

機関番号：13901
 研究種目：研究活動スタート支援
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21890097
 研究課題名（和文） RFPによるLamin Aの分解制御機構とその腫瘍悪性化における意義の解析
 研究課題名（英文） Analysis of the regulatory mechanism of Lamin A degradation by RFP and its significance in malignant transformation.
 研究代表者
 加藤 琢哉 (KATO TAKUYA)
 名古屋大学・医学系研究科・助教
 研究者番号：00551970

研究成果の概要（和文）：今回、転写調節因子 Ret Finger Protein (RFP)が核膜の支持タンパクであるLamin Aのユビキチン化を触媒することが判明した。当初想定していたLamin Aのユビキチン化による分解の制御については証明できなかったものの、RFP、Lamin Aがともに癌細胞の運動能を正に制御するという結果を得たことなどから、当初の想定とは異なるRFPによるLamin Aのユビキチン化修飾を介した制御機構の存在も示唆された。これまでにLamin Aのユビキチン化を介した制御については報告がないことから、今回の研究成果が新たなLamin Aの制御機構研究の端緒となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We found that Ret Finger Protein (RFP) catalyze the ubiquitination of Lamin A. We could not prove the degradation of Lamin A by ubiquitination as initially envisioned, however, we found that both RFP and Lamin A can positively regulate cancer cell migration. Therefore, our findings indicate another possibility that RFP regulates the Lamin A's function through its ubiquitination. Since there is no report that the mechanism regulates Lamin A through ubiquitination, our results preface the novel investigation of regulation of Lamin A.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2009年度 | 1,070,000 | 321,000 | 1,391,000 |
| 2010年度 | 970,000 | 291,000 | 1,261,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,040,000 | 612,000 | 2,652,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：Lamin A、RFP、Ubiquitin

1. 研究開始当初の背景 核の基盤構造である核ラミナは、核膜を物理的に支持することで核の構造を保持する機能を果たしていると考えられてきた。しかし、近年の研究から、核ラミナの構成成分であるLaminが核構造の保持以外に、クロマチンのダイナミクスや遺伝子の転写、複製などの核内DNA代謝などの機能を制御することで細胞機能の発現

に關与していることが明らかになってきていた。また、遺伝学的な解析から、Lamin A遺伝子の変異や発現の変化が筋ジストロフィーや早老症などの遺伝病の発症や腫瘍の悪性化等、多くの疾患に関わっていることが報告されており、病態の基礎研究及び治療の観点から多方面の研究者の注目を集めていた。

申請者が解析を行ってきた RET finger protein (RFP) は抑制的転写調節因子として知られ、腫瘍の悪性化に関与することが分かっていた。最近の申請者の解析により、RFP が Lamin A と相互作用すること、また RFP の強制発現が proteasome 依存的な Lamin A のタンパク量の減少を導くことなどが明らかとなっていた。これまでの知見とあわせて考えると、RFP による Lamin A の分解機構が腫瘍の悪性化に何らかの役割を担っていることが予想された。

2. 研究の目的 過去の研究から、Lamin が細胞の増殖、移動、分化、老化制御などの多彩な細胞機能の発現に寄与しているという報告が多数なされていた。一方で、Lamin の制御機構については未解明の部分が多かった。特に、Lamin の発現調節機構については転写、翻訳、翻訳後のいずれの段階においてもほとんど報告がなされていない状況であり、学術的に注目の集まる点であった。そこで、本研究の目的は「RFP による Lamin A の分解機構の解析を通して、核ラミナによる細胞機能の発現の制御機構とその腫瘍細胞における意義を解明すること」とした。

3. 研究の方法

(1) 開始当初までの予備的な実験で内因性の RFP と Lamin A が相互作用することを明らかにしていた。そこで、①両者がそれぞれのタンパク質のどの領域を介して相互作用しているのかを RFP、Lamin A の欠失変異体を作成し、免疫沈降実験にて明らかにする。②また、Lamin A の局在や高次構造が細胞周期依存的に変化することから、Lamin A-RFP 相互作用が細胞周期による影響を受けるのかどうかを、細胞周期同調実験と免疫蛍光染色を組み合わせた検討を計画し、実施した。

(2) 当初 RFP が Lamin A の分解を制御することで細胞機能に影響を与えていることを想定していたため、①RFP による Lamin A のユビキチン化およびタンパク量制御についての検討、②RFP および Lamin A の siRNA によるノックダウンが細胞に与える影響の検討を計画し、実施した。

