

令和 2 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07105

研究課題名（和文）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

研究課題名（英文）The function of RNF43 in tumorigenesis and maintaining homeostasis

研究代表者

築山 忠維 (Tsukiyama, Tadasuke)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：20399819

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：RNF43はCK1によって多段階にリン酸化を受ける。その結果RNF43のコピキチン化酵素としての活性はリン酸化によって制御され、このリン酸化サイトに遺伝子変異が起こるとWntシグナルの異常活性化が起こることを明らかにした。一方でp53の抑制はリン酸化による影響を受けなかったため、がんにおける変異RNF43の過剰発現はWntシグナルの異常活性化とp53の不活性化を同時に行うことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではRNF43によるWntシグナルとp53シグナルの調節機構が恒常性維持にどのような役割を果たしているか検討した。さらにその調節メカニズムの破綻によりどのように発がんに関与しているかを明らかにした。その結果、発がんに必要なとされる3つのステップの中で2つが単一の遺伝子変異によって同時に達成されてしまう可能性を示唆した。この結果はこれまでのがん研究を更に発展させる新たな概念を創出したと考えられる。また今後のがん治療研究への応用においても大きな意義を持つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We show in this research that;

1, CK1 phosphorylates RNF43 on multiple serines. 2, Phosphorylation activates ubiquitinating function of RNF43. 3, Mutation of RNF43 in these serines induces the excess of Wnt signaling. 4, Such mutations do not change the function of RNF43 in suppression of p53-dependent cellular reactions.

These results suggest that mutations in serine on RNF43 act concurrently in the first step: Wnt activation and in the 3rd step: p53 inactivation. Furthermore, we propose a new model of tumorigenesis: two mutations, in RNF43 and Ras, is sufficient for the onset of tumor.

研究分野：発がん

キーワード：多段階発がん Wnt p53 RNF43 Ras

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Wnt/ β 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、特に家族性大腸がんにおいて β 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ことが、Wnt シグナルの調節機構と発がんメカニズムの解明に大きな役割を果たした。その後も β -catenin の分解にユビキチンリガーゼの SCF^{FBXCP} が関与するだけでなく、Dvl, Axin、APC、TCF/Lef といった Wnt シグナルのエフェクター分子の大半の分子も、それぞれが複数のユビキチンリガーゼによって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 β -catenin のみならず、シグナル経路全体を複雑かつ厳密に制御していることが明らかになってきた。我々はこれらの背景に基づいて、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 受容体である Fzd を分解することでシグナルを抑制する機能を持つユビキチンリガーゼとして、RNF43 を同定した。さらに我々は、がんでしばしば同定される RNF43 のアミノ酸が置換されるような遺伝子変異が RNF43 の機能を失わせるだけでなくドミナントネガティブ変異体として機能が変化した結果 Wnt シグナルを逆に活性化すること、活性化した Wnt シグナルによりさらに変異 RNF43 の発現が促進されること、つまり通常は負のフィードバックループを形成し Wnt シグナルを抑制すべき RNF43 が、変異を持つことにより正のフィードバックによる Wnt シグナルの暴走へと転換されることが発がんに大きな役割を果たしていることを明らかにしてきた[MCB: 35: 2007 (2015):引用文献 1]。しかし、RNF43 の機能についての分子モデルにはまだ整合性が取れていない部分も多く、そのため現在も世界中で活発に研究が行われている。

2. 研究の目的

大腸がんは日本国内だけでなく世界でも広くがんによる死亡原因の上位を占めている。我々は以前、大腸がんで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 p53 依存的転写を抑制することで細胞死を抑制することを報告した[BBCR: 404: 143 (2011):引用文献 2]。さらにその後の研究で RNF43 が Wnt 受容体複合体の分解に関与し、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明らかとなってきた。またその遺伝子変異の発がんへの関与も活発に研究されている。そのような世界的な研究動向の中で、最近我々は RNF43 の酵素活性が細胞内ドメインのリン酸化によって調節されている可能性を見出した。そこで本研究では、RNF43 のリン酸化による Wnt シグナルの調節機構が正常組織においてどのように腸管の恒常性維持に関与しているか、また発がんステップ全体の進行にこの RNF43 リン酸化制御の破綻が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 の活性を規定する部位の決定: RNF43 タンパク質のどの部位がそのユビキチン化活性に関与しているかを検討するため、まずさまざまな部位を欠く欠失変異体を作製した。RNF43 の欠失変異体が Wnt シグナルに与える影響については、Wnt レポーター細胞である STF293 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイにより検討した。さらに欠失変異体によって絞り込んだ部位に存在するセリンに対してリン酸化変異を模倣したアミノ酸置換を行った変異体を作製し、同様にレポーターアッセイによる活性調節部位の確認を行った。

