

平成22年 6月 14日現在

研究種目： 若手研究 (B)  
 研究期間： 2008 ~ 2009  
 課題番号： 20770103  
 研究課題名 (和文) 核内に局在する新規低分子量 G タンパク質の機能解析  
 研究課題名 (英文) Functional analysis of atypical nuclear small GTP-binding protein  
 研究代表者 多胡 憲治 (TAGO KENJI)  
 奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教  
 研究者番号： 20306111

研究成果の概要 (和文)：低分子量 GTP 結合蛋白質  $\kappa$ B-Ras は NF- $\kappa$ B の活性化を阻害する分子として報告された。 $\kappa$ B-Ras は核内に局在し、主に GTP 結合型であることが分かった。 $\kappa$ B-Ras の変異体 T18N は GTP に対する結合活性を示さず、しかもその細胞内局在は細胞質であり、 $\kappa$ B-Ras は結合するグアニンヌクレオチドによってその細胞内局在を変化することが分かった。 $\kappa$ B-Ras および T18N 変異体の過剰発現は TNF- $\kappa$ による NF- $\kappa$ B の活性化を顕著に抑制し、その阻害効果は GDP 結合型である T18N 変異体の方が強かった。

研究成果の概要 (英文)： We found that  $\kappa$ B-Ras is a novel type of nuclear-cytoplasmic small GTPase that mainly binds to GTP, and its localization seemed to be regulated by its GTP/GDP-binding state. Unexpectedly, the GDP-binding form of  $\kappa$ B-Ras mutant exhibited a more potent inhibitory effect on NF- $\kappa$ B activation, and this inhibitory effect seemed to be due to suppression of the transactivation of a p65/RelA NF- $\kappa$ B subunit.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞情報伝達機構

1. 研究開始当初の背景

 $\kappa$ B-Ras は Ghosh らによって I $\kappa$ B 結合蛋白質

として同定された。NF- $\kappa$ B は通常 I $\kappa$ B と複合体を形成して細胞質に不活性型として存在するが、活性化刺激に伴って I $\kappa$ B はリン酸化及びユビキチン化により分解され、NF- $\kappa$ B は核内に移行し標的遺伝子の発現を誘導する。 $\kappa$ B-Ras は I $\kappa$ B の分解を抑制する事によって NF- $\kappa$ B の転写活性を抑制する事が報告されている。しかしながら、その詳細な抑制の分子機構及び  $\kappa$ B-Ras が相互作用する分子は不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究は新規低分子量 G タンパク質である  $\kappa$ B-Ras の標的分子を同定し、その生理機能を解明することを目的とする。 $\kappa$ B-Ras は転写因子 NF- $\kappa$ B を阻害する分子として同定されたが、我々の解析により新しい細胞内シグナル経路を制御する可能性が見出された。本研究では、我々はこの新しい機能を明らかにするため、 $\kappa$ B-Ras の標的分子を探索、同定することを目的とした。

## 3. 研究の方法

はじめに点変異の導入により恒常的不活性型の変異型  $\kappa$ B-Ras (T18N 変異体) を作製し、生化学的機能、細胞内局在、NF- $\kappa$ B の活性化に対する抑制メカニズムを検討した。さらに、(1) 酵母 Two-Hybrid 法および (2)  $\kappa$ B-Ras のリコンビナント蛋白質を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、 $\kappa$ B-Ras と結合する分子の探索を行う。現在まで  $\kappa$ B-Ras および恒常的不活性型変異体 T18N のリコンビナント蛋白質は調製等の条件検討は完了しており、大量調製が可能である。内在性  $\kappa$ B-Ras を認識する抗体の作製にも着手している。2年目では1年目に得られた  $\kappa$ B-Ras 結合分子を用いて機能の解明、発癌シグナルへの関与を検討した。

## 4. 研究成果

我々は  $\kappa$ B-Ras が I $\kappa$ B の安定化よりもむしろ p65/RelA など NF- $\kappa$ B 自身の転写活性に対して影響を及ぼしている可能性を示した (論文投稿中)。 $\kappa$ B-Ras はその結合するグアニンヌクレオチドによってその細胞内局在を変化する。GTP 結合型  $\kappa$ B-Ras の機能を明らかにするため、 $\kappa$ B-Ras の活性に影響を与えるシグナルを探索した。その結果、がん遺伝子 Ras が  $\kappa$ B-Ras の GTP 結合能を正に制御することを見出した。さらにがん遺伝子型 Ras は  $\kappa$ B-Ras の核内への局在を促進することが示され、この結果は  $\kappa$ B-Ras が GTP 結合型のときに核内への局在が促進される以前の観察とよく一致した。さらに野生型  $\kappa$ B-Ras および GDP 結合型である  $\kappa$ B-Ras (T18N) 変異体のがん遺伝子型 Ras の発がんシグナルへの影響を検討した。野生型  $\kappa$ B-Ras はがん遺伝子型 Ras によるマウス線維芽細胞の形質転換能を著しく促進したが、T18N 変異体にはそのような効果は観察されなかった。以上の結果から  $\kappa$ B-Ras はがん遺伝子型 Ras の下流シグナルに位置し、がん遺伝子型 Ras のがん化シグナルにおいて重要な役割を果たしていることが示唆された。また、 $\kappa$ B-Ras の新規結合分子を探索する目的で C 末端側に FLAG タグおよび His タグを付加した  $\kappa$ B-Ras 発現ベクターを作成し、TAP 法により  $\kappa$ B-Ras 複合体を精製した。結合分子を同定したところ、細胞死を制御する Hippo 経路に関与するプロテインキナーゼ STK38 が得られた。 $\kappa$ B-Ras が STK38 の活性を制御することにより発がんシグナルに関わる可能性が示唆された。

## 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 12 件)

- 1) Ric-8B stabilizes the alpha subunit of stimulatory G protein by inhibiting its ubiquitination. Nagai Y, Nishimura A, Tago K, Mizuno N, Itoh H. *J Biol Chem*. 2010 Apr; 285(15):11114-11120. (査読あり)
- 2) Licochalcone A potently inhibits TNF $\cdot$ -induced NF- $\kappa$ B activation through the direct inhibition of IKK activation. Funakoshi-Tago M, Tanabe S, Tago K, Itoh H, Mashino T, Sonoda Y, Kasahara T. *Mol Pharmacol*. 2009 Oct; 76(4):745-53. (査読あり)
- 3) The polycythemia vera-associated Jak2 V617F mutant induces tumorigenesis in nude mice. Abe M, Funakoshi-Tago M, Tago K, Kamishimoto J, Aizu-Yokota E, Sonoda Y, Kasahara T. *Int Immunopharmacol*. 2009 Jul; 9(7-8): 870-7. (査読あり)
- 4) G-protein signalling negatively regulates the stability of aryl hydrocarbon receptor. Nakata A, Urano D, Fujii-Kuriyama Y, Mizuno N, Tago K, Itoh H. *EMBO Rep*. 2009 Jun; 10(6): 622-8. (査読あり)
- 5) The acute lymphoblastic leukemia-associated JAK2 L611S mutant induces tumorigenesis in nude mice. Funakoshi-Tago M, Tago K, Sumi K, Abe M, Aizu-Yokota E, Oshio T, Sonoda Y, Kasahara T. *J Biol Chem*. 2009 May 8; 284(19): 12680-90. (査読あり)
- 6) Licochalcone A significantly suppresses LPS signaling pathway through the inhibition of NF- $\kappa$ B p65 phosphorylation at serine 276. Furusawa J, Funakoshi-Tago M, Tago K, Mashino T, Inoue H, Sonoda Y, Kasahara T. *Cell Signal*. 2009 May; 21(5): 778-85. (査読あり)
- 7) TRAF6 negatively regulates TNF $\cdot$ -induced NF- $\kappa$ B activation. Funakoshi-Tago M, Kamada N, Shimizu T, Hashiguchi Y, Tago K, Sonoda Y, Kasahara T. *Cytokine*. 2009 Feb; 45(2): 72-9. (査読あり)
- 8) Licochalcone A is a potent inhibitor of TEL-Jak2-mediated transformation through the specific inhibition of Stat3 activation. Funakoshi-Tago M, Tago K, Nishizawa C, Takahashi K, Mashino T, Iwata S, Inoue H, Sonoda Y, Kasahara T. *Biochem Pharmacol*. 2008 Dec 15;76(12):1681-93. (査読あり)
- 9) Negative regulation of Jak2 by its auto-phosphorylation at tyrosine 913 via the Epo signaling pathway. Funakoshi-Tago M, Tago K, Kasahara T, Parganas E, Ihle JN. *Cell Signal*. 2008 Nov; 20(11): 1995- 2001 (査読あり)
- 10) Celecoxib potently inhibits TNF $\cdot$ -induced nuclear translocation and activation of NF- $\kappa$ B.

Funakoshi-Tago M, Shimizu T, **Tago K**, Nakamura M, Itoh H, Sonoda Y, Kasahara T. *Biochem Pharmacol.* 2008 Sep 1; 76(5): 662-71. (査読あり)

11) TRAF6 is a critical signal transducer in IL-33 signaling pathway. Funakoshi-Tago M, **Tago K**, Hayakawa M, Tominaga S, Ohshio T, Sonoda Y, Kasahara T. *Cell Signal.* 2008 Sep; 20(9): 1679-86. (査読あり)

12) Domain-domain interaction of P-Rex1 is essential for the activation and inhibition by G protein  $\beta\gamma$  subunits and PKA. Urano D, Nakata A, Mizuno N, **Tago K**, Itoh H. *Cell Signal.* 2008 Aug; 20(8): 1545-54. (査読あり)

[学会発表] (計5件)

- 1) 西村 明幸、Structural basis of a novel targeting site for the specific inhibition of heterotrimeric G proteins、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月、神奈川
- 2) 吉田真奈美、G タンパク質シグナルによる doublecortin のリン酸化と細胞遊走の解析、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月、兵庫
- 3) 永井 裕介、三量体 G タンパク質  $G\cdot s$  のユビキチン化は Ric-8B との結合により抑制される、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月、兵庫
- 4) 加戸美奈、NF- $\kappa$ B シグナルに対する哺乳動物の 2 種類の Ric-8 の作用、第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生

化学会大会合同大会、2008 年 12 月、兵庫

- 5) 向縄昌輝、NF- $\kappa$ B 活性化に対する低分子量 GTP 結合タンパク質  $\kappa$ B-Ras の抑制機構の解析、第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会合同大会、2008 年 12 月、兵庫

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等：該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

多胡 憲治 (TAGO KENJI)

研究者番号：20306111

奈良先端科学技術大学院大学、  
バイオサイエンス研究科・助教

(2) 研究分担者；該当なし

(3) 連携研究者；該当なし