4. 研究成果 Lamin A のタンパク量に RFP が与える影響を検討するため、Lamin A およ

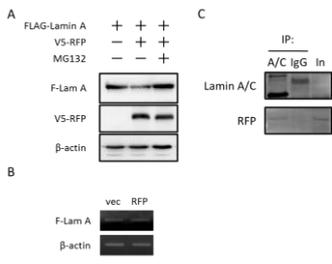


Figure 1

び RFP を強制発現させ、検討した。その結果、RFP を発現させることで外因性に発現させた Lamin A のタンパク量が減

少し、そのタンパク量の減少がプロテアソーム阻害剤である MG132 によって回復することが判明した (Fig. 1A)。また、RFP と Lamin A の相互作用を免疫沈降法で検討したところ、両者が細胞内にて相互作用していることを示す結果を得た (Fig. 1C)。そこで、RFP と Lamin A の相互作用領域について、欠失変異体を作製して検討したところ、RFP の Rfp ドメインおよび Lamin A の N 末端側で相互作用することが明らかとなった (Fig. 2)。

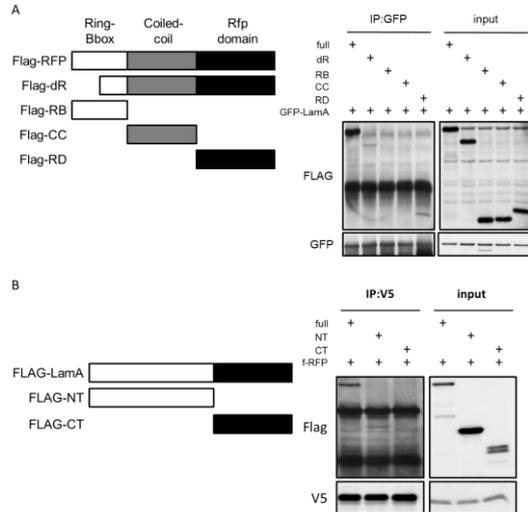


Figure 2

ここまでの結果から、RFP がユビキチン-プロテアソーム系によって Lamin A を分解していることが示唆された。そこで、RFP を siRNA によってノックダウンした場合、さらに siRNA 耐性の RFP (RFP sir) および Ring finger ドメインを欠いた RFP (delta Ring:dRing) を戻した場合にそれぞれ Lamin A

のユビキチン化にどのような影響を与えるかを検討した。その結果、RFP が自身の Ring finger ドメイン依存的に Lamin A をポリユビキチン化することが判明した (Fig. 3)。

これらの結果から、RFP が Lamin A のユビキチン化を介して分解している可能性が強まってきた。そこで、RFP が細胞内のどこで、いつ Lamin A を分解するのかを調べる必要が生じたため、細胞周期依存的な Lamin A の局在変化に伴って RFP および Lamin A の発現および局在がどのように変化するのかを検討した。その結果、間期から分裂中期の細胞では RFP と Lamin A が共局在を示し、分裂期の

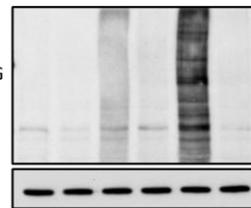


Figure 3

終期では両者の共局在が観察されなくなる
こと、また分裂期にはLamin Aのタンパク量
は増加、RFPは減少しており、間期ではその
逆の結果となった (Fig. 4A, B)。この結果
から、RFPが間期にLamin Aと相互作用して
分解することでタンパク量の調節をしている
可能性が生じた。次に、内在性のRFPが実際
にLamin Aのタンパク量の調節を行っている
かどうかを、siRNAを用いてRFPをノック
ダウンして検討した。しかしながら、当初の
想定と異なり、RFPをノックダウンした細胞
においてLamin Aのタンパク量の増加はみら
れなかった。このことから、予備実験の強制
発現系でみられたRFPの発現によるLamin A
タンパク量の減少は①内在性には特定の
条件下においてのみ観察される可能性およ
び、②両者を強制発現したことによる人工的
なものであり、分解には関与しない可能性が
でてきた。この点については今後、細胞周期
の同調をした場合でどう変化するか等、詳細
に検討する必要がある。

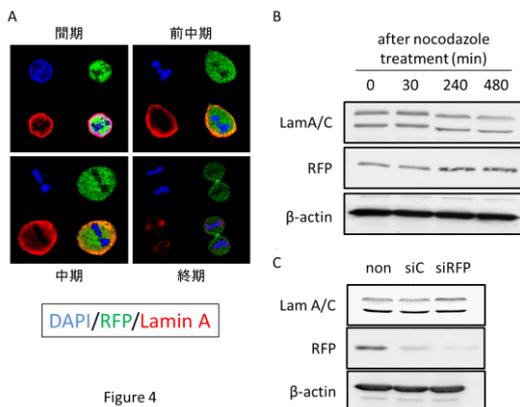


Figure 4

RFP および Lamin A が癌細胞に与える影響
について検討するため、HeLa 細胞において
RFP および Lamin A をノックダウンし、細胞
の運動能について Wound Healing Assay で検
討した。その結果 RFP、Lamin A のノックダ
ウンによって HeLa 細胞の運動能が低下する

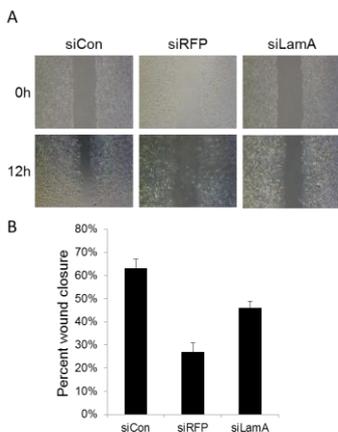


Figure 5

ということが分かった。この結果は RFP
および Lamin A が癌細胞の運動能に重要
な役割を果たしていることを示唆してい
る。

本研究の開始
当初は RFP が
Lamin A の分
解というネガ
ティブな制御

を介して癌細胞の悪性化に寄与しているも
のと想定していた。しかしながら現時点では、
内在性の RFP をノックダウンしても Lamin A
のタンパク量に変化が見られず、また RFP、
Lamin A がともに癌細胞の運動能を正に制御
することが明らかになったことから、RFP と
Lamin A が協調的に機能することで癌細胞の
悪性化に寄与している可能性が考えられた。
さらに、今回 RFP が Lamin A のポリユビキチ
ン化を触媒しているという結果が得られた。
タンパク質のポリユビキチン化はユビキチ
ン中のリジン残基に次のユビキチンが結合
することで起きる。近年、タンパク質のポリ
ユビキチン化が異なるリジン残基を介して
起こることで、分解だけでなくシグナルの伝
達や DNA 修復等の多様な現象に関与するこ
とが報告されている (Lim et al. 2006)。これ
らのことから、RFP が Lamin A をユビキチ
ン化することで分解ではなくその機能の制御
を行っていることも考えられる。今後 RFP が
Lamin A のユビキチン化を触媒する際にどの
リジン残基を介しているかを検討すること
で新たな知見を得られると考えられる。

今回の研究成果が、Lamin A のユビキチン
化による制御というこれまでに未知であつ
た細胞内機構の知見へとつながるきっかけ
となると考えている。

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 6 件)

- ① Saito S, Murakumo Y, Tsuzuki T, Dambara A, Kato T et al. Analysis of glial cell line-derived neurotrophic factor-inducible zinc finger protein 1 expression in human diseased kidney. *Hum Pathol.* 2011. in press. (査読有)
- ② Matsushita E, Asai N, Enomoto A, Kawamoto Y, Kato T et al. Protective Role of Gipi, a Girdin Family Protein, in Endoplasmic Reticulum Stress Responses in Endothelial Cells. *Mol Biol Cell.* 2011. in press. (査読有)
- ③ Kurotsuchi A, Murakumo Y, Jijiwa M, Kurokawa K, Itoh Y, et al. (申請者:7 人目) Analysis of DOK-6 function in downstream signaling of RET in human neuroblastoma cells. *Cancer Sci.* 101:1147-55, 2010. (査読有)

④ Enomoto A, Asai N, Namba T, Wang Y, Kato T et al. Roles of disrupted-in-schizophrenia 1-interacting protein girdin in postnatal development of the dentate gyrus. *Neuron*. 63:774-87, 2009 (査読有)

⑤ Tsukamoto H, Kato T, Enomoto A, Nakamura N, Shimono Y et al. Expression of Ret finger protein correlates with outcomes in endometrial cancer. *Cancer Sci*. 100:1895-901, 2009. (査読有)

⑥ Kato T, Shimono Y, Hasegawa M, Jijiwa M, Enomoto A et al. Characterization of the HDAC1 complex that regulates the sensitivity of cancer cells to oxidative stress. *Cancer Res*. 69:3597-604, 2009. (査読有)

[学会発表] (計3件)

① 加藤琢哉、Regulation of the stability of integrin alpha2 by integrin beta1、第69回日本癌学会学術総会、2010年9月22日、大阪国際会議場

② 加藤琢哉、Regulation of cell motility by RFP and its significance in endometrial cancer、8th AACR/JCA Joint Conference、2010年2月6日、ヒルトンワイコロアビレッジ (アメリカ)

③ 加藤琢哉、Regulation of cell motility by RFP and its significance in endometrial cancer、第68回日本癌学会学術総会、2009年10月3日、パシフィコ横浜

[図書] (計0件)

[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.med.nagoya-u.ac.jp/patho2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 琢哉 (KATO TAKUYA)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00551970

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし