

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460359

研究課題名(和文) 腫瘍抑制分子RASSF3・RASSF6の解析

研究課題名(英文) Analysis of tumor suppressors RASSF3 and RASSF6

研究代表者

岩佐 宏晃 (Iwasa, Hiroaki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：70582188

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 association domain family (RASSF) 蛋白質は腫瘍抑制分子と作用を共にすることが知られており、その発現抑制がヒト癌で高頻度に認められている。本研究では、RASSF蛋白質と共に作用する新たな腫瘍抑制分子の存在が明らかになった。また、人為的に前癌状態へと誘導した細胞ではRASSF蛋白質の構造変化を導き、癌化を抑制する作用があることが判明した。このようにRASSFは細胞の誤作動障害(癌化)を防ぐフェイルセーフとして機能すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Ras association domain family (RASSF) cooperates with tumor suppressors. The RASSF tumor suppressor genes are frequently inactivated in many types of human cancer. In this study we found that a novel tumor suppressor acts through RASSF. We also found that a cellular precursor state of tumor changes the structure of RASS protein to suppress tumor formation. Thus we propose that RASSF is a primary fail-safe mechanism of oncogene-driven tumorigenesis.

研究分野：分子生物学

キーワード：シグナル伝達 腫瘍抑制 フェイルセーフ RASSF

## 1. 研究開始当初の背景

(1) Ras association domain family (RASSF) 蛋白質は低分子量 G 蛋白質 Ras のエフェクター分子の一つとして機能すると考えられたが、実際には、予想を超える数の蛋白質と相互作用することによって機能することが分かってきた。例えば、RASSF 蛋白質は腫瘍抑制転写因子 p53 のユビキチンリガーゼである MDM2 と結合し、p53 の蛋白質量を増大させる。また、腫瘍抑制 Hippo シグナルの構成蛋白質 MST2 キナーゼは RASSF 蛋白質と結合し、その活性が制御されている。ヒトがんを目を向けると、RASSF 遺伝子座の多くで不活化されたことによる発現抑制が生じているため、RASSF 遺伝子には多様な腫瘍抑制効果があると予想されていた。

(2) 国内外の多くの研究者は RASSF ファミリーの腫瘍抑制効果を論文等で報告しており、その作用点は腫瘍抑制因子やシグナル伝達経路であることを結論とし、大多数の研究者はこれに異を唱えることなく賛同している。RASSF ファミリーの中でも、国外研究者の間で RASSF1 の研究が先行していたことから、総説などでは RASSF1 が RASSF ファミリーの代表のように紹介されることが多かった。私たちはこれに遅れるものの、RASSF ファミリーである RASSF3 と RASSF6 に着目し、両蛋白質には同様の効果があることを報告してきた。一方、RASSF6 には代表格の RASSF1 とは機能的に差異があることを私たちは世界に先駆けて報告した (Ikeda et al, *Sci. Signal.* 2009)。実際、RASSF 蛋白質のいくつかは RASSF1 様の機能や性状のみで説明しきれるものではなく、RASSF6 のように異なるタイプの RASSF 蛋白質が存在することが報告されるようになった。このことをきっかけに、私たちが行っている RASSF6 の研究は RASSF1 とは異なる独自路線のものとして論文総説で紹介され、RASSF 研究者が集う国際学会では RASSF 蛋白質の新展開として評価されるようになった (RASSF symposia 等)。

## 2. 研究の目的

(1) これまでの研究により、私たちは RASSF6 が細胞死・細胞周期やシグナル伝達経路を制御することを明らかにしてきた。一方で、RASSF6 には互いに関連性がない蛋白質の多くと相互作用することが見出されており、このことは RASSF6 の作用する局面が多岐にわたっていることを示唆していた。例えば、脂質修飾蛋白質シャペロン UNC119A は RASSF6 を bait に用いた酵母ツーハイブリッド法によって当研究室から見出されていたが、この相互作用がどのような生物学的意義をもつかについては不明であった。本研究では、RASSF6 と UNC119A について課題の一つとして解析を行った。

