

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 2 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440062

研究課題名(和文)新規Rasファミリー蛋白質が制御する発がんシグナルの解析

研究課題名(英文)Analysis of oncogenic signals regulated by novel type of Ras family protein

研究代表者

多胡 憲治 (Tago, Kenji)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：20306111

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Ras遺伝子の突然変異は多くのがん発症の原因となることが知られている。本研究で私達は新規Rasファミリーの一つであるkappaB-Rasが、細胞内の蛋白質リン酸化酵素mTORC1の活性化を介して発がんシグナルに寄与することを明らかにした。さらに、kappaB-Rasの蛋白質複合体を精製し、その結合蛋白質TRB3が、発がんシグナルを抑制する新しい発がんシグナル抑制機構を見出した。その分子機構の詳細は明らかでないが、TRB3は、kappaB-Ras蛋白質にSUMOと呼ばれる蛋白質を架橋させる(SUMO化)ことにより、発がんシグナルを抑制することが明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：It is well established that genetic mutations of Ras genes are involved in many cases of tumorigenesis. In this study, we found that a member of Ras family, kappaB-Ras contributes to the cellular transformation mediated the activation of protein kinase mTORC1. Furthermore, we purified the protein complexes including kappaB-Ras, and found that TRB3 which is identified as an interacting protein of kappaB-Ras functions as novel type of tumor suppressor. Although detailed mechanism is still unclear, it is clarified that TRB3 suppresses the oncogenic signals mediated the SUMO-conjugation of kappaB-Ras.

研究分野：細胞内情報伝達

キーワード：Rasファミリー 低分子量G蛋白質 発がんシグナル

1. 研究開始当初の背景

低分子量 GTP 結合蛋白質は、GDP 結合型から GTP 結合型への変換により活性化される細胞内シグナル伝達経路の分子スイッチとして機能する。低分子量 GTP 結合蛋白質は、細胞の増殖や分化を誘導する重要なシグナル分子であり、低分子量 GTP 結合蛋白質の活性調節機構の破綻が様々な疾患に深く関与する。例えば、大腸がんや膵臓がんなど多くの固形癌では、低分子量 GTP 結合蛋白質 Ras の恒常的活性化を引き起こす Ras(G12V)などの突然変異が見出されている。また、これまでに数多くの低分子量 GTP 結合蛋白質が同定され、その機能が解析されてきたが、現在もその分子種と機能は多様性を広げている。κB-Ras は Ghosh らのグループにより、転写因子 NF-κB を阻害する低分子量 GTP 結合蛋白質として同定された (Fenwick C. *et al. Science*, 2000)。これまでに私達は、κB-Ras が、(1) GTP/GDP の結合状態に依存して、核と細胞質の間を移動すること、(2) 転写活性化因子 p300/CBP と NF-κB との結合を抑制することにより、NF-κB の活性化を阻害するという分子機構を明らかにした (Tago K. *et al. J. Biol. Chem*, 2010)。

2. 研究の目的

最近になり、申請者はκB-Ras が、がん遺伝子 Ras (G12V) を起点とした発がんシグナルにおいても重要な役割を担っていることを見出した。Ras (G12V) はマウス線維芽細胞の形質転換 (がん化) を引き起こすが、shRNA による内在性κB-Ras の発現抑制は、Ras (G12V) による形質転換を完全に阻害した。さらに、κB-Ras を介した発がん機構を明らかにするため、κB-Ras の蛋白質複合体を精製した。その結果、κB-Ras 結合分子として、細胞の生存、増殖シグナルなど様々な生理機能に関わることが報告されている様々な蛋白質を同定した。κB-Ras はこれらの結合分子の機能を介して、発がんシグナルに関わっている可能性が考えられた。従って、本研究はκB-Ras およびその結合分子の機能を明らかにし、κB-Ras による発がんの分子機構を解明することを目的として行われた。

3. 研究の方法

(1) κB-Ras の形質転換能への影響とそのシグナル伝達系の解析

κB-Ras およびκB-Ras 結合蛋白質、さらにはそれらに対する shRNA を発現するレトロウイルスをそれぞれ作成し、NIH-3T3 細胞に感染した。その後、Ras (G12V) による形質転換能に対する影響について軟寒天培地を用いたコロニーの形成アッセイにより評価した。また、細胞抽出液について、各種抗体を用いたイムノプロットによ