(2) RNF43 の活性を規定するリン酸化メカニズムの解明: 上記のアミノ酸置換を行ったセリンがどのような酵素によりリン酸化されるのか、*in vitro* キナーゼアッセイにより検討を行った。更に細胞内で実際にリン酸化が起こっているかを、正リン酸ラベルを用いて検討を行った。また、内因性の RNF43 が細胞内で実際にリン酸化を受けているかを、リン酸化されるアミノ酸にゲノム編集で変異を導入した細胞を用いての検討も行った。

(3) RNF43 リン酸化のゼブラフィッシュの体軸形成におよぼす影響: RNF43 のリン酸化部位をアミノ酸置換した変異体を Wnt レポーターゼブラフィッシュで発現させ、ゼブラフィッシュ胚における Wnt 標的遺伝子に対する *in situ* ハイブリダイゼーションとリアルタイム PCR を用いて Wnt シグナルの活性変化を検討した。また RNF43 変異体の non-canonical Wnt シグナルへの影響を、体軸伸長の表現型を指標に検討した。

(4) RNF43 リン酸化が腸管の恒常性維持に及ぼす影響: リン酸化部位をアミノ酸置換した変異体を発現するため RNF43 のウイルスベクターを腸管オルガノイドに導入し、短期でのオルガノイド発達と長期にわたる腸管幹細胞の維持の両面について、さまざまな培養条件のもとで検討を行った。

(5) RNF43 リン酸化が発がんにおよぼす影響: RNF43 のリン酸化変異体を恒常的に発現する NIH3T3 非がん細胞を作製し、その足場非依存性増殖能とスフィア形成能を検討した。この細胞に更に活性型 Ras を導入した細胞を作製しヌードマウス皮下に移植することで、RNF43 のリン酸化の発がんへの影響を検討した。

(6) RNF43 リン酸化が p53 の機能に及ぼす影響: RNF43 のリン酸化変異体を恒常的に発現する

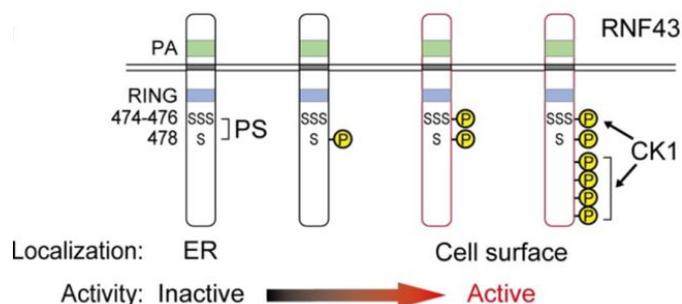
HCT-116 大腸がん細胞を作製し、定常状態と DNA ダメージを与えた状態で p53 の下流標的遺伝子の発現が影響を受けるか転写レベルとタンパク質レベルの双方で確認した。

(7) RNF43 リン酸化状態の変化が発がんやがん治療に及ぼす影響 : RNF43 リン酸化状態を人為的に変化させることで、発がんを加速させたり抑制することが可能かを、RNF43 のリン酸化変異体を恒常的に発現する NIH3T3 細胞を ノードマウス皮下に移植することにより検討した。

4 . 研究成果

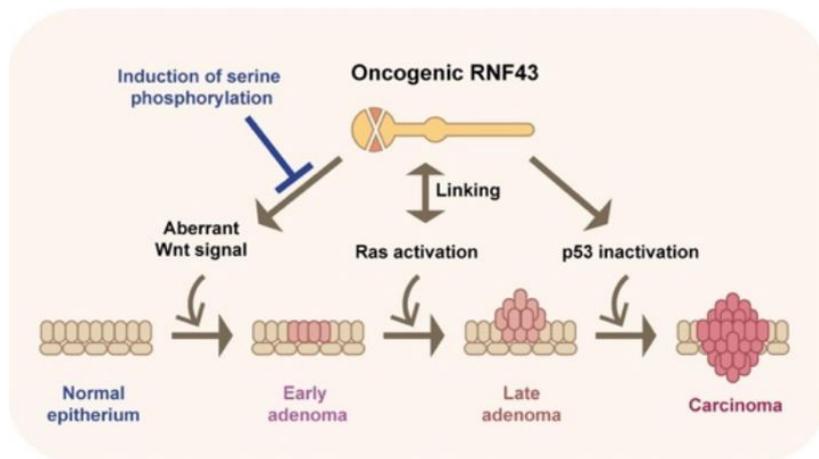
(1) RNF43 は複数のセリンがリン酸化されることにより活性が制御されている : 複数の RNF43 欠失変異体を用いた Wnt レポーターアッセイを行った結果、474-478 番目に存在する 4 つのセリン残基が RNF43 の Fzd 分解を介した Wnt シグナルの抑制に必須であることを確認した。また正リン酸ラベルによって、内在性の RNF43 においてこれらのセリンが実際にリン酸化されていることも証明した。

