

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号： 14301
 研究種目： 基盤研究（C）
 研究期間： 2010～2012
 課題番号： 22501010
 研究課題名（和文） cDNA 発現クローニング法を用いた Ras の制御因子の探索

研究課題名（英文） Identification of the genes regulate Ras-mediated signaling
 by cDNA expression cloning method

研究代表者

北山 仁志（KITAYAMA HITOSHI）
 京都大学・医学研究科・准教授
 研究者番号： 30231286

研究成果の概要（和文）： がん遺伝子 Ras は、様々な腫瘍で活性化変異が見られ、Ras が関与するシグナルを抑制することは重要な課題である。本研究では、活性化 Ras 遺伝子でがん化した細胞株”DT”をモデル細胞に用い、その悪性化した性質を抑制する活性を持つ、すなわち Ras の関与するシグナルを抑制する遺伝子を、同定することを試みた。一連の遺伝子スクリーニングの結果、約 80 個の候補遺伝子が同定された。

研究成果の概要（英文）： It is important to regulate Ras-mediated signaling since constitutively active mutations of Ras genes are frequently found in various kinds of tumor cells. In this project we are aiming to identify genes with transformation suppressor activity against DT cells harboring constitutively active Ras oncogene. After a series of cDNA expression cloning around 80 candidate genes were identified.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野： 分子細胞生物学

科研費の分科・細目： 腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード： がん制御遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) 体細胞突然変異により活性化された K-Ras 遺伝子は、大腸がんや膵臓がんなどで高頻度に見られる。したがって、活性化 Ras タンパク質を持つ状況において、いかにして、細胞の悪性化に関わるシグナルを制御するかということは依然重要な課題と考えられる。このためには、Ras の活性の制御に関わる因子をできるだけ多く明らかにし、その中

から治療のためのターゲットとなりうる因子を選択することが 1 つのアプローチである。

(2) cDNA 発現クローニング法によるスクリーニングの成否を左右する最大の要因と考えられるのは cDNA ライブラリーの質である。cDNA プロジェクトが進展する中で、完全長の cDNA を得るための技術が開発され、また、サブトラクション技術

の開発により、発現の高い cDNA と低い cDNA を同じような割合でライブラリー中に含ませることが可能になった。したがって、最新の技術を用いて作製された cDNA ライブラリーを用いることで、これまで技術上の問題からライブラリーから除かれていた cDNA をもスクリーニングすることになり、新たな遺伝子の活性を発見できる可能性が高まると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、良質の cDNA を発現クローニング法に用いるため、最初に発現ベクターの開発をする。このため、一般のベクターに見られるような、サイズの小さい cDNA ほど入りやすく大きな cDNA ほど入りにくいというバイアスがかからないようにするため、ラムダファージをベースとして、その中にプラスミドとして回収できる部分を持つファジェミド型の発現ベクターを開発する。(このベクターでは 10kb までの cDNA が容易に挿入可能である。) 次に、開発したベクターを用いて、cDNA 発現ライブラリーを作製する。さらに作製されたライブラリーを DT 細胞にトランスフェクトし、悪性形質の抑制された正常復帰株 (リバータント) をできるだけ多くクローニングした後、プラスミド部分を回収し、リバータント誘導活性を持つ遺伝子を同定する。さらに、活性の新規性の高い遺伝子について機能の解析を進める。

3. 研究の方法

(1) DNA 操作が容易なプラスミドを用い、実験に必要な因子を含むプラスミド型発現ベクターを最初に作製した。このプラスミドの一部を制限酵素で切り出し、ラムダファージ DNA に挿入し、ファジェミド型の cDNA 発現ベクターを作製した。

(2) ラット脳 cDNA ライブラリーから

cDNA 部分をホーミングエンドヌクレアーゼで切り出し、cDNA 発現ベクターにライゲーションした。ライゲーションした DNA とパッケージングエクストラクトを用いてファジェミド型の cDNA 発現ライブラリーを作製した。

(3) DT 細胞を 60mm のコラーゲンコートディッシュにつき 5×10^4 個プレATINGし、 $5 \mu\text{g}$ のライブラリー-DNA をカルシウムリン酸共沈法によりトランスフェクトした。トランスフェクション後 2 日目に、細胞をリプレATINGし、プラストサイジンを含む培地を用いて DNA を取り込んだ細胞を選択した。選択された細胞のうち、さらに PBS で接着性の弱い細胞を洗い落とした後、顕微鏡による細胞の観察により、リバータントを判別し、クローニングした。

(4) リバータントを 60mm ディッシュに培養後、ゲノム DNA を抽出し、ゲノム DNA $2 \sim 5 \mu\text{g}$ に対し 1unit の Cre リコンビナーゼを働かせ、DNA を環状化後精製し、大腸菌へのトランスフォーメーションに用い、大腸菌内にプラスミドを回収した。

(5) DT 細胞を 35mm のコラーゲンコートディッシュにつき 3×10^4 個プレATINGし、 $1 \mu\text{g}$ の回収したプラスミドをトランスフェクトした。スクリーニングと同様の観察により、リバータント誘導活性があるかどうか判定をした。

4. 研究成果

(1) cDNA 発現クローニング法を用いて Ras の制御因子を探索するため、ファジェミド型の cDNA 発現ベクター λ HK2 を開発した。このベクターには、cDNA を発現させるための EF1 α プロモーター、cDNA クローニング部位、培養細胞での選択マーカーであるプラストサイジン耐性遺伝子、