り、シグナル伝達系や各種蛋白質の発現レベルについて解析した。

(2) がん化型 Ras が誘導する遺伝子発現変化に対するκB-Ras の影響の解析

DNA アレイを用いた解析により Ras(G12V)が発現誘導する遺伝子群を明らかにした。それらの発現に対するκB-Ras の影響を RNA 干渉法によるκB-Ras 発現抑制を用いて検討した。さらに、発現変化が認められた遺伝子について、そのプロモーター活性を Luciferase アッセイにより解析を行った。

4. 研究成果

NIH-3T3 細胞にκB-Ras を発現するレトロウイルスを感染し、Ras (G12V)による形質転換能に対する影響を検討した。κB-Ras の強制発現は Ras (G12V)による形質転換能を顕著に促進した。一方、shRNA による内在性κB-Ras の発現抑制は、Ras (G12V) による形質転換を顕著に阻害した。興味深いことに、κB-Ras の発現抑制は、Ras (G12V) によるプロテインキナーゼ mTORC1 の活性化を阻害していた。さらに、κB-Ras を介した発がん機構を明らかにするため、κB-Ras の蛋白質複合体から同定されていたκB-Ras 結合分子の中で、とくに細胞の生存、増殖シグナルなど様々な生理機能に関わることが報告されている TRB3 (Tribbles -Homologue 3)、および DDB1 に着目し、研究を行った。TRB3 と DDB1 の Ras (G12V) による形質転換能への影響を検討したところ、TRB3 は Ras (G12V) による発がんシグナルに対して抑制的に作用するのに対して、DDB1 はむしろ Ras (G12V) による形質転換能を促進するという逆の効果を示した。さらに、shRNA を用いた TRB3 の発現抑制は、Ras(G12V)による形質転換能を強く促進することがわかった。以上の結果から、κB-Ras はこれらの結合分子に対する機能制御を介して、Ras (G12V) による発がんシグナルに関わっている可能性が考えられた。κB-Ras 結合蛋白質として TRB3 が同定された当初、私達はκB-Ras が TRB3 によるがん抑制能を解除するのではないかと予想した。しかしながら、κB-Ras の過剰発現は TRB3 による形質転換抑制能をわずかながら有意に解除することはできたものの、その効果は我々の予想したレベルよりはるかに低く、我々の当初の仮説を支持する実験結果は得られなかった。さらに、TRB3 を過剰発現した条件下では、κB-Ras のバンドシフトが検出された。検討の結果、TRB3 はκB-Ras の SUMO 化を促進することが明らかになり、κB-Ras のバンドシフトの原因と考えられた。SUMO 化は様々な蛋白質の機能を修飾することが知られており、TRB3 は SUMO 化を誘導することによってκB-Ras の機能を負に制御することで、Ras (G12V) 形質転換能を抑制している可能性が考えられ

た。SUMOと κ B-Rasの融合蛋白質をNIH-3T3細胞に発現すると、Ras (G12V) による形質転換能および mTORC1 の活性化が顕著に阻害されることが分かった。TRB3 は、ER ストレスに応答して発現するがん抑制蛋白質として同定されたが、未だにその機能、発がんシグナルを抑制する作用機序は報告されていない。本研究により、TRB3 が SUMO 化を介して機能する新しいタイプのがん抑制遺伝子産物であることが示された。さらに、各種 Ras シグナルにおける κ B-Ras の関与を解析した。DNA アレイ解析の結果、Ras(G12V)によって、炎症性サイトカイン IL-33 とその受容体タンパク質 ST2/ST2L の発現が誘導されることが分かった。興味深いことに、核内に局在する IL-33 前駆体 NF-HEV は Cyclin D1 のタンパク質合成に必須であり、Ras(G12V)による形質転換に必要であることが明らかになった。また、ST2/ST2L の発現誘導には、転写因子 STAT3 と ELK1 の活性化が必要であることも分かった。一方で、shRNA による内在性 κ B-Ras の発現抑制は、これらの現象に影響を及ぼさなかった。以上の結果から、 κ B-Ras は IL-33 及び ST2/ST2L を介したシグナル経路とは独立して発がんシグナルに関与すると考えられた。

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 18 件)

- (1) Coffee extract inhibits adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes by interrupting insulin signaling through the downregulation of IRS1. Maki C, Funakoshi-Tago M, Aoyagi R, Ueda F, Kimura M, Kobata K, **Tago K**, Tamura H. *PLoS One*. 2017 Mar 10;12(3):e0173264. doi: 10.1371/journal.pone.0173264.
- (2) STAT3 and ERK pathways are involved in cell growth stimulation of the ST2/IL1RL1 promoter. **Tago K**, Ohta S, Funakoshi-Tago M, Aoki-Ohmura C, Matsugi J, Tominaga SI, Yanagisawa K. *FEBS Open Bio*. 2017 Jan 19;7(2):293-302. doi: 10.1002/2211-5463.12192.
- (3) Heterotrimeric G protein Gas subunit attenuates PLEKHG2, a Rho family-specific guanine nucleotide exchange factor, by direct interaction. Sugiyama K, **Tago K**, Matsushita S, Nishikawa M, Sato K, Muto Y, Nagase T, Ueda H. *Cell Signal*. 2017 Apr;32:115-123. doi: 10.1016/j.cellsig.2017.01.022.
- (4) Phosphorylated CIS suppresses the Epo or JAK2 V617F mutant-triggered cell proliferation through binding to EpoR. Funakoshi-Tago M, Moriwaki T, Ueda F, Tamura H, Kasahara T, **Tago K**. *Cell Signal*. 2017 Feb;31:41-57. doi: 10.1016/j.cellsig.2016.12.008.
- (5) Three Tyrosine Residues in the Erythropoietin Receptor Are Essential for Janus Kinase 2 V617F Mutant-induced Tumorigenesis. Ueda F, **Tago K**, Tamura H, Funakoshi-Tago M. *J Biol Chem*. 2017 Feb 3;292(5):1826-1846. doi: 10.1074/jbc.M116.749465.
- (6) A bis-malonic acid fullerene derivative significantly suppressed IL-33-induced IL-6 expression by inhibiting NF- κ B activation. Funakoshi-Tago M, Miyagawa Y, Ueda F, Mashino T, Moriwaki Y, **Tago K**, Kasahara T, Tamura H. *Int Immunopharmacol*. 2016 Nov;40:254-264. doi: 10.1016/j.intimp.2016.08.031.
- (7) ZNF70, a novel ILDR2-interacting protein, contributes to the regulation of HES1 gene expression. Watanabe K, Nakayama K, Ohta S, **Tago K**, Boonvisut S, Millings EJ, Fischer SG, LeDuc CA, Leibel RL, Iwamoto S. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Sep 2;477(4):712-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.124.
- (8) 「がん抑制遺伝子産物 ARF の新しい標的タンパク質 DDX5」**多胡 憲治**, 多胡 めぐみ. *生化学*, 2016 第 88 巻第 2 号, 207-210
- (9) Soluble form of the ST2 gene product exhibits growth promoting activity in NIH-3T3 cells. Tominaga SI, Ohta S, **Tago K**. *Biochem. Biophys. Rep.* 2016, 5: 8-15.
- (10) A proline-type fullerene derivative inhibits adipogenesis by preventing PPAR γ activation. Funakoshi-Tago M, Hattori T, Ueda F, **Tago K**, Ohe T, Mashino T, Tamura H. *Biochem. Biophys. Rep.* 2016, 5: 259-265
- (11) Intracellular NF-HEV/IL-33 harbors essential roles in Ras-induced cellular transformation by contributing to cyclin D1 protein synthesis. Ohta S, **Tago K**, Funakoshi-Tago M, Matsugi J, Yanagisawa K. *Cell Signal*. 2016 Aug;28(8):1025-36. doi: 10.1016/j.cellsig.2016.04.013.
- (12) Nepetaefuran and leonotinin isolated from *Leonotis nepetaefolia* R. Br. potently inhibit the LPS signaling pathway by suppressing the