(2) RNF43 は CK1 によってリン酸化され活性化する : RNF43 の各種変異体を用いて細胞表面の Fzd 発現量をフローサイトメーターで測定したところ、リン酸化を受けるセリンを保持する RNF43 のみが Fzd の発現量を低下させること、さらに CK1 の阻害剤が Fzd の発現量低下をキャンセル出来ることが明らかになった。これらの結果より、RNF43 は多段階的なリン酸化の中で CK1 により活性化されることを示した。



(3) RNF43 のリン酸化はゼブラフィッシュで Wnt シグナル調節をおこなっている : RNF43 のリン酸化変異体をゼブラフィッシュ胚に発現させた結果、リン酸化依存的に Wnt シグナル標的遺伝子の発現変化が観察された。さらに発生が進んだ体軸伸長期には野生型で観察された体軸伸長の阻害がリン酸化欠損変異体では起こらないことも明らかとなった。これらの結果、RNF43 のリン酸化は canonical と non-canonical 両方の Wnt シグナル調節に関与していることを明らかにした。

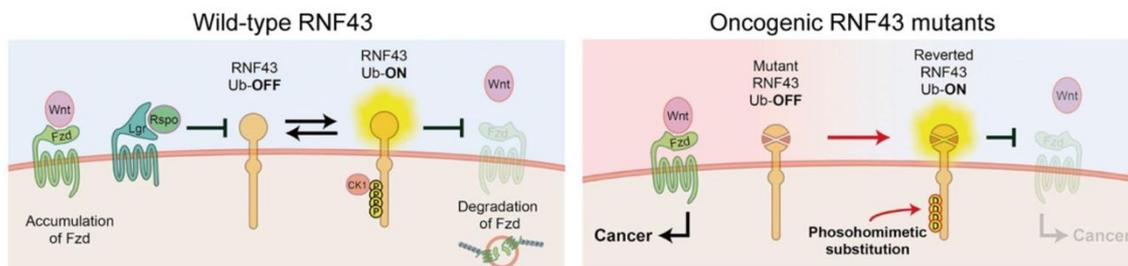
(4) RNF43 リン酸化は腸管幹細胞の維持や分化増殖を調節している : RNF43 のリン酸化模倣、非リン酸化模倣変異体の発現を腸管オルガノイドモデルに導入した結果、恒常的なリン酸化を模倣した変異体では、短期的な腸管陰窩の発達も長期的な幹細胞維持も阻害されることが明らかとなった。これらの結果より、RNF43 のリン酸化状態が解除されることによって得られる Wnt シグナルの活性が腸管の恒常性に重要であることが示唆された。



(5) RNF43 リン酸化調節が破綻すると、Ras 変異と強調して発がんを誘導する : 非がん細胞である NIH3T3 細胞に Wnt シグナルを上昇させる RNF43 のリン酸化変異体を単独で発現させても、足場非依存的増殖やスフィア形成などは起こらず、またノードマウス皮下に移植しても腫瘍の形成は起こらなかった。しかしこの変異 RNF43 を導入した NIH3T3 細胞に更に活性型 Ras を導入すると、足場非依存的増殖やスフィア形成が可能となり皮下に腫瘍も形成された。これらの結果から、RNF43 のリン酸化による活性制御は Ras と協調して発がんをコントロールしていることが示唆された。

(6) リン酸化状態に関係なく、RNF43 は p53 下流を抑制する : RNF43 が p53 の転写活性を抑制することを報告したが、リン酸化がこの抑制機能に影響を与えるか検討した。その結果、正常型だけでなくリン酸化依存的に Wnt 活性に影響を与える全ての RNF43 も同様に p53 下流の p21 や Bax の発現を抑制したことから、RNF43 のリン酸化による活性制御は Wnt シグナルと p53 シグナルにおいては別の分子メカニズムで機能していることが示唆された。

