

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17013021

研究課題名（和文） 蛋白質リン酸化反応による細胞増殖の制御と細胞癌化

研究課題名（英文） Regulatory roles of protein phosphorylation in cell growth and malignant transformation

研究代表者

山本 雅 (YAMAMOTO TADASHI)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：40134621

研究成果の概要(和文):様々なヒト癌の発症進展に受容体型チロシンキナーゼが関わっている。我々は受容体型チロシンキナーゼ下流のシグナル分子として見出した Tob が、細胞内でリン酸化あるいはユビキチン化されて、細胞増殖や細胞死を巧妙に制御していることを遺伝子改変マウスの解析などを通して明らかにした。さらに Tob と会合する蛋白質が、キナーゼ活性を持つこと、また mRNA の分解・合成に関わることで、細胞増殖や細胞運動そして細胞内エネルギー代謝を制御することを示した。

研究成果の概要(英文): Receptor-tyrosine kinases play critical roles in cancer development. We identified Tob as a signaling molecule downstream of the receptor-tyrosine kinases. Through molecular and cellular biological analysis and the analysis of gene-engineered mice, we provided evidence that Tob is involved in regulation of cell proliferation, cell death, and energy metabolism by interacting with other cellular proteins such as Ndr family kinases and a large protein complex that regulates messenger RNA turn over.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	29,500,000	0	29,500,000
2006 年度	29,500,000	0	29,500,000
2007 年度	29,500,000	0	29,500,000
2008 年度	29,500,000	0	29,500,000
2009 年度	29,500,000	0	29,500,000
総計	147,500,000	0	147,500,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：

キーワード：癌、シグナル伝達、蛋白質、遺伝子、発現制御

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

本研究開始時において癌研究の分野では、EGF受容体などの受容体型チロシンキナーゼが変異や過剰発現によりヒト癌の発症進展に関わることが明らかになっており、受容体キナーゼに対する抗体や活性阻害化合物によるがん治療の努力が多く、研究者によりなされていた。既存の知識に基づいて高度に効果のある治療薬を開発することは大変重要である。一方で受容体型チロシンキナーゼの下流シグナルをより *extensive* に解析し、新たなシグナル経路を見出して新たな分子標的を浮かび上がらせるという研究手法も極めて重要である。私共は、後者の考え方に立ち、乳がん等ヒト癌の悪性化を導く ErbB ファミリー蛋白質下流シグナルを種々の方法で探索し、この当時 ErbB2 受容体下流で機能する蛋白質として Tob を見出していた。当特定研究課題に先行する科研費ですでに Tob ががん抑制蛋白質として機能することを見出し、また Tob ファミリー蛋白質として Tob2 や ANA などを見出していた。

2. 研究の目的

リン酸化による Tob ファミリー蛋白質の機能制御の視点から、Tob ファミリー蛋白質の細胞増殖抑制作用の分子機構を確立する。また、Tob ファミリー会合蛋白質について、それら遺伝子の発現とヒト癌発症の因果関係を明らかにしていく。具体的には Tob や Tob ファミリー欠損マウスを用いた発がん研究をすすめ、また Tob 会合蛋白質 Ndr1/2 キナーゼや CCR4-NOT デアデニレース複合体の細胞増殖制御における役割を明らかにし、がん治療薬開発の基盤的情報を得る。

3. 研究の方法

①Tob ファミリー、②CCR4-NOT 複合体構成成分、③Ndr キナーゼについて、細胞レベルで

の会合実験、細胞内局在解析、細胞内機能解析を分子細胞生物学的の様々な手法を用いて進める。特に Tob については、他のファミリーメンバーが DNA 損傷依存的に発現変化することが報告されていることから、DNA 損傷時の Tob の機能と動態変化を調べる。まず解析対象となる個々の蛋白質に対する高質の抗体を作成する。さらに、RNAi 法を採用し遺伝子発現抑制による細胞増殖、増殖抑制への影響を調べる。また遺伝子欠損マウスを作成し、病理学的解析を行う。Ndr キナーゼ標的の蛋白質については、蛋白質固相リン酸化法による遺伝子ライブラリースクリーニングや、蛍光 2 次元電気泳動そして質量分析 (MALDI-TOFMS) により探索する。また、*ndr* 欠損マウスを作成しその病理学的解析を進める。更に、Tob ファミリーや CCR4-NOT 複合体の作用機構を確立するために、各蛋白質の高次構造を X 線結晶構造解析や NMR 法で決める。

4. 研究成果

(1) Tob ファミリー

Tob ファミリータンパク質 ANA が肺胞細胞で特異的に発現していることや *ana* の発現が肺腺癌で低下していることを見出した。さらに *ana* 欠損マウスが肺腺癌を発症することを見出し *ana* ががん抑制遺伝子として機能しうることを見出した。*ana* 欠損により TGFβ ファミリーのシグナル伝達が乱されることを、ANA と Smad ファミリー蛋白質との会合から推定した。また、別のファミリータンパク質 *tob2* を欠損するマウス骨形成不全となること、そして Tob2 が破骨細胞で vitamin D3 受容体と会合し、RANKL 発現抑制を通して骨芽細胞の産生を負に制御することを示した。ついで、細胞に低線量の UV を照射した場合は Tob の発現が誘導され、高線量の UV

では Tob が分解し、それに伴い細胞死が誘導されることを見出した。この Tob の分解にはユビキチン化依存的 proteasome が関わることを見出した。さらに遺伝子破壊や RNAi 法で Tob の発現を低下させておくことにより、低線量の UV 刺激でも細胞死が誘導されることを示した。また高線量による野生型細胞でのアポトーシスが Tob 過剰発現で抑制されることを見出した。また、Tob は UV 刺激のみならず抗癌剤などによる DNA 損傷に依存的な細胞死にも抑制的であり、RNAi により Tob 発現量を低下させることで抗癌剤の効果を高めることが期待される。

(2) CCR4-NOT 複合体

個々のサブユニット (Cnot1-3, Cnot6, 6L, 7-10) それぞれについて RNAi 法や欠損マウス作成による解析を進めた。顕著な成果として Cnot3 と Cnot6L の例を示す。まず Cnot6L サブユニットが deadenylase 活性を持つことを示した。さらに RNAi 法により Cnot6L の発現を抑制することで、NIH3T3 細胞の増殖 (G_0/G_1 期進行) が著しく阻害されることを見出した。この抑制効果は Cnot6L の deadenylase 活性に依存し、Cnot6L 発現抑制細胞では $p27^{kip}$ mRNA の分解が抑制されており、結果として細胞周期制御蛋白質 $p27^{kip}$ の発現が上昇していた。Cnot6L は $p27^{kip1}$ mRNA の 3'UTR 配列を認識してその分解制御に関わることを示した。次いで *cnot3* 欠損マウスが胚性致死であることを示した。更に *cnot3* ヘテロ欠損 (*cnot3*^{+/-})マウスは基礎エネルギー代謝が昂進し瘠せ形質を示すことを見出した。野生型マウスと *cnot3*^{+/-}マウスの肝臓 mRNA を用いたマイクロアレイ解析から、*cnot3*^{+/-}マウスでは PDK4 (pyruvate dehydrogenase complex kinase 4) mRNA や IGFBP1 (insulin-like growth factor binding protein 1) mRNA の poly(A)が効率よく分解されず、mRNA が安定化していることを

明らかにした。その結果エネルギー代謝や脂肪細胞分化に関わる PDK4 や IGFBP1 の発現が亢進し、瘠せ形質を示していると推定した。また、Tob ファミリー蛋白質 (Tob, Btg2) と CNOT7 の結晶構造解析を進め、それら蛋白質間の構造と機能の相関を調べた。その結果 Tob と Btg2 が CNOT7 と直接会合しその会合が CNOT7 の deadenylase 活性に抑制的であることを示した。この知見は、Tob が mRNA の分解系制御に関わって、細胞増殖やエネルギー代謝などの様々な生命現象を調節していることを指摘している。言い換えれば、Tob やその会合分子が、がんのみならず肥満などのメタボリックシンドロームを制御する医薬品の開発の標的となりうることを示唆するものである。

(3) Ndr

Ndr2 欠損 (Ndr2^{-/-}) マウスでは顕著な病理学的異常が見られず、詳細な解剖学的解析と長期観察が必要となっている。ただ、Ndr2^{-/-}マウス由来線維芽細胞は wound-healing 能が低下していることが示された。これは Ndr1/2 キナーゼが、アクチン骨格系の制御に関わる Caldesmon を標的とするという本研究で得られた知見と矛盾しない。また Ndr 欠損細胞では細胞増殖抑制性蛋白質 $p27^{kip}$ の発現減少が見られ、同時に G_0/G_1 期進行が促進されていた。*ndr* ファミリーがハエではがん抑制遺伝子として機能しているという知見に合うものである。ただヒトやマウスで *ndr* ががん抑制遺伝子として機能するという知見は得られていない。今後さらにがん進展との関連を探る必要がある。

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 43 件)

① Oshimori N, Li X, Ohsugi M, Yamamoto T. Cep72 regulates

- localization of key centrosomal proteins and proper bipolar spindle formation. *EMBO J* 28: 2066-2076, 2009、査読有
- ② Kawa S, Matsushita H, Ohbayashi H, Semba K, and Yamamoto T. A novel mouse monoclonal antibody targeting ErbB2 suppresses breast cancer growth. *Biochem Biophys Res Commun*, 384: 329-333, 2009、査読有
- ③ Miyai K, Yoneda M, Hasegawa U, Toida S, Izu Y, Hiroaki H, Hayata T, Ezura Y, Mizutani S, Miyazono K, Akiyoshi K, Yamamoto T, Noda M, ANA deficiency enhances BMP-induced ectopic bone formation via transcriptional events. *J Biol Chem* 284: 10593-10600, 2009、査読有
- ④ Yoneda M, Suzuki T, Nakamura T, Ajima R, Yoshida Y, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y, Shibutani M, Mitsumori K, Yokota J and Yamamoto T. Deficiency of antiproliferative family protein Ana correlates with development of lung adenocarcinoma. *Cancer Sci* 100: 225-232, 2009、査読有
- ⑤ Horiuchi M, Takeuchi K, Noda N, Muroya N, Suzuki T, Nakamura T, Kawamura-Tsuzuku J, Takahashi T, Yamamoto T and Inagaki F, Structural basis for the antiproliferative activity of the Tob-hCaf1 complex. *J Biol Chem* 284:13244-13255, 2009、査読有
- ⑥ Suzuki T, Tsuzuku J, Kawakami K, Miyasaka T and Yamamoto T. Proteasome-mediated degradation of Tob is pivotal for triggering UV-induced apoptosis. *Oncogene* 28:401-11.2009、査読有
- ⑦ Yang X, Morita M, Wang H, Suzuki T, Yang W, Luo Y, Zhao C, Bartlam M, Yamamoto T and Rao Z. Crystal structures of human BTG2 and mouse TIS21 involved in suppression of CAF1 deadenylase activity. *Nucl Acids Res* ;36(21):6872-81, 2008、査読有
- ⑧ Ajima R, Akiyama T, Usui M, Yoneda M, Yoshida Y, Nakamura T, Minowa O, Noda M, Tanaka S, Noda T, and Yamamoto T. Osteoporotic bone formation in mice lacking tob2; involvement of Tob2 in RANK ligand expression and osteoclasts differentiation. *FEBS Lett* 582:1313-1318, 2008、査読有
- ⑨ Ohsugi M, Adachi K, Horai R, Kakuta S, Sudo K, Kotaki H, Tokai-Nishizumi N, Sagara H, Iwakura Y, and Yamamoto T. Kid-mediated chromosome compaction ensures proper nuclear envelop formation. *Cell* 132: 771-782, 2008、査読有
- ⑩ Haraguchi K, Ohsugi M, AbeY, Semba K, Akiyama T, and Yamamoto T. Ajuba negatively regulates the Wnt signaling pathway by promoting GSK-3b-mediated phosphorylation of b-catenin. *Oncogene* 27: 274-284. 2008、査読有
- ⑪ Miyasaka T, Morita M, Ito K, Suzuki T, Fukuda H, Takeda S, Inoue J, Semba K and Yamamoto T. Interaction of anti-proliferative protein Tob with the CCR4-NOT deadenylase complex. *Cancer Science* 99: 755-761, 2008、査読有
- ⑫ Washio-Oikawa K, Nakamura T, Usui M, Yoneda M, Ezura Y, Ishikawa I, Kazuhisa N, Noda T, Yamamoto T, and Noda M. Cnot7 null mice exhibit high bone mass phenotype and modulation of BMP action. *J. Bone Miner Res* 22: 1217-23, 2007、査読有
- ⑬ Bai C, Ohsugi M, Abe Y, Yamamoto T. ZRP-1 controls Rho GTPase-mediated actin reorganization by localizing at cell-matrix and cell-cell adhesions. *J. Cell Sci.* 120: 2828-2837, 2007、査読有
- ⑭ Morita M, Suzuki T, Nakamura T, Yokoyama K, Miyasaka T, & Yamamoto T, Depletion of mammalian CCR4b deadenylasetriggered increment of the p27Kip1 mRNA level and impaired cell growth. *Mol. Cell. Biol.* 27: 4980-4990, 2007、査読有
- ⑮ Chikamori, M., Fujimoto, J., Tokai-Nishizumi, N., and Yamamoto, T. Identification of multiple SNT-binding sites on NPM-ALK oncoprotein and their involvement in cell transformation. *Oncogene* 26: 2950-2954, 2007、査読有
- ⑯ Kawa, S., Ito, C., Toyama, Y., Maekawa, M., Tezuka, T., Nakamura, T., Nakazawa, T., Yokoyama, K., Yoshida, N., Toshimori, K., and Yamamoto, T. Zoospermia in mice with targeted disruption of the Brek/Lmtk2 (brain-enriched kinase/ lemur tyrosine kinase 2) gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 19344-19349, 2006、査読有
- ⑰ Hiramatsu Y, Kitagawa K, Suzuki T, Uchida C, Hattori T, Kikuchi H, Oda T, Hatakeyama S, Nakayama K I. ,