大腸菌での選択マーカーであるアンピシリン耐性遺伝子、プラスミド部分を環状化するのに必要な2つの loxP 部位を保持している。このベクターの開発により、以下のライブラリーの作製が可能となった。

(2) ラット脳 cDNA ライブラリーより、ホーミングエンドヌクレアーゼにより、cDNA を切り出し、 λ HK2 に挿入し、2つの cDNA 発現ライブラリーを作製した。平均 cDNA サイズはそれぞれ 2.0、4.1kb であり、大部分が cDNA を含むことより、以下のトランスフェクション実験が可能となった。

(3) マウス NIH3T3 細胞由来でがん遺伝子 Ras によりトランスフォームした細胞株 DT に、カルシウムーリン酸共沈法で、cDNA 発現ライブラリー-DNA をトランスフェクトした。ブラストサイジンを含む培地で細胞を選別後、コロニーの形態を顕微鏡で観察することにより、リバータントを同定し、コロニーを単離した。一連の実験により 700 個以上のリバータントを単離した。

(4) リバータントから、ゲノム DNA を抽出し、Cre リコンビナーゼを働かせることにより、トランスフェクトした cDNA を含むプラスミド部分を環状化し、大腸菌内に回収した。回収したプラスミドを再び DT 細胞にトランスフェクトし、リバータント誘導活性があるかどうか検討した。これまでに約半数のリバータントを用いて実験し、約 80 個のリバータント誘導活性があると思われる候補遺伝子が同定された。

(5) cDNA 部分の 5'側の DNA 配列を決定した後、ホモロジーサーチにより遺伝子名を知るとともに、完全長の cDNA でありそうかという情報を得た。その結果多くの cDNA が完全長であることが明らかとなった。また、得られた遺伝子は細胞外に分泌されるタンパク質、膜上に存在するタンパク質、低分子

量 G タンパク質の制御因子などさまざまな機能に分類された一方で、遺伝子の中には、DNA 配列は知られているものの文献からあまり解析されていない遺伝子も含まれていた。実験的に情報を得るために、得られた遺伝子を過剰発現することにより、Ras のシグナル伝達経路上にある MAP キナーゼや Akt キナーゼのリン酸化にどのような影響を与えるか検討を進めたところ抑制的に働くものも含まれていた。また、得られた遺伝子の中から数個の興味深い遺伝子を選び、N 末側あるいは C 末側に Myc タグを付け、細胞のどこに存在するか検討した。さらに得られた遺伝子の機能を知るために、イースト Two-hybrid スクリーニングを行い、結合タンパク質の候補の探索を進めた。例えば、リバータント HK2-2A4 に含まれていた遺伝子は、データベース GeneCards の情報を見ると、核内に存在しクロマチンの形成の制御に関わっていると考えられていたが、実際に実験を進めると、タンパク質はほとんど細胞質に存在することが明らかとなった。また、結合タンパク質を調べると MAP キナーゼ関連キナーゼなどが同定された。

このように、候補遺伝子の中には、これまで Ras の介するシグナルとの関係が知られていないものも含まれており、今後、さらに機能解析を進めることで、がんを制御するための創薬のためのヒントを提供すると考えられる。

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 5 件)

- ① Yamamoto M, Matsuzaki T, Takahashi R, Adachi E, Maeda Y, Yamaguchi S, Kitayama H,

Echizenya M, Morioka Y, Alexander DB, Yagi T, Itohara S, Nakamura T, Akiyama H, Noda M. The transformation suppressor gene Reck is required for postaxial patterning in mouse forelimbs. *Biology Open* 1: 458-466, 2012 (査読有)

DOI: 10.1242/bio.2012638

- ② Murai R, Yoshida Y, Muraguchi T, Nishimoto E, Morioka Y, Kitayama H, Kondoh S, Kawazoe Y, Hiraoka M, Uesugi M, Noda M. A novel screen using the Reck tumor suppressor gene promoter detects both conventional and metastasis-suppressing anticancer drugs. *Oncotarget* 1:252-64, 2010 (査読有)

<http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path%5B%5D=136>

- ③ Chandana EP, Maeda Y, Ueda A, Kiyonari H, Oshima N, Yamamoto M, Kondo S, Oh J, Takahashi R, Yoshida Y, Kawashima S, Alexander DB, Kitayama H, Takahashi C, Tabata Y, Matsuzaki T, Noda M. Involvement of the Reck tumor suppressor protein in maternal and embryonic vascular remodeling in mice. *BMC Dev. Biol.* 10:84, 2010 (査読有)
- DOI: 10.1186/1471-213X-10-84
- ④ Noda M, Takahashi C, Matsuzaki T, Kitayama H. What we learn from transformation suppressor genes: lessons from RECK. *Future Oncol.* 6:1105-16, 2010 (査読有)
- DOI: 10.2217/fon.10.80
- ⑤ Loayza-Puch F, Yoshida Y, Matsuzaki T, Takahashi C, Kitayama H, Noda M.

Hypoxia and RAS-signaling pathways converge on, and cooperatively downregulate, the RECK tumor-suppressor protein through microRNAs. *Oncogene* 29:2638-48, 2010 (査読有)

DOI: 10.1038/onc.2010.23

[学会発表] (計 1 件)

- ① 清水正樹、施恭平、野田亮、北山仁志
cDNA 発現クローニング法を用いた Ras 制御因子の探索
日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 13 日 福岡国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北山 仁志 (KITAYAMA HITOSHI)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号： 30231286