

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592795

研究課題名(和文)Monadと相互作用する分子群による癌抑制の分子機序の解明と臨床応用

研究課題名(英文)Role of Monad-interacting complex on tumorigenesis

研究代表者

佐伯 万騎男(Saeki, Makio)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：30273692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：R2TP複合体は酵母においてHSP90の結合蛋白質として同定され、Pontin, Reptin, RPAP3, PIH1D1からなり、酵母から哺乳類までその構造、機能がよく保存されている。申請者らはMonadの結合蛋白質として見つけたR2TPについて研究を行い、これまでに、R2TP複合体がリボソーム生合成、アポトーシスに関わることを明らかにしているが、研究期間内に、申請者らは、アポトーシス誘導、リボソーム生合成に重要な経路である、mTOR複合体シグナル伝達におけるR2TPの機能解明を行い、癌とR2TPの関連性についてその成果を発表した。

研究成果の概要(英文)：R2TP was originally identified in yeast *Saccharomyces cerevisiae* as Hsp90 interacting complex, and is composed of four different proteins: Rvb1, Rvb2, Tah1, and Pih1. This complex is well-conserved in eukaryotes, and is involved in many cellular processes such as snoRNP biogenesis, RNA polymerase assembly, PIKK signaling, and apoptosis. An increasing number of research related to R2TP suggests a linkage of its function with tumorigenesis. We provide an overview of several recent studies on R2TP that are related to cell proliferation and carcinogenesis, and propose a possible role of R2TP in tumorigenesis through regulating snoRNA/snoRNP biogenesis.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：R2TP Monad mTOR Tumorigenesis

## 1. 研究開始当初の背景

申請者らが発見した新規アポトーシス誘導因子 Monad およびその結合分子である新規分子シャペロン R2TP 複合体は、アポトーシスや癌化に関わる重要な調節因子であり、申請者らは出芽酵母や哺乳類細胞の系を用いて R2TP 複合体の生化学的特性や細胞内機能の解析を行ってきた。

我々はこれまで Monad およびその結合蛋白質 Monad binding protein1 (MBP1)、Reptin について研究をすすめてきた。Monad (WD リピート 92) は WD リピートを有する蛋白質ファミリーに属し、2006 年にわれわれが新規にクローニングした遺伝子である(業績 18)。ヒトでは WD リピートを持つ蛋白質は約 100 種類が知られているが、そのほとんどは機能不明の分子である。その後我々は、アフィニティー精製と質量分析により Monad の結合蛋白質として 2008 年に MBP1 を、さらに 2009 年にはゲノムの安定性に必要であることや DNA 修復における働きが注目されている Reptin を同定した。MBP1 は他のグループにより同時期に RNA polymerase-associated protein 3 (RPAP3) として同定された。これらの研究により Monad を含む複合体が細胞内で重要な働きをしている構図が浮かび上がってきた。

これまでの研究では Monad および MBP1 はさまざまな組織で発現し、アポトーシスの実行分子である caspase を活性化する働きがあることを報告してきた。一方、Reptin を siRNA でノックダウンした細胞は DNA ダメージに対する感受性が高まることが我々や他のグループから報告されている。さらに我々は MBP1 の働きを阻害し、細胞保護的に作用する新たな蛋白質 Monad binding protein 2 (MBP2) を同定した。Reptin、Pontin、MBP1、MBP2 は R2TP 複合体を形成することが明らかになり、特に、casein kinase 2 による TEL2 のリン酸化を介して TEL2 に結合し、mTOR などを安定化させることが de Lange のグループから Molecular Cell に報告された。TEL2-mTOR は最初に発見された R2TP 複合体のターゲット分子と言えるが、我々は R2TP 複合体

のさらなるターゲット分子を探索したいと考えている。

R2TP 複合体は、トロント大学 Houry 研究室で酵母から単離された新規分子シャペロンであり、申請者らのグループも R2TP 複合体のヒトホモログを初めて単離した。R2TP 複合体は 4 種類の異なるタンパク質 [RVB1、RVB2、RPAP3、PIH1D1] から成り、巨大複合体のアセンブリーを助けるシャペロン機能があることが明らかとなっていた。

## 2. 研究の目的

我々は Monad が癌細胞の抗癌剤に対する感受性を高めることに注目し、さらには Monad の発現が癌細胞の悪性度と関連している可能性を検討するため、大阪大学医学部乳腺、内分泌外科との共同研究により、乳癌細胞患者組織の cDNA を用いた Real time PCR の結果、リンパ節転移した症例では Monad の発現が減少していることを見出した。また扁平上皮癌細胞における発現を検討した結果からも Monad の発現が扁平上皮癌細胞の悪性度と関連していることを確認した。

このように、我々が新規に見出した Monad-R2TP 複合体はがんと深い関わりがあると考えられるが、Reptin をターゲットとしたがん治療の研究として、Rosenbaum のグループのものがある。彼らは肝がん細胞株のマウスへの移植実験を用いて、Reptin のドキシサイクリン誘導性 shRNA によるノックダウンががんの進行に著効を示したことを報告している。Reptin は DNA 修復などの細胞の基本的な働きに関わる遺伝子であり、Reptin そのものは治療ターゲットとしては適当ではない。我々は Reptin を調節する遺伝子としてこれまでにわれわれが蓄積した Monad 等に関するデータを詳細に検討した結果、これらの分子ががん治療の新たなターゲットになりうると確信し、本研究を着想するに至った。本研究は R2TP 複合体の直接のターゲットとなる分子を見つけ出し、その機能を調べることを目的に行った。

## 3. 研究の方法

本研究では R2TP 複合体とがんの関わりを研究するために、特に mTOR に注目し R2TP 複合体と mTOR の結合を免疫沈降法等により確かめるとともに siRNA の手法を用いて R2TP 複合体の構成成分と mTOR の関わり、さらにはがんとの関わりを乳癌細胞をモデルにして研究した。

#### 4 . 研究成果

mTOR シグナリングは、細胞周辺の栄養状態と細胞増殖を結びつける重要なシグナル伝達経路であるが、近年、この経路の恒常的な活性化によって癌化が起こることが明らかになってきている。申請者らは、R2TP 複合体が mTOR 複合体形成をサポートすることで、リボソーム合成を正に制御し、癌化の一要因となることを明らかにした。

また、癌細胞は、増殖が早く、リボソームも盛んに合成されているため、snoRNP 生合成も亢進している。申請者らは酵母の系を用いて、R2TP 複合体が対数増殖期における snoRNP 生合成の活性化に必須であることを示し、総説にまとめた。

以上の結果から、R2TP 複合体が異なる標的因子を介して、アポトーシス誘導や細胞増殖・癌化の重要な制御因子であることが示唆された。

#### 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 4 件)

Kakahara, Y., Saeki, M. (2014) R2TP chaperone complex: its involvement in snoRNP assembly and tumorigenesis. *Biomolecular Concepts*. 5, 513-520. (査読有)

Egusa, H., Kayashima, H., Miura, J., Uraguchi, S., Wang, F., Okawa, H., Sasaki, J.I., Saeki, M., Matsumoto, T., and Yatani, H. (2014) Comparative Analysis of Mouse Induced Pluripotent Stem Cells and Mesenchymal Stem Cells during Osteogenic

Differentiation in vitro. *Stem cells and development*. 23, 2156-2169. (査読有)

Kamano, Y., Saeki, M., Egusa, H., Kakihara, Y., Houry, W.A., Yatani, H., and Kamisaki, Y. (2013). PIH1D1 interacts with mTOR complex 1 and enhances ribosome RNA transcription. *FEBS letters* 587, 3303-3308. (査読有)

Saeki, M., Egusa, H., Kamano, Y., Kakihara, Y., Houry, W.A., Yatani, H., Noguchi, S., and Kamisaki, Y. (2013). Exosome-bound WD repeat protein Monad inhibits breast cancer cell invasion by degrading amphiregulin mRNA. *PloS one* 8, e67326. (査読有)

[学会発表](計 2 件)

鎌野優弥、佐伯万騎男、上崎善規、江草宏 PIH1D1 positively regulates mTOR complex 1-dependent rRNA transcription. 第 88 回日本薬理学会年会、名古屋国際会議場(愛知県、名古屋、2015 年 3 月 18-20 日)

柿原嘉人、山崎学、Walid A. Houry、朔敬、佐伯万騎男  
分子シャペロン R2TP complex の口腔扁平上皮癌への関与 -酵母からがん研究へ- 石川県立音楽堂交流ホール、日本癌学会シンポジウム/共同利用・共同研究拠点シンポジウム(石川県、金沢、2015 年 1 月 21-22 日)

[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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.dent.niigata-u.ac.jp/pharmacology/pharmacology.html>

## 6 . 研究組織

研究代表者

佐伯 万騎男 (Saeki, Makio)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：3027369