(2) これまでの研究により、私たちは RASSF6

がユビキチンリガーゼである MDM2 と結合し、腫瘍抑制転写因子 p53 の蛋白質量を増大させることを明らかにしてきた。しかし、RASSF6 がどのような作用から MDM2 との親和性を高め、MDM2 の無効化による p53 の増加へと導くかについては不明であった。一方、海外の研究室からは、RASSF6 が低分子 G 蛋白質である K-RAS と相互作用すること、K-RAS のエフェクター分子として腫瘍抑制的に働くことが指摘されていた。本研究は、まず RASSF6 と MDM2 の相互作用様式を解明し、次に K-RAS による相互作用への効果について明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) UNC119A との相互作用については生化学的手法、細胞生物学的手法により検出した。また、UNC119A などの標的となる遺伝子群について過剰発現ならびに遺伝子発現抑制を細胞レベルで行い、細胞死、細胞周期、発現変動などの表現型について生化学的手法、細胞生物学的手法、分子生物学的手法によって解析を行った。加えて、遺伝子改変技術 (CRISPR) による遺伝子改変細胞を作製し、遺伝子発現抑制と併せた遺伝学的解析についても行った。

(2) RASSF6 および MDM2 についてドメインを欠損させた変異蛋白質を発現するプラスミドベクターを多数作製した。全長蛋白質と欠損変異蛋白質、欠損変異蛋白質と欠損変異蛋白質などを組み合わせて細胞に共発現させ、その細胞抽出物を用いた免疫沈降実験を行った。また、p53 の発現誘導やアポトーシスなどの表現型に必要な各ドメインについての解析も行った。さらに、K-RAS が RASSF6 と MDM2 の相互作用にどのような影響を及ぼすかについて同様の解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) 内在性の UNC119A と RASSF6 との相互作用が免疫沈降実験により検出され、また腎臓組織を用いた免疫学的組織染色により、両者の共局在が検出された。この相互作用は発現ベクターを用いた細胞抽出物の免疫沈降実験においても検出された。

(2) RASSF6 による作用が細胞死や細胞周期停止であるというこれまでの観点から、UNC119A も同様の作用があると予想して解析を行った。その結果、UNC119A には、1) アポトーシス誘導の効果がある、2) 細胞周期停止の効果がある、3) 紫外線照射による DNA 損傷後の転写応答に必要である、4) DNA 損傷後の修復応答に必要である、5) その破綻は倍数性染色体を誘起する、などが明らかになった。

(3) RASSF6 が MDM2 を介して p53 を制御していることが示されていることから、UNC119A

も同様の作用があると予想して解析を行った。UNC119A の発現抑制を行うと、1) p53 蛋白質の安定性が減少する、2) 紫外線照射後の p53 の発現上昇が見られない、3) これらの表現型は MDM2 の薬学的、遺伝学的阻害により回復する、などが観察された。逆に、UNC119A の過剰発現を行った場合、p53 の発現上昇が見られた。

(4) K-RAS と RASSF6 との相互作用の観点から、K-RAS が UNC119A-RASSF6-MDM2 のシグナル軸に作用することを予想し、三者の相互作用に対する影響について検証した。その結果、K-RAS は三者の相互作用を増強させることが判明した。一方、UNC119A および RASSF6 も K-RAS を安定化することが明らかとなり、ポジティブフィードバックループの存在が示唆された。以上の結果は、従来では予想されていなかった UNC119A の新機能を見出したと共に、K-RAS の腫瘍効果を打ち消すフェイルセーフ機構を理解する一例となる成果をもたらした。本研究成果は論文投稿の査読中にある。

(5) これまでに私たちは、RASSF6 によって MDM2 が制御されることを報告したが、どのような相互作用様式を示すかについては不明であった。そこで、まず RASSF6 のどのドメインが MDM2 と相互作用するか、あるいはその逆はどうであるかについて解析を行った結果、RASSF6 と MDM2 は単一のドメイン間で相互作用するのではなく、複数のドメインで相互作用することが明らかになった。

(6) RASSF6 のどのドメインが p53 の発現誘導に必要であるかについて解析を行った。その結果、RASSF6 に存在する RAS-association (RA) ドメインが p53 蛋白質の安定性や p53 を介した表現型に重要であることが明らかになった。興味深いことに、RA ドメインは RASSF6 のもう一つの SARAH と呼ばれるドメインと分子内相互作用していて、普段はこの分子内相互作用が MDM2 との分子間相互作用を弱める性質があることが判明した。

(7) K-RAS と RASSF6 との相互作用が RA ドメインを介して行われることから、K-RAS が RA-SARAH 分子内相互作用に何らかの影響を及ぼすことが予想された。この予想的中し、RASSF6 の分子内相互作用による MDM2 との低親和性は K-RAS によって高親和性へと変化することが明らかになった。K-RAS が RASSF6 の蛋白質高次構造に作用し、MDM2 への親和性が高い構造に変換したことが推察される。以上の結果は、K-RAS が複雑な分子内・分子間相互作用に作用することを示すものであり、従来の低分子 G 蛋白質の機能からは予想し得なかった機能を提唱するものである。本研究の成果は FEBS Letter 誌で 2017 年に論文発表された。

## 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6件)

Sarkar A, Iwasa H, Hossain S, Xu X, Sawada T, Shimizu T, Maruyama J, Arimoto-Matsuzaki K, Hata Y. Domain analysis of Ras-association domain family member 6 upon interaction with MDM2. FEBS Lett. 591, 260-272. 2017 doi: 10.1002/1873-3468.12551. 査読有

Nagashima S, Maruyama J, Kawano S, Iwasa H, Nakagawa K, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Nishina H, Hata Y. Validation of the chemical compound library screening for TAZ inhibitors by use of green fluorescence protein-fused TAZ. Cancer Sci. 107, 791-802. 2016 doi: 10.1111/cas.12936. 査読有

Iwasa H, Jiang X, Hata Y. RASSF6; the Putative Tumor Suppressor of the RASSF Family. Cancers (Basel). 9, 2415-2426. 2015 doi: 10.3390/cancers7040899. 査読有

Kodaka M, Yang Z, Nakagawa K, Maruyama J, Xu X, Sarkar A, Ichimura A, Nasu Y, Ozawa T, Iwasa H, Ishigami-Yuasa M, Ito S, Kagechika H, Hata Y. A new cell-based assay to evaluate myogenesis in mouse myoblast C2C12 cells. Exp Cell Res. 336, 171-181. 2015 doi: 10.1016/j.yexcr.2015.06.015. 査読有

Kawano S, Maruyama J, Nagashima S, Inami K, Qiu W, Iwasa H, Nakagawa K, Ishigami-Yuasa M, Kagechika H, Nishina H, Hata Y. A cell-based screening for TAZ activators identifies ethacridine, a widely used antiseptic and abortifacient, as a compound that promotes dephosphorylation of TAZ and inhibits adipogenesis in C3H10T1/2 cells. J Biochem. 158, 413-423. 2015 doi: 10.1093/jb/mvv051. 査読有

Nagashima S, Kodaka M, Iwasa H, Hata Y. MAGI2/S-SCAM outside brain. J. Biochem. 157, 177-184. 2015 doi: 10.1093/jb/mvv009. 査読有

[学会発表](計2件)

丸山順一、江欣亮、岩佐宏晃、湯浅 石上磨里、影近弘之、仁科博史、畑裕 新規に同定した YAP1 活性化化合物は多発性骨髄腫において YAP1-p73 経路依存的な細胞死を誘導する 日本分子生物学会・日本生化学会合同大会 2016 年 12 月 1 日 横浜パシフィコ(神奈川県横浜市)

岩佐宏晃、清水尊仁、畑裕 UNC119A は腫瘍抑制分子 RASSF6 と共に DNA 損傷応答を制御する 日本分子生物学会・日本生化学会合同

大会 2015年12月1日 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

〔図書〕(計1件)

畑裕編集、岩佐宏晃等 医歯薬出版 別冊・  
医学のあゆみ 2015年10月 136

〔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/mbc/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩佐 宏晃 (Iwasa Hiroaki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・助教

研究者番号：70582188

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

丸山 順一 (Maruyama Junichi)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究  
科・助教

研究者番号：30723639

### (4) 研究協力者