

機関番号：37111
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21790331
 研究課題名（和文） 新規癌関連遺伝子 KRAP 過剰発現系の樹立とそれを用いた
 癌での KRAP 機能研究
 研究課題名（英文） Establishment of KRAP-transgenic mice and elucidation of KRAP
 function in cancer
 研究代表者
 藤本 崇宏 (TAKAHIRO FUJIMOTO)
 福岡大学・医学部・講師
 研究者番号：10446114

研究成果の概要（和文）：我々は KRAP 遺伝子過剰発現マウスを樹立し、その肝臓を材料として KRAP 結合蛋白の同定を試み、シグナル関連分子 X を同定した。KRAP はシグナル関連分子 X と培養下のヒト癌細胞ならびにマウス生理組織の両者において共局在するとともに、この分子間相互作用は生化学的手法によっても確かめられた。また、培養細胞での KRAP 発現抑制はシグナル関連分子 X の機能を抑制したことから、KRAP がシグナル関連分子 X への結合とその機能調節を介した細胞内シグナル調節に関与する分子であることが示された。

研究成果の概要（英文）：We generated KRAP-transgenic (TG) mice and identified intracellular signal-related molecule (X) as an associating protein of KRAP by using the TG-liver homogenate. KRAP colocalized with X molecule in both cultured cancer cell lines and mouse physiological tissues. Furthermore, the molecular association between KRAP and X molecules was validated by biochemical analyses. Finally, suppression of KRAP expression in living cells inhibited X-mediated signal transduction. These results showed that KRAP contributes to the regulation of intracellular signal transduction via physical association with X molecule.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2010年度 | 1,500,000 | 450,000 | 1,950,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：分子・細胞生物学、分子病態学
 科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学
 キーワード：KRAP、結合蛋白、癌

1. 研究開始当初の背景

我々は、大腸癌細胞株において活性化 KRAS により発現上昇する遺伝子として機能未知遺伝子 *KRAP* を同定した。同遺伝子がコードする蛋白一次構造上には既知の機能ドメイ

ンが含まれず、遺伝子機能を推測することは不可能であった。これまでの我々の研究によって、同蛋白のマウスにおける生理的発現部位と、組織での細胞内局在が明らかになり、さらに *KRAP* の生理的機能を解析する目的で、*KRAP* 欠損マウスを樹立し、その表現型解析が

行われた。興味深いことに、同マウスは顕著な糖・脂質代謝異常を呈し、全身性(個体レベル)でのエネルギー恒常性の制御に重要な役割を果たす遺伝子であることが明らかにされた。しかし、*KRAP* 欠損マウスが示す代謝病態に繋がる *KRAP* の分子機能あるいは、癌における機能は不明であることから、本研究において「新規癌関連遺伝子 *KRAP* 過剰発現系の樹立とそれを用いた癌での *KRAP* 機能解析」に着手することとなった。

2. 研究の目的

分子・細胞・個体レベルでの *KRAP* 機能研究を通じて癌病態の分子機序の一端を明らかにすることは、その理解に基づいた癌あるいは代謝性疾患を対象とした新規で且つ独創的な治療・予防薬の開発に繋がる可能性がある。

本研究課題では、我々が独自に同定した癌関連遺伝子であり且つ代謝関連遺伝子でもある *KRAP* の癌での分子機能を明らかにすることを目的とし、以下の三項目を達成することで目的を果たす。

(1) 癌病態を模した *KRAP* 過剰発現マウスを樹立する。これは、*KRAP* 遺伝子単独の高発現をもたらす細胞への影響を検討するためのモデルとなり得る。導入遺伝子 *KRAP* が発現する蛋白を抗体で特異的に精製・検出するために、タグ付加型で遺伝子導入することで(2)の項目を可能にする。

(2) *KRAP* 過剰発現マウスを利用した *KRAP* 結合蛋白の同定を行い、結合蛋白候補の真偽を分子・細胞生物学的手法によって検討する。蛋白分子機能を理解する上で結合蛋白の同定とその相互作用が発揮する生物学的効果の検討は不可欠である。

(3) 同定された *KRAP* と結合蛋白間の相互作用の癌における機能的意義を明らかにする。

先行研究と本研究によって将来的にもたらされる代謝症候群に通じる *KRAP* 分子機能欠損の作用機序と、癌病態における *KRAP* 分子機能の理解は、現代社会が抱える二大疾患(癌と代謝症候群)の関連性に着目した新たなトピックを生み出す可能性がある。強いては、秩序立った制御のもと維持される個体レベルでのエネルギー恒常性制御機構と、極性・秩序が破綻した癌細胞のような単細胞レベルでのエネルギー制御機構に関する研究は新規性に富むものである。長期的展望として、日本発の *KRAP* 分子機能解析を足掛かりに、個体レベル・細胞レベルでの代謝制御と

癌研究を連関させる新領域の開拓が見込まれる。このように、本研究が取扱う「新規癌関連遺伝子 *KRAP* 過剰発現系の樹立とそれを用いた癌での *KRAP* 機能研究」は、癌病態の分子レベルでの理解のみならず代謝症候群の発症機序の理解に波及効果を及ぼす可能性があり、社会的要請の強い「罹患率が高い二大疾患の将来的な克服」を念頭においた基礎医学研究である。

3. 研究の方法

(1) *KRAP* 過剰発現マウスの樹立

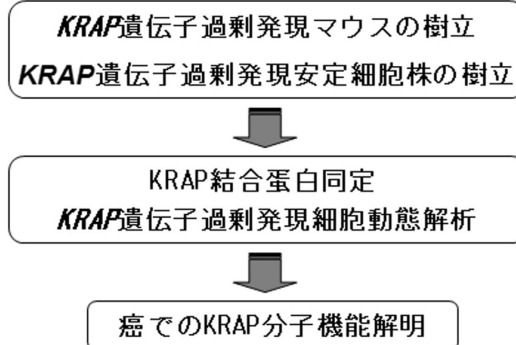
pCAGGS 発現ベクターにて *KRAP* コーディング全長領域を C 末 HA タグを付加した形でコンストラクションする。常套法にてトランスジェニックマウスを樹立する。トランスジーン由来の *KRAP*-HA 蛋白の組織発現・細胞内分布をウェスタン法および免疫組織染色法で検討する。

(2) *KRAP* 結合蛋白の同定

KRAP 過剰発現マウス組織を材料に、抗 HA 抗体による免疫沈降物中に含まれる *KRAP* 結合蛋白候補を質量分析で同定する。候補に対しては免疫沈降法などの生化学的手法と、細胞染色などの細胞生物学的手法により分子間相互作用の真偽を検討する。

(3) 癌における *KRAP*-結合蛋白間相互作用の意義づけ

培養癌細胞において RNA 干渉による *KRAP* 発現抑制を施し、結合蛋白機能の増減を検出する。機能増減の指標は同定される結合蛋白種に依り適宜選択する。



4. 研究成果

(1) *KRAP* 過剰発現マウスの樹立

KRAP 過剰発現マウス組織における *KRAP*-transgene 由来の蛋白発現を抗 HA 抗体で検討した結果、肝臓、膵臓、骨格筋、褐色脂肪組織において有意な発現が確認された(図1)。また、肝臓・膵臓における *KRAP*-HA

蛋白の細胞内局在は、過去に我々が示した内在性 KRAP 蛋白のそれと同じ様式で局在していたことから、外来性の KRAP 蛋白は内在性 KRAP 蛋白と同等の機能を保持・発揮することが期待でき、KRAP 機能研究のための良いツールとなり得るものと考えられる。

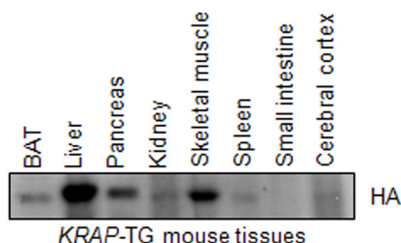


図 1: KRAP 過剰発現マウス組織における KRAP-HA 蛋白発現解析

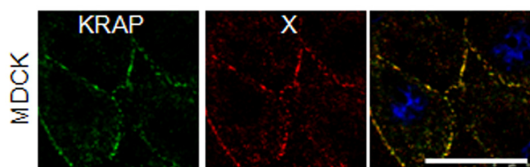
(2) KRAP 結合蛋白の同定

KRAP 過剰発現マウスの肝臓を材料に用いた共精製法にて、KRAP 結合蛋白質としてシグナル関連分子(X 分子)の同定に成功した。同分子間相互作用はマウス複数組織およびヒト癌細胞株の両者において認められることから、組織における生理的現象および癌細胞機能の両者において重要な役割を果たすものと考えられる。

さらに、KRAP および X 分子に対する特異抗体による検討で、組織内・細胞内共局在を証明した(図2)。

また両分子の相互作用に重要な蛋白領域の同定に至り、これは今後の分子間相互作用機序の詳細解析を目指した蛋白構造学的アプローチや、X 分子機能制御物質の開発を目指した応用研究への基礎情報となり得るものと考えられる。

図 2 : MDCK 細胞での KRAP 蛋白と X 分子の共局在を示す共焦点レーザー蛍光顕微鏡象



(3) KRAP-X 分子間相互作用の機能的意義づけ
癌細胞において KRAP 発現抑制を施して、その X 分子シグナル伝達能に対する効果を検討した。複数種の癌細胞株において、KRAP 発現抑制は X 分子を介したシグナル伝達を抑制したことから、KRAP が X 分子のシグナル伝達機能を正に制御する分子であることを明らかにした。

KRAP が X 分子機能に影響を及ぼす作用機所の詳細理解にはさらなる検討を要するが、我々が明らかにした KRAP の生理組織における発現様式と、他グループから多く報告されている X 分子と相互作用する蛋白群の情報を合わせて考えると、他とは異なる KRAP 独自の制御機構の存在の可能性が示唆される。

癌細胞における KRAP 過剰発現の効果や、X 分子機能調節を介したシグナル伝達制御の意義の体系的理解には今後の生物学的検討を待たなければならないが、KRAP 結合蛋白に関する知見は世界的に初めての成果であり、KRAP 分子機能側面を明らかにする大きな成果であると考えられる。

X 分子は正常組織・発生・分化・癌などにおいて多岐の生命現象に関与するシグナル伝達分子であるため、将来的に行われる KRAP-X 分子相互作用に関する研究がもたらす成果の多分野への波及効果は大きい。

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)

[学会発表] (計 3 件)

① 藤本崇宏、宮坂京子、白澤専二
新たな肥満・糖尿病治療標的としての KRAP 遺伝子
日本人類遺伝学会第 55 回大会、2010 年 10 月 28 日、埼玉

② 藤本崇宏、白澤専二
新たな肥満・糖尿病治療標的としての KRAP 遺伝子
第 2 回福岡県医学会総会、2010 年 1 月 31 日、福岡

③ 藤本崇宏、宮坂京子、笹月健彦、加藤規弘、白澤専二
Altered Energy Homeostasis and Resistance to Diet-Induced Obesity in KRAP-Deficient Mice
第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日、横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本 崇宏 (TAKAHIRO FUJIMOTO)
福岡大学・医学部・講師
研究者番号：10446114

(2)研究分担者 ()

研究者番号:

(3)連携研究者 ()

研究者番号: