

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430102

研究課題名(和文) Wntシグナル抑制分子RNF43のがんへの関与

研究課題名(英文) Molecular role of RNF43 in Wnt signaling and tumorigenesis

## 研究代表者

築山 忠維 (Tsukiyama, Tadasuke)

北海道大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：20399819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：膜型ユビキチンリガーゼRNF43は、正常幹細胞や各種がん細胞で高発現することが報告されていた。しかしRNF43の機能とそのがん化に關与する分子メカニズムは不明であった。本研究において以下の解明を行い報告を行った[ Tsukiyama, MCB, 35:2007 (2015)]。

1. RNF43はN末端側でFzdの発現調節を行い、Wnt/ catenin, noncanonical Wntシグナルを抑制する。2. C末端側でDvlとの結合依存的に noncanonical Wntシグナルを抑制する。3. がんにおけるRNF43のミスセンス変異がWnt/ cateninシグナルの過剰活性化を引き起こす。

研究成果の概要(英文)：Wnt signaling pathways are tightly regulated by ubiquitination of their signal transducers and dysregulation of these pathways promotes the tumorigenesis. It has been reported that an ubiquitin ligase RNF43 plays important role in the Fzd-dependent regulation of Wnt signaling pathways. We recently reported that N-terminal of RNF43 is indispensable to regulate Fzd-dependent suppression of Wnt signaling pathways although C-terminal of RNF43 is able to inhibit noncanonical Wnt signaling in a Fzd-independent but Dvl-dependent fashion. In addition missense mutations found in cancer patients convert the function of RNF43 to the positive regulator of Wnt/ catenin signaling and establish a positive feedback loop of Wnt/ catenin signaling to accelerate tumorigenesis. These results have been published in a scientific journal [ Tsukiyama, MCB, 35:2007 (2015)].

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：Wnt RNF43 Fzd Dvl ubiquitin tumorigenesis

### 1. 研究開始当初の背景

Wnt/ $\beta$ catenin シグナルの異常活性化と発がんの密接な関係は古くから知られており、その一例として家族性大腸がんにおいて  $\beta$ catenin の分解に重要な役割を果たしている APC 遺伝子の変異が同定された。その後も  $\beta$ catenin の分解にユビキチンリガーゼの SCF<sup>F<sub>3</sub></sup><sub>CP</sub> が関与するだけでなく、Wnt シグナルのエフェクターの 1 つである Dvl が NEDL1 や Inversin によって、また Axin が RNF146 によってユビキチン化依存的に分解されることが明らかにされてきた。これらの研究により、Wnt シグナルの活性調節においてタンパク質のユビキチン化依存的調節機構が  $\beta$ catenin のみならず、その他の調節因子に対しても非常に重要な役割を果たしていることが明らかになっていった。申請者らはこれらの背景と実績に基づいて、Wnt シグナルをユビキチン化依存的に調節している新規分子の同定とその疾患への関与の解明を目的とし、がんにおいて発現異常が認められているユビキチンリガーゼ群を対象に、ルシフェラーゼレポーターを用いた機能的スクリーニングを行った。その結果、Wnt シグナルを負に制御する因子として大腸がんで過剰発現が認められる膜型ユビキチンリガーゼ RNF43 を同定した。

### 2. 研究の目的

国内外を問わず、大腸がんはがんによる死亡原因の上位を占めている。我々は以前、大腸がん発現の亢進している分子として知られているユビキチンリガーゼ RNF43 が NEDL1 と結合し、p53 依存的転写を抑制することで細胞死を抑制していることを報告した [BBRC: 404: 143 (2011): 引用文献 1]。さらに最近、RNF43 が Wnt 受容体複合体のエンドサイトーシスに関与し、Wnt シグナルと腸管幹細胞の増殖の調節を行っていることが報告され注目され始めている。しかしその分子メカニズムには不明な点が多い。そこで本研究では、RNF43 による Wnt シグナルの調節機構と、大腸がんだけではなくその関与が示唆されている膵臓がん、胆管がんの発症にどのように関与しているかを分子レベルで解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) RNF43 結合分子の検討: RNF43 と Wnt シグナルエフェクター分子の結合様式の決定: RNF43 結合分子がそれぞれどのように結合しているか、変異体作製と免疫沈降法を組み合わせて決定した。

(2) RNF43 変異体の機能解析: 正常型と、欠失変異体・がん発現同定されたアミノ酸置換を導入した変異型の RNF43 の間で Wnt/ $\beta$ catenin 経路の活性を特異的に検出するレポーターアッセイにより、比較検討を行

った。また、noncanonical Wnt シグナルの活性制御における RNF43 の機能についても、ウェスタンブロット法を用いて検討した。

(3) Wnt 受容体の発現制御: RNF43 が Wnt 受容体である Fzd の発現をどのように制御しているか、免疫蛍光染色、フローサイトメトリーを用いて、発現レベル、細胞内局在変化の検討を行った。

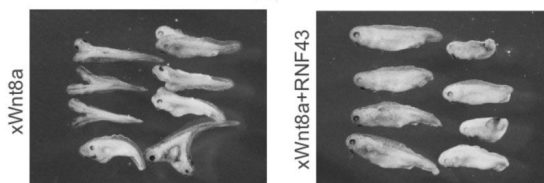
(4) フィードバック機構の検討: RNF43 が Wnt シグナルの標的遺伝子となり得るかを、リアルタイム RT-PCR を用いて検討した。

(5) RNF43 の動物個体レベルでの機能検討: 簡便に機能検討を行うことが可能な培養細胞レベルだけでなく、より生理学的な検討が可能である動物モデルを用いた機能検討も行った。動物モデルには、古典的手法でありこれまでに Wnt シグナル解析において膨大な蓄積のあるアフリカツメガエル胚モデルを採用し、Wnt/ $\beta$ catenin 経路だけでなく noncanonical Wnt シグナルについての検討も行った。

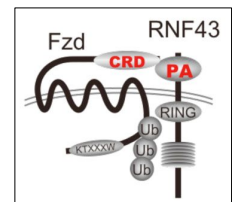
### 4. 研究成果

(1) RNF43 は Wnt シグナルを特異的に抑制する: Wnt シグナルをユビキチン化依存的に抑制する分子を同定するために、Wnt/ $\beta$ catenin 経路の活性を測定可能な STF293 細胞を用いて機能的スクリーニングを行った。その結果、Wnt シグナル抑制分子として RNF43 が同定された。RNF43 は Wnt/ $\beta$ catenin 経路を抑制するが、Notch や NF- $\kappa$ B 経路は抑制しないことを明らかにした。また、カエル胚モデルにおいても、xWnt8 による 2 次軸誘導を RNF43 が強力に抑制したことから、生理学的条件下でも RNF43 は Wnt/ $\beta$ catenin 経路を抑制する活性を持つことが確認された。

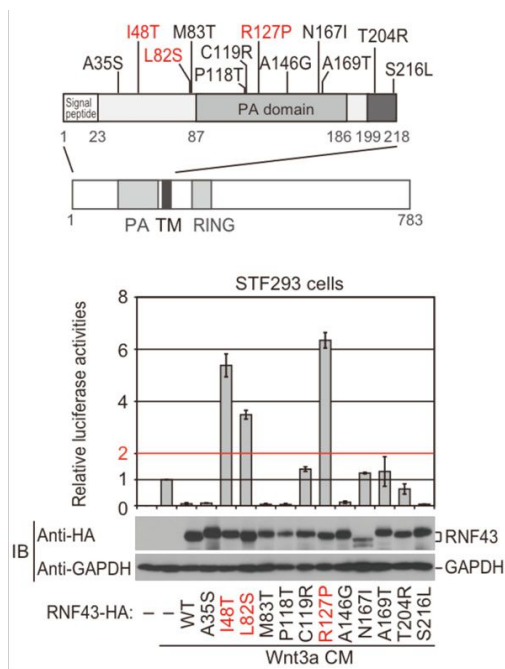
(2) RNF43 は細胞外で Wnt 受容体である Fzd を認識する: 様々な RNF43 欠失変異



体を用いた免疫沈降実験の結果、RNF43 は細胞外の protease-associated (PA) ドメインで Fzd と結合している事が明らかになった。また、Fzd の欠失変異体を用いた免疫沈降実験の結果により、Fzd の細胞外 cysteine-rich ドメイン (CRD) が RNF43 と結合すること、さらにこの結合が RNF43 の Fzd 発現量依存的な Wnt/ $\beta$ catenin 経路を抑制に必須である事を明らかにした。

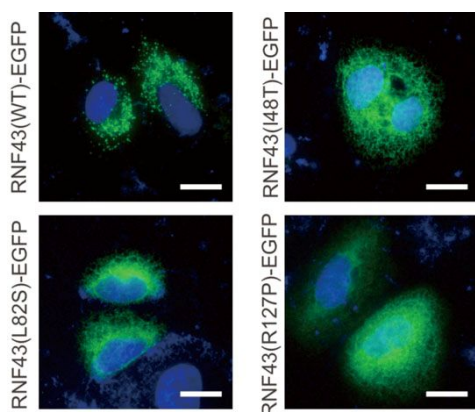


(3) がん変異型 RNF43 は Wnt/ $\beta$ catenin 経路を過剰活性化する： 大規模エクソーム解析によりがん患者から同定された RNF43 細胞外ドメインのミスセンス変異の一部は、RNF43 の機能を Fzd 量依存的な Wnt/ $\beta$ catenin 経路の抑制分子から活性化分子へ機能転換を引き起こすことがレポーターアッセイにより明らかになった。また、これらの変異が実際に生体内で Wnt/ $\beta$ catenin 経路の異常活性化に關与するか、カエルモデル



ル系を用いて生理学的に確認した。

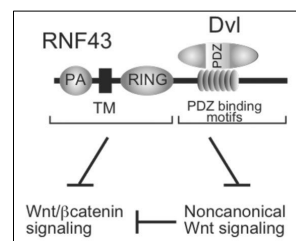
(4) がん変異型 RNF43 は細胞内局在異常を示す： レポーターアッセイとカエルモデルの両方で Fzd 依存的に Wnt/ $\beta$ catenin 経路を異常活性化する RNF43 ミスセンス変異体の細胞内局在を検討した。その結果、タンパク質として安定性の低い正常型 RNF43 は主にエンドソームに局在するのに対し、安定化



した変異型 RNF43 は小胞体に局在していることが明らかになった。この RNF43 の局在変化の結果、その標的タンパク質である Fzd を分解することが出来ずに Wnt/ $\beta$ catenin 経路を異常活性化することが示唆された。

(5) RNF43 は Dvl2 との結合を介して

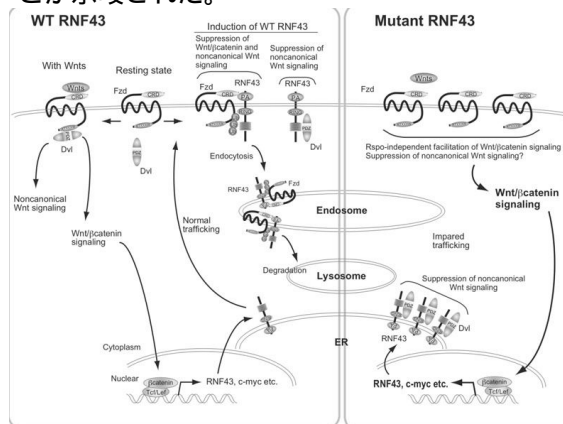
noncanonical Wnt シグナルを抑制する： 様々な RNF43 欠失変異体を用いた免疫沈降実験の結果、RNF43 は複数の PDZ 結合モチーフとヒスチジンリッチモチーフをからなる細胞内ドメインの一部で Dvl2 と結合している事が明らかになった。また、Dvl2 の欠失変異体を用いた免疫沈降実験の結果により、Dvl2 の PDZ ドメインが RNF43 と結合すること、さらにこの結合が RNF43 の Fzd 発現量非依存的な noncanonical Wnt 経路を抑制に必須である事を、カエルモデルを用いて生理学的に明らかにした。



(6) RNF43 は Wnt/ $\beta$ catenin 経路のフィードバック機構に關与する： RNF43 は Wnt/ $\beta$ catenin 経路の標的遺伝子である可能性を、リアルタイム RT-PCR にて検討を行った。その結果、Wnt/ $\beta$ catenin 経路を人為的に活性化させると RNF43 mRNA 量が上昇することから、RNF43 は Wnt/ $\beta$ catenin 経路の標的遺伝子であり、Wnt/ $\beta$ catenin 経路の負のフィードバック機構に關与することが示された。また、このような RNF43 によるフィードバック機構は非幹細胞において成立しているが、もともと RNF43 が高発現している幹細胞では、また別の制御機構が存在する事が示唆された。

(7) ここまでの結果により、RNF43 の Wnt シグナル調節に果たす役割と、その破綻によるがん化機構を明らかにしたので報告した [MCB: 35: 2007 (2015):引用文献 2]。

(8) RNF43 は翻訳後修飾により活性制御を受ける可能性がある： RNF43 が複数の翻訳後修飾を受けている可能性を見出したので、これらの翻訳後修飾が Wnt シグナル調節にどのような影響を与えるかを、レポーターアッセイにて検討した。その結果、RNF43 は細胞が置かれた状況により翻訳後修飾を受けること、これらの修飾は RNF43 を介した Wnt シグナル活性調節に影響を与えることが示唆された。



これらの結果は、平成 28-30 年度の研究課題 (RNF43 による恒常性の維持とその破綻によるがん化メカニズムの解明) にて、詳細な解析を行う予定である。

<引用文献>

1. Shinada K, Tsukiyama T, Sho T, Okumura F, Asaka M, Hatakeyama S: RNF43 interacts with NEDL1 and regulates p53-mediated transcription. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 404, 143–147 (2011)
2. Tsukiyama T, Fukui A, Terai S, Fujioka Y, Shinada K, Takahashi H, Yamaguchi TP, Ohba Y, and Hatakeyama S: Molecular role of RNF43 in canonical and noncanonical Wnt signaling. *Mol Cell Biol* 35:2007-2023 (2015)

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 3件)

1. The inflammatory cytokine IL-18 is involved in bladder remodeling after bladder outlet obstruction in mice. Kanno Y, Mitsui T, Kitta T, Moriya K, Tsukiyama T, Hatakeyama S, Nonomura K. *Neurourology and urodynamics*, Volume: 35, Pages : 377–381 (2016) (査読有) DOI: 10.1002/nau.22721
2. Molecular role of RNF43 in canonical and noncanonical Wnt signaling. Tsukiyama T, Fukui A, Terai S, Fujioka Y, Shinada K, Takahashi H, Yamaguchi TP, Ohba Y, Hatakeyama S. *Molecular and Cellular Biology*, Volume: 35 Issue: 11, Pages: 2007-2023 (2015) (査読有) DOI: 10.1128/MCB.00159-15
3. MED26 regulates the transcription of snRNA genes through the recruitment of little elongation complex. Takahashi H, Takigawa I, Watanabe M, Anwar D, Shibata M, Tomomori-Sato C, Sato S, Ranjan A, Seidel CW, Tsukiyama T, Mizushima W, Hayashi M, Ohkawa Y, Conaway JW, Conaway RC, Hatakeyama S. *Nature Communications*, Volume: 6, 5941 (2015) (査読有) DOI:

10.1038/ncomms6941

[学会発表](計 9件)

1. カエルモデルを用いた RNF43 のリン酸化による Wnt シグナル調節機構の解明, 築山忠維, 福井彰雅, 寺井小百合, 藤岡容一郎, 品田恵佐, 高橋秀尚, Terry P. Yamaguchi, 大場雄介, 畠山鎮次, 平成 27 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ「琵琶湖ホテル(滋賀県・大津市)」, 2016 年 2 月 4 日
2. カエルモデルを用いた RNF43 の Wnt シグナル調節と発がんにおける機能検討, 築山忠維, 畠山鎮次, 第 74 回日本癌学会学術総会 2015 年 10 月 8 日「名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)」
3. カエルモデルから明らかになった Wnt シグナル調節とがんにおける RNF43 の機能, 築山忠維, 福井彰雅, 寺井小百合, 藤岡容一郎, 品田恵佐, 高橋秀尚, Terry P. Yamaguchi, 大場雄介, 畠山鎮次, 日本生化学会北海道支部 第 52 回支部例会 2015 年 7 月 17 日「北海道大学(北海道・札幌市)」
4. Missense mutations of RNF43 establish a positive feedback loop of Wnt/bcatenin signaling, Tadasuke Tsukiyama, Akimasa Fukui, Sayuri Terai, Yoichiro Fujioka, Keisuke Shinada, Hidehisa Takahashi, Terry P. Yamaguchi, Yusuke Ohba, and Shigetsugu Hatakeyama, 2015「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ 2015 年 2 月 5 日「琵琶湖ホテル(滋賀県・大津市)」
5. RNF43 遺伝子のミスセンス変異による Wnt/bcatenin 経路のポジティブフィードバックループ形成, 築山忠維, 福井彰雅, 寺井小百合, 藤岡容一郎, 品田恵佐, Terry P. Yamaguchi, 大場雄介, 畠山鎮次, 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 27 日「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」
6. RNF43 のミスセンス変異は Wnt/bcatenin シグナルの正のフィードバックループを形成する, 築山忠維, 畠山鎮次, 第 73 回日本癌学会年会 2014 年 9 月 27 日「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」
7. RNF43 遺伝子のミスセンス変異による Wnt/bcatenin 経路のポジティブフィードバックループ形成, 築山忠維, 福井彰雅, 寺井小百合, 藤岡容一郎, 品田恵佐, 大場雄介, 畠山鎮次, 日本生化学会

学会北海道支部 第 51 回支部例会  
2014 年 7 月 18 日「北海道大学(北海道・札幌市)」

8. RNF43 遺伝子変異によるがん抑制遺伝子からがん遺伝子への機能転換, 築山忠維、福井彰雅、寺井小百合、藤岡容一郎、品田恵佐、Terry P. Yamaguchi、大場雄介、畠山鎮次, 第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3 日「神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)」
9. がん抑制遺伝子 RNF43 は異なるメカニズムによって Wnt/beta-catenin 経路と noncanonical Wnt 経路を抑制する, 築山忠維、畠山鎮次, 第 72 回日本癌学会学術総会 2013 年 10 月 4 日「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hucc.hokudai.ac.jp/~d20505/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

築山 忠維 (Tsukiyama Tadasuke)  
北海道大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 20399819

### (2)研究分担者

該当無し ( )

研究者番号:

### (3)連携研究者

畠山 鎮次 (Hatakeyama Shigetsugu)  
北海道大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号: 70294973

高橋 秀尚 (Takahashi Hidehisa)  
北海道大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号: 30423544