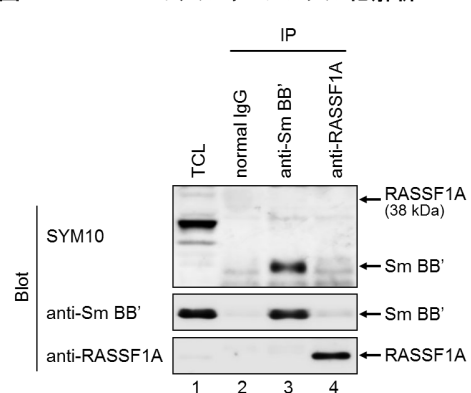


図3B Taxol処置によるPRMT5の局在変化



(3) アルギニンメチル化の解析: 抗メチル化アルギニン抗体(SYM10)を用いて、RASSF1A のアルギニンメチル化を解析した。スプライソソーム構成蛋白質の一つである SmBB' を SYM10 の陽性対照として用いた。SmBB' はアルギニンメチル化されている事が確認されたが、RASSF1A は生体内においてアルギニンメチル化の修飾を受けていない事が明らかとなった。この事は、RASSF1A は PRMT5 と相互作用をするものの、PRMT5 の直接の基質ではない可能性を示唆している。

図4 RASSF1Aのアルギニンメチル化解析



## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

酒井伸也

癌抑制因子 RASSF1A を介したがん抑制作用に関する PRMT5 の機能的役割

第 87 回日本薬理学会年会

平成 26 年 3 月 19 日～21 日

仙台

酒井伸也

癌抑制因子 RASSF1A に相互作用するシグナル分子の同定

第 35 回日本分子生物学会年会

平成 24 年 12 月 11 日～14 日

福岡

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

白木 孝 (SHIRAKI, Takashi)

姫路獨協大学・薬学部・准教授

研究者番号：10294208

(2)研究分担者

柴田 克志 (SHIBATA, Katsushi)

姫路獨協大学・薬学部・教授

研究者番号：70296565

(3)研究分担者

酒井 伸也 (SAKAI, Nobuya)

姫路獨協大学・薬学部・講師

研究者番号：30525077

(4)連携研究者

輿水 崇鏡 (KOSHIMIZU, Taka-aki)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20392491

(4)連携研究者

今西 順久 (IMANISHI, Yori-hisa)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：80255538