(7) RNF43 のリン酸化を人為的に回復させると発がんが抑制できる： RNF43 の細胞外ドメインに遺伝子変異が起こりその機能が失われると、活性型 Ras 変異と協調して多段階発がんステップを達成することを示した。さらにこのがんを引き起こす変異 RNF43 に強制的にリン酸化を起こした状態を作ったところ、その発がん能力は失われた。この結果は人為的に RNF43 のリン酸化状態をコントロールすることでがん治療への応用の可能を示した。



(8) これらの結果は国際総合誌に投稿中であり、現在 4 回目の修正投稿中である。

< 引用参考文献 >

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

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Watanabe M, Natsuga K, Nishie W, Kobayashi Y, Donati G, Suzuk Si, Fujimura Y, Tsukiyama T, Ujiie H, Shinkuma S, Nakamura H, Murakami M, Ozaki M, Nagayama M, Watt F and Shimizu H	4. 巻 6:e26635
2. 論文標題 Type XVII collagen coordinates proliferation in the interfollicular epidermis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 1-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.26635	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 築山忠維	4. 巻 52
2. 論文標題 ユビキチン化酵素RNF43によるWntシグナル制御とその破綻による発がん	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本応用酵素協会誌	6. 最初と最後の頁 27-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takahashi H, Ranjan A, Chen S, Suzuki H, Shibata M, Hirose T, Hirose H, Sasaki K, Abe R, Chen K, He Y, Zhang Y, Takigawa I, Tsukiyama T, Watanabe M, Fujii S, Iida M, Yamamoto J, Yamaguchi Y, Suzuki Y, Matsumoto M, Nakayama KI, Washburn P, Saraf A, Florens L, Sato S, Tomomori-Sato C, Conaway RC, Conaway JW, Hatakeyama S	4. 巻 11
2. 論文標題 The role of Mediator and Little Elongation Complex in transcription termination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1063-1063
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/S41467-020-14849-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 築山忠維、石谷太、畠山鎮次
2. 発表標題 幹細胞特異的ユビキチンリガーゼRNF43の遺伝子変異による多段階発がんステップの起動と完成
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 築山忠維、篠裕輝、寺井小百合、高橋秀尚、Bon-Kyoung Koo、石谷太、畠山鎮次
2. 発表標題 RNF43の遺伝子変異は多段階発がんステップにおいてWntとp53経路の変異を代償する
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 築山忠維
2. 発表標題 Wnt受容体のユピキチン化とその破綻によるがん化
3. 学会等名 Wnt研究会2018-2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 築山忠維、寺井小百合、高橋秀尚、石谷太、Bon-Kyoung Koo、畠山鎮次
2. 発表標題 幹細胞特異的ユピキチンリガーゼRNF43のリン酸化によるWntシグナル調節は個体発生・恒常性維持・発がん過程に關与する
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 築山忠維、石谷太、畠山鎮次
2. 発表標題 発がん型変異RNF43はリン酸化により正常ながん抑制因子へ機能回復する
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 築山忠維、増田隆昌、Jihoon Kim、Alessandra Merenda、松本雅記、寺井小百合、篠裕輝、高橋秀尚、石谷太、中山敬一、Bon-Kyoung Koo、畠山鎮次
2. 発表標題 -伝統的 vs 包括的- RNF43のリン酸化異常による発がんメカニズムの解明で明らかになったがん研究手法の利点と欠点
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 築山忠維、石谷太、畠山鎮次
2. 発表標題 RNF43によるWntシグナルの活性制御は形態形成と発がんを制御する
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 築山忠維、Jihoon Kim、増田隆昌、寺井小百合、高橋秀尚、石谷太、Bon-Kyoung Koo、畠山鎮次
2. 発表標題 様々な動物モデルを用いたWntシグナル調節異常による発がん機構の解析
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 築山忠維
2. 発表標題 RNF43のリン酸化によるWntシグナルの活性制御は個体の恒常性を制御する
3. 学会等名 Wnt研究会2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tadasuke TSUKIYAMA
2. 発表標題 Post-translational modification of RNF43; a molecular switch of Wnt signaling
3. 学会等名 Wnt meeting 2016 (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 築山忠維、石谷太、畠山鎮次
2. 発表標題 RNF43の翻訳後修飾はWntシグナル調節のスイッチとして機能する
3. 学会等名 第75回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 築山忠維、石谷太、畠山鎮次
2. 発表標題 Wntシグナルの分子スイッチ；RNF43のリン酸化による活性制御
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 築山忠維
2. 発表標題 Wntシグナル；：私たちのからだを作る・支えるユートイリティープレイヤー
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北海道大学大学院・医学研究院 生化学分野・医化学教室
<https://hokudai-ikagaku.jp>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----