

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790065

研究課題名(和文)

DNA 損傷応答因子 Rassf1c の機能解析

研究課題名(英文)

Generation and characterization of Rassf1c knockout mice.

研究代表者

中村 貴 (NAKAMURA TAKASHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80431948

研究成果の概要(和文):

本研究では DNA 損傷応答因子 Rassf1c ノックアウトマウスおよび Rassf1a, Rassf1c ダブルノックアウトマウスの作出に成功した。Rassf1c ノックアウトマウスは正常に出生するものの、離乳後から成長遅延を示すことが明らかとなった。以上の結果から、Rassf1c は DNA 損傷応答のみならず、正常な個体の成長に必須の役割を担っていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文):

To define the physiological function of Rassf1c protein, we used gene targeting in mouse embryonic stem cells to generate protein Rassf1c knockout mice. The knockout mice showed significant growth retardation. These results suggest that the ability of mice to repair Rassf1c proteins is essential for normal growth.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2009 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2010 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：DNA 損傷応答、ストレス応答性キナーゼ、ノックアウトマウス、Rassf1c

1. 研究開始当初の背景

染色体 DNA は紫外線、放射線、化学物質、活性酸素種など様々な内的および環境要因によって常に損傷を受けており、その頻度は一日一細胞あたり数十万回に上るといわれる。このような DNA 損傷の発生は個々の細胞において常に監視されており、軽度の損傷であれば細胞内に存在する一連の DNA 修復酵素群のはたらきによって速やかに修復される。一方、過度の DNA 損傷を受けて修復が不可能

となった細胞は、損傷を受けてから数時間のうちにアポトーシスを起こし生体から排除される運命を辿る。DNA 損傷応答に関する研究は、その重要性から国内外を問わず盛んに研究が進められており、その過程でストレス応答性 MAP キナーゼである JNK (c-jun N-terminal kinase) が DNA 損傷ストレスによって活性化され、その活性化状態の違いにより細胞の生・死を規定する分子スイッチとして機能する事が明らかとなってきた。しかし

ながら、DNA 損傷という核内のイベントが、どのような機構によって細胞質での JNK 活性化という情報へ変換されるかは不明であった。最近、申請者が所属するグループは、DNA 損傷センサーとして注目されている核内構造体 PML (Promyelocytic Leukaemia) ボディンが DNA 損傷時に起点となり、核から細胞質への情報伝達を媒介し、JNK の持続的活性化を誘導する事を明らかにした。PML ボディンは PML タンパク質を中心とした核内に複数存在する構造体であるが、既知の DNA 損傷応答因子に加えて、複数の転写制御因子やがん抑制遺伝子産物、アポトーシス制御因子が含まれる事が報告されている。そこで PML ボディンが DNA 損傷依存的な JNK 活性化に関与している可能性を考え、Yeast two hybrid system を用いた介在因子のスクリーニングと解析を行った。その結果、PML ボディン構成分子の一つである Daxx (death associated protein 6) ががん抑制遺伝子産物候補として知られる Rassf1c の核外移行を誘導することで細胞質中の JNK 活性化を制御する事が明らかとなった (*EMBO J*, 2006)。

2. 研究の目的

我々は研究を進める過程で、JNK 依存型アポトーシスにおいてアポトーシスの実行因子かつクロマチン凝集の必須因子として MST (Mammalian STE20-like kinase)/Hippo を見出した (*Mol Cell Biol*, 2007)。MST はショウジョウバエの Hippo に相当する分子であり、Hippo を中心としたシグナル伝達系は細胞増殖と細胞死を制御する事で、個体における組織・器官サイズをコントロールするスイッチ分子である事が明らかとなりつつある。また Hippo シグナルを構成する分子は様々な生物種において進化的に広く保存されており、ヒトではその多くががん抑制遺伝子とし

て機能する事から「がん抑制シグナル伝達系」としても多くの研究者から注目を受けており、近年論文報告が増加している。しかしながら JNK 依存型アポトーシスにおける MST1 の活性化機構は明らかでない。そこで我々は DNA 損傷刺激依存的に核から細胞質へと移動し、細胞質の JNK を活性化する分子である Rassf1c に着目し、Rassf1c による MST 活性化機構の解明を目指した。具体的には Rassf1c 遺伝子破壊マウスを作成し、Rassf1c の生理機能、特に DNA 損傷応答における生体反応を中心に細胞の運命決定に与える影響についても解析を試みる。

3. 研究の方法

DNA 損傷応答における Rassf1c の詳細な機能やシグナルネットワークは不明である。そこで、DNA 損傷刺激依存的に Rassf1c を中心に形成される DNA 損傷シグナルソームの同定を行い、シグナルソーム構成分子の JNK シグナル伝達系および MST/Hippo シグナル伝達系に対する役割について解析をおこなう。また Rassf1c の生理機能を明らかにする目的で Rassf1c 遺伝子破壊マウスの作出・解析についても試みた。実際の方法としては Rassf1c 遺伝子において Rassf1c アイソフォーム特異的アミノ酸をコードするエキソン部分をネオマイシン耐性遺伝子に置換するためのターゲティングベクターを構築し、本ベクターを E14K ES 細胞へ導入し、G418 耐性を示す ES クローンを選択した。さらにサザンブロットング法によって相同組換え体クローンを取得し、C57Bl/6J 由来胚へのプラスシストインジェクション、仮親への卵管移植によりキメラマウスを得た。次に本キメラマウスと野生型マウスの子孫においてゲノム DNA のサザンブロットングを行い、生殖細胞系列への移行を確認した後、これらヘテロマウスの

交配によって *Rassf1c* ノックアウトマウスを得た。さらに、*Rassf1c* 遺伝子の機能をより詳細に比較検討する目的で、*Rassf1* のメジャーアイソフォームである *Rassf1a*, *Rassf1c* のダブルノックアウトマウスの作出を試みた。具体的には *Rassf1a*, *Rassf1c* に共通したエキソンをネオマイシン耐性遺伝子に置換するためのターゲティングベクターを新たに構築し、*Rassf1c* 遺伝子ノックアウトマウスの作出同様に ES 細胞へ導入、相同組換え体クローンの習得からマウス系統の樹立までを試みた。

4. 研究成果

ノックアウトマウスはメンデルの法則に従い正常に出生し、離乳期までは野生型同様に成長した。しかしながら離乳期以後は徐々に成長遅延を呈し、成体においても明確な体長・体重の低下が観察された。より詳細な解析を行うため、各種臓器重量を比較したところ、殆どの臓器において野生型と比べて 10% 程度の湿重量の低下がみられ、骨組織においても頭蓋骨の変形や長管骨軟骨成長に起因すると考えられる骨長の低下が観察された。以上の結果から、DNA 損傷応答因子として知られる *Rassf1c* は正常な個体の成長に必須の因子であることが明らかとなった。また、*Rassf1a*, *Rassf1c* ダブルノックアウトマウスの作出にも成功し、今後より詳細な検討を行なう予定である。

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7件)

1) Mizoguchi F., Izu Y., Hayata T., Hemmi H., Nakashima K., Nakamura T.,

Kato S., Miyasaka N., Ezura Y., Noda M., Osteoclast-specific Dicer gene deficiency suppresses osteoclastic bone resorption. *J Cell Biochem*, 109(5): 866-75, 2010 [査読有り]

2) Saita Y., Nakamura T., Mizoguchi F., Nakashima K., Hemmi H., Hayata T., Ezura Y., Kurosawa H., Kato S., Noda M., Combinatory effects of androgen receptor deficiency and hind limb unloading on bone. *Horm Metab Res*. 41(11): 822-828, 2009 [査読有り]

3) Nakamura T., Nishina H., Liver development: lessons from knockout mice and mutant fish. *Hepatol Res*. 39(7): 633-644, 2009 [査読有り]

4) Inose H., Ochi H., Kimura A., Fujita K., Xu R., Sato S., Iwasaki M., Takeuchi Y., Fukumoto S., Saito K., Nakamura T., Siomi H., Ito H., Arai Y., Shinomiya K-I., Takeda S., A novel microRNA regulatory mechanism of osteoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106(49): 20794-20799, 2009. [査読有り]

5) Imai Y., Nakamura T., Matsumoto T., Takaoka K., Kato S., Molecular mechanisms underlying the effects of sex steroids on bone and mineral metabolism. *J Bone Miner Metab*. 27(2):127-30, 2009 [査読有り]

6) Iwasawa M., Miyazaki T., Nagase Y., Akiyama T., Kadono Y., Nakamura M., Oshima Y., Yasui T., Matsumoto T., Nakamura T., Kato S., Hennighausen L., Nakamura K., Tanaka S., The antiapoptotic protein Bcl-2 negatively regulates the bone-resorbing activity of osteoclasts in mice. *J Clin Invest*, 119(10): 3149-59, 2009 [査読有り]

7) Ohata S, Nawa M, Kasama T, Yamasaki T, Sawanobori K, Hata S, Nakamura T, Asaoka Y, Watanabe T, Okamoto H, Hara T, Terai S, Sakaida I, Katada T, Nishina H., Hematopoiesis-dependent expression of CD44 in murine hepatic progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 379(4):817-23, 2009 [査読有り]

[学会発表](計4件)

- 1) 松尾光一、武田佳彦、高田康成、中村 貴、末松 誠、矢代 航、南郷脩史、百生 敦
骨細胞による骨溶解：授乳期マウス腓骨での骨小腔体積の解析
第28回日本骨代謝学会 東京 2010年7月23日
- 2) 延 琨榮、峯畑健一、高田伊知郎、今井祐記、中村 貴、鈴木健之、加藤茂明
破骨細胞分化におけるEpigenetic制御機構の解析
第28回日本骨代謝学会 東京 2010年7月23日
- 3) 中村 貴、井上 菜穂子、瀬藤 光利、仁科 博史
質量顕微鏡法を用いた再生肝の解析
第16回肝細胞研究会 山形 2009年6月26日
- 4) 中村 貴、仁科 博史
顕微質量分析装置を用いた再生肝の解析
第10回日本肝臓医生物学研究会 金沢 2009年4月18日

[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

<http://www.tmd.ac.jp/mri/dbio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 貴 (NAKAMURA TAKASHI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：80431948

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

仁科 博史 (NISHINA HIROSHI)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・教授

研究者番号：60212122