- Yamamoto T, Konno H and Kitagawa M. Degradation of Tob1 mediated by SCFSkp2-dependent ubiquitination. *Cancer Research* 66: 8477-8483, 2006、査読有
- ⑱ Oshimori N, Ohsugi M and Yamamoto T. The Plk1 target Kizuna stabilizes mitotic centrosomes to ensure spindle bipolarity. *Nature Cell Biol.* 8: 1095-1101, 2006、査読有
- ⑲ Liu H, Nakazawa T, Tezuka T and Yamamoto T. Physical and functional interaction of FYN tyrosine kinase with a brain-enriched Rho GTPase-activating protein TCGAP. *J. Biol. Chem.* 281: 23611-23619, 2006、査読有
- ⑳ Washio-Okikawa K, Nakamura T, Usui M, Yoneda M, Ezura Y, Ishikawa I, Nakashima K, Yamamoto T and Noda M. Expression Analysis of LacZ gene placed in the locus of Cnot7 exhibits its activity in osteoblasts in vivo and in mineralized nodules in vitro. *J. Cell Biochem.* 99: 538-544, 2006、査読有
- 21 Abe Y, Ohsugi M, Haraguchi K, Fujimoto J, and Yamamoto T. LATS2-Ajuba complex regulates γ -tubulin recruitment to centrosomes and spindle organization during mitosis. *FEBS LETTER* 580: 782-788, 2006、査読有
- 22 Haraguchi K, Hayashi T, Jimbo T, Yamamoto T and Akiyama T, Role of the kinesin-2 family protein, KIF3, during mitosis. *J. Biol. Chem.* 281: 4094-4099, 2006、査読有
- 23 Ito Y, Suzuki T, Yoshida H, Tomoda C, Uruno T, Takamura Y, Miya A, Kobayashi K, Matsuzuka F, Kuma K, Yamamoto T, Miyauchi A. Phosphorylation and inactivation of Tob contributes to the progression of papillary carcinoma of the thyroid, *Cancer Lett.* 220: 237-242, 2005、査読有
- 24 Abe T., Matsumura S., Katano T., Tokai-Nishizumi N, Ohsugi M, Suzuki E, and Yamamoto T, The chromokinesin Kid is required for maintenance of proper metaphase spindle size. *Mol. Biol. Cell* 16: 5455-5463, 2005、査読有
- 25 Vo N, Klein ME, Varlamova O, Keller DM, Yamamoto T, Goodman RH, and Impey S. A cAMP-response element binding protein-induced microRNA regulates neuronal morphogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 16426-16431, 2005、査読有
- [学会発表] (計 20 件)
- ① 山本 雅、Roles of CCR4-NOT deadenylase complex in spermatogenesis and energy metabolism. KSMBMB Annual International Conference、2009年10月29日、韓国(ソウル)
- ② 伊藤健太郎、CNOT1 and CNOT2 are essential for maintaining the structural integrity and the deadenylase activity of the CCR4-NOT complex. 第32回日本分子生物学会年会、2009年12月11日、パシフィコ横浜
- ③ 小川晋一、Anti-proliferative protein Tob is relevant to RNA metabolism and facilitates the interaction between P-body and stress granule. 第32回日本分子生物学会年会、2009年12月11日、パシフィコ横浜
- ④ 仙波憲太郎、Development of Novel ErbB2 Antibody and Ph-responsive Immunoliposomes Targeting ErbB2/ HER2 in Breast Cancer Cells. International Congress of Antibodies Conference 2010、2010年3月25日
- ⑤ 渡邊正人、Transducer of ErbB2, 1(TOB1)とCNOT7間相互作用の精密解析、第31回日本分子生物学会年会、2008年、12月12日、神戸
- ⑥ 米田光宏、Tobファミリー遺伝子anaは肺腺癌における癌抑制遺伝子候補である、第67回日本癌学会学術総会、2008年10月30日、名古屋
- ⑦ 山本雅、The Tob-CCR4-NOT complex reveals novel mechanisms of G1 arrest and DNA damage-induced apoptosis. 日本癌学会学術総会、2007年10月5日、横浜
- ⑧ 鈴木亨、Regulation of DNA damage-induced apoptosis and sensitivity to anti-cancer drug by Tob. 日本癌学会学術総会、2007年10月5日、横浜
- ⑨ 森田斉弘、Depletion of mammalian CCR4b deadenylase triggers increment of the p27 mRNA level and impairs cell growth、第66回日本癌学会学術総会、2007年10月4日、横浜
- ⑩ 森田斉弘、Depletion of Mammalian

CCR4b Deadenylase Triggers
Enhancement of the p27Kip1 mRNA
level and Impairs Cell Growth、
Mechanisms and Models of Cancer
Meeting、2007年8月10日、La Jolla, CA

[その他]

ホームページ等

<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/gannsig/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 雅 (YAMAMOTO TADASHI)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：40134621

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者