- transactivation of NF- κ B. Ueda F, Iizuka K, **Tago K**, Narukawa Y, Kiuchi F, Kasahara T, Tamura H, Funakoshi-Tago M. *Int Immunopharmacol.* 2015 Oct;28(2):967-76. doi: 10.1016/j.intimp.2015.08.015.
- (13) Anti-inflammatory activity of flavonoids in Nepalese propolis is attributed to inhibition of the IL-33 signaling pathway. Funakoshi-Tago M, Okamoto K, Izumi R, **Tago K**, Yanagisawa K, Narukawa Y, Kiuchi F, Kasahara T, Tamura H. *Int Immunopharmacol.* 2015 Mar;25(1):189-98. doi: 10.1016/j.intimp.2015.01.012.
- (14) Dual function of IL-33 on proliferation of NIH-3T3 cells. Tominaga S, **Tago K**, Tsuda H, Komine M. *Cytokine.* 2015 Mar;72(1):105-8. doi: 10.1016/j.cyto.2014.12.004.
- (15) Arf6 guanine nucleotide exchange factor cytohesin-2 binds to CCDC120 and is transported along neurites to mediate neurite growth. Torii T, Miyamoto Y, **Tago K**, Sango K, Nakamura K, Sanbe A, Tanoue A, Yamauchi J. *J Biol Chem.* 2014 Dec 5;289(49):33887-903. doi: 10.1074/jbc.M114.575787.
- (16) NLRP3 regulates neutrophil functions and contributes to hepatic ischemia-reperfusion injury independently of inflammasomes. Inoue Y, Shirasuna K, Kimura H, Usui F, Kawashima A, Karasawa T, **Tago K**, Dezaki K, Nishimura S, Sagara J, Noda T, Iwakura Y, Tsutsui H, Taniguchi S, Yanagisawa K, Yada T, Yasuda Y, Takahashi M. *J Immunol.* 2014 May 1;192(9):4342-51. doi: 10.4049/jimmunol.1302039.
- (17) Effect of chemical modification on the ability of pyrrolidinium fullerene to induce apoptosis of cells transformed by JAK2 V617F mutant. Funakoshi-Tago M, Tsukada M, Watanabe T, Mameda Y, **Tago K**, Ohe T, Nakamura S, Mashino T, Kasahara T. *Int Immunopharmacol.* 2014 May;20(1):258-63. doi: 10.1016/j.intimp.2014.02.035.
- (18) Arf tumor suppressor disrupts the oncogenic positive feedback loop including c-Myc and DDX5. **Tago K**, Funakoshi-Tago M, Itoh H, Furukawa Y, Kikuchi J, Kato T, Suzuki K, Yanagisawa K. *Oncogene.* 2015 Jan 15;34(3):314-22. doi: 10.1038/onc.2013.561.
- [学会発表](計 9 件)
- (1) がん化型 Ras 変異体は NF- κ B の過剰な活性化を引き起こす. 多胡憲治, 多胡めぐみ, 太田聡, 松儀実広, 柳澤健 第 87 回日本生化学会大会 (2014 年 10 月 15 日~18 日, 京都市)
- (2) 脂肪細胞分化における RNA helicase DDX5 の役割. 野間瞭太, 多胡めぐみ, 多胡憲治, 柳澤健, 田村悦臣 第 87 回日本生化学会大会 (2014 年 10 月 15 日~18 日, 京都市)
- (3) 新規がん抑制遺伝子産物 TRB3 は κ B-Ras の SUMO 化を介して Ras(G12V) の発がんシグナルを制御する. 多胡憲治, 多胡めぐみ, 杉山直幸, 伊東広, 柳澤健 第 37 回日本分子生物学会年会 (2014 年 11 月 25 日~27 日, 横浜市)
- (4) IL-33 はがん化型 Ras 変異体が誘導する形質転換とサイクリン D1 の発現に必須の役割を担う. 太田聡, 多胡憲治, 多胡めぐみ, 松儀実広, 柳澤健 第 37 回日本分子生物学会年会 (2014 年 11 月 25 日~27 日, 横浜市)
- (5) 脂肪細胞分化における低分子量 GTP 結合タンパク質 κ B-Ras の役割. 宮崎将太, 山下亮, 多胡めぐみ, 多胡憲治, 柳澤健, 田村悦臣 第 37 回日本分子生物学会年会 (2014 年 11 月 25 日~27 日, 横浜市)
- (6) 新規 IL-33 シグナル調節蛋白質 IFITM3 の同定. 多胡憲治, 多胡めぐみ, 太田聡, 松儀実広, 柳澤健 第 88 回日本生化学会大会・第 38 回日本分子生物学会年会 (2015 年 12 月 1 日~4 日, 神戸市)
- (7) IL-33 前駆体は, がん化型 Ras 変異体が誘導する形質転換とサイクリン D1 の蛋白質合成に必須の役割を担う. 太田聡, 多胡憲治, 多胡めぐみ, 松儀実広, 柳澤健 第 88 回日本生化学会大会・第 38 回日本分子生物学会年会 (2015 年 12 月 1 日~4 日, 神戸市)
- (8) Oncogenic Ras mutant causes the hyper-activation of NF- κ B via enhancement of its transcriptional activation. Kenji Tago, Megumi Funakoshi-Tago, Satoshi Ohta, Hirotohi Kawata, Hisanaga Horie, Junji Yamauchi, Akira Tanaka, Jitsuhiro Matsugi, Ken Yanagisawa 第 89 回日本生化学会大会 (2016 年 9 月 25 日~27 日)
- (9) K-Ras 遺伝子の新しい突然変異は発がん活性を示す. 多胡憲治, 多胡めぐみ, 太田聡, 松儀実広, 柳澤健 第 39 回日本分子生物学会年会 (2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日, 横浜市)
- [図書](計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

多胡 憲治 (TAGO Kenji)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：20306111

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし