

分子腫瘍学研究室

Molecular Oncology Laboratory

主任研究員 土肥 義治
DOI, Yoshiharu

当研究室は、高等動物に特徴的な細胞死（アポトーシス）の情報伝達機構に関与する分子を組換え DNA 技術を用いて単離・同定することにより、がん細胞の細胞死回避のメカニズムの基礎的研究を総合的に行っている。特に TNF/NGF 受容体ファミリーに結合するタンパク質の生理学および生化学的機能解析を通して、それらの受容体を介した情報伝達機構の解明を目指している。また、抗がん剤等に耐性になったがん細胞に特異的な細胞死を誘導する基礎的研究の試みも行っている。

なお、当研究室の主任研究員は 9 月 30 日までは佐藤孝明が、10 月 1 日付けで土肥義治が就任（兼務）した。

1. TNF/NGF 受容体ファミリーの情報伝達機構の研究 （入江、永吉、灘野、水野^{*1}、中井^{*1}、星野^{*1}、木村（真）^{*2}）

（1）神経細胞死誘導に関与する遺伝子の機能解析

低親和性神経成長因子受容体である p75NTR を介して NGF により惹起されるシグナル伝達は神経系細胞の生存維持とアポトーシス誘導の両方向について知られている。我々はこの p75NTR によるアポトーシス誘導機構を解明するため、p75NTR の細胞質内領域に結合するタンパク質 NADE (p75NTR-associated-cell death executor) を同定している。NADE による細胞死誘導機構を明らかにするため、他の NADE に結合するパートナー分子のスクリーニングを行ったところ、細胞内シグナル伝達分子である 14-3-3 や JNK 活性化に関与する NIK (Nck interacting kinase)、翻訳開始複合体においてリボゾームが mRNA にエンターする際に重要とされる分子 eIF4G 等が得られた。

アミノ酸 208-255 欠失させた 14-3-3 は NGF によって誘導される p75NTR/NADE を介したアポトーシスを抑制することから、14-3-3 が p75NTR/NADE を介したアポトーシスの調節に関与することが示唆された。また NADE 分子の構造機能解析により、pro-apoptotic domain、アポトーシスの NGF 誘導能に関与する調節領域、NF- κ B 活性化の抑制に関わる領域等を同定した。さらに、NADE の生体内における役割を解析するため、NADE を過剰に発現するトランスジェニックマウスの作製を試みている。

（2）特定タンパク質のリン酸化と細胞死抑制機構解明

細胞死（アポトーシス）は、個体の発生・分化、免疫系の調節や生体の恒常性維持に関与する重要な生命現象である。細胞死は遺伝子にプログラムされた機構であり、細胞死のシグナルが核内に伝達されることによって引き起こされる。リン酸化を始めとしたタンパク質の翻訳後修飾と、シグナル伝達には密接な関係があり、がん細胞のアポトーシス回避機構の解明に特定タンパク質のリン酸化・脱リン酸化の解析は非常に重要であると考えられる。Fas は TNFR/NGFR スーパーファミリーに属し、細胞死誘導シグナルを細胞内に伝達する受容体タンパク質である。FAP-1 (Fas-associated phosphatase-1) は、Fas の細胞質領域の C 末端部分に結合

する分子量 250 kD のタンパク質チロシン脱リン酸化酵素として単離された FAP-1 は、Fas を介した細胞死誘導シグナルに対し抑制的に働くことが報告されているが、FAP-1 の作用機構は未だ明らかとなっていない。我々は *in vitro* dephosphorylation および substrate trapping 法によって I κ B α が FAP-1 の基質であることを確認しているが、さらに、*in vitro* dephosphorylation の後、二次元電気泳動を行い、抗ホスホチロシン抗体によって消失するスポットのタンパク質一次構造解析によって、SCF ubiquitin ligase complex に会合するタンパク質として発見された SGT1 を新たな基質候補として同定した。一方、Fas/FAP-1 相互作用の生体内における役割を解析するため、FAP-1 が結合するヒト型 Fas の遺伝子を過剰に発現するトランスジェニックマウスの作製を試みている。

（3）CD40 受容体を介した細胞死関連タンパク質の単離同定

Tumor Necrosis Factor Associate Factor 3 (TRAF3) は、TNF/NGF レセプタースーパーファミリーに属し B 細胞活性化、分化等に重要な働きをする CD40 の細胞質領域に結合する分子として我々が単離したアダプタータンパク質であるが、他の TRAF ファミリーに比べ TRAF3 を介する情報伝達経路に関する知見は乏しい。TNF/NGF レセプタースーパーファミリーを介したアポトーシスの情報伝達系解明のため、TRAF3 情報伝達経路における新しい情報伝達分子を単離・同定することを目的に新規酵母内タンパク質間相互作用検出系を用いることにより、CD40 を介した細胞情報伝達系を有するマウス未熟 B 細胞様細胞株 WEHI231 由来の cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、B 細胞特異的に発現し、推定上膜貫通領域を含むアミノ酸 175 残基をコードする新規な分子を同定した。293T 細胞に強制発現させた本分子は細胞表面に分布し、細胞の形態を変化させるとともに F-アクチンを蓄積させた。また、TRAF3 との共発現により TRAF3 の peri-nuclear 領域での局在が細胞膜へ移行したことから、本分子の B 細胞における TRAF3 情報伝達経路への関与が示唆される。

2. 乳がん・卵巣がんの発生・進展に関与するがん遺伝

子・がん抑制遺伝子の解析 (入江, 永吉, 灘野, 吉仲^{*1}, 野津^{*1})

(1) RPL29 の多型分析と乳がんにおける遺伝子変異

リボゾームタンパク質 L29 遺伝子のリジルアラニンリピート (3, 4, 5) の違いは, リジンがポジティブチャージをもつアミノ酸であることから, 相互作用するタンパク質との結合性の変化によって重要な表現型に結び付く可能性が高いと考えられる。L29 遺伝子のリジルアラニンリピートは NCBIEST データベースにもリピート数が異なるクローンが含まれることを確認したが, ラット, マウス由来の L29 遺伝子にはこのリジルアラニンリピートは存在しない。そこで, ゲノム DNA でのリジルアラニンリピート数を把握するため, ヒトリボゾームタンパク質 L29 遺伝子のイントロン, エクソンのジャンクションを決定後, ゲノム DNA でのリジルアラニンリピート数の検出条件を PCR とダイレクトシーケンスにより設定した。p53 野生型のヒトがん細胞株と肺がん, 乳がんのヒト腫瘍組織サンプルにおけるヒトリボゾームタンパク質 L29 遺伝子のリジルアラニンリピート数を解析した結果, 高頻度に 3, 4, 5 の 3 種類の異なる長さのリピートが認められたものの, 組織サンプルでのリピート数は同一患者の正常組織と腫瘍組織で同一であり, がんとリピート数に相関関係は認められなかった。また, 異常なトリプレットリピートの伸長は遺伝性神経筋疾患の原因の 1 つであると報告されているが, L29 遺伝子には 3, 4, 5 以外の異常に伸長したリジルアラニンリピートは検出されなかった。

3. リボゾーム工学の構築と生物の潜在能力開発 (入江, 永吉, 灘野, 永瀬^{*1}, 野津^{*1}, 吉仲^{*1}, 星野^{*1}, 青木^{*1}, 飛田^{*1}, 瀧澤^{*1}, 木村 (美)^{*1}, 五十嵐^{*1})

(1) アポトーシスにおけるリボゾームサブユニットおよびタンパク質の特性解析

我々は, 細胞死受容体刺激によって起こるアポトーシス (Fas を刺激したヒト Jurkat 細胞および腫瘍壊死因子受容体を刺激したヒト U937 細胞) において 28S リボゾーム RNA が特異的に分解されることを見いだすとともに, この分解はタンパク質合成阻害を介して細胞死を促進させる可能性を示した。今年度はアポトーシスにおけるリボゾームサブユニットとリボゾームタンパク質の解析を行った。解析対象のアポトーシスとして上記 2 つの系にスタウロスポリンで刺激したヒト MCF-7 細胞および紫外線を照射したヒト 293T 細胞を加えた。リボゾームサブユニットの解析はポリアクリルアミド-アガロース複合ゲル電気泳動法により行った。本法を用いた解析ではリボゾームサブユニットの変化は見いだされなかったことから, リボゾーム RNA の断片化を含むアポトーシスの執行過程においてリボゾームは断片化や顕著なコンフォメーションの変化を起こさないことが示唆された。アポトーシスにおけるリボゾームタンパク質については 21 種類の同タンパク質に対する抗体を用いた免疫プロテイング法によって解析した。この解析によりアポトーシスを起こした乳がん細胞株 MCF-7 細胞において S11 タンパク質の発現が特異的に down-regulation される知見が得られた。S11 の down-regulation はスタウロスポリンで刺激した他の乳がん細胞株においても認められた。昨年度我々は S11 の発現量ががん細胞間で変動することを

示したが, 今回の知見と併せて, S11 は特定の細胞内環境下においてその発現量が大きく変動するという特性を有していると考えられる。一方, アポトーシスにおけるリボゾームタンパク質の変化を網羅的に解析するため, *in vitro* 転写・翻訳系を利用してすべてのヒトリボゾームタンパク質を調製し, これらがアポトーシスの執行役である caspase-3 および caspase-6 の基質として機能しうるか否かを検討している。

(2) リボゾームタンパク質の網羅的解析 (リボソミクス) のためのツール (特異抗体および GST 融合タンパク質) の調製とその応用

タンパク質生合成におけるリボゾームの役割については多くの基礎生物学的研究がなされてきたが, リボゾームにおける個々のリボゾームタンパク質の役割については不明な点が多い。さらに最近, 特定のリボゾームタンパク質と遺伝病およびがんとの関連が指摘されリボゾームタンパク質の新しい機能の存在が示唆されている。我々はヒトリボゾームおよびその構成成分の網羅的研究をリボソミクス (ribosomics) と命名し取り組んでいる。この一環としてすべてのヒトリボゾームタンパク質に対する特異抗体の作製を目標に昨年度までに 26 種類のタンパク質に対するウサギ抗体を得た。今回, 新たな抗体を得るためニワトリを免疫源としてリボゾームタンパク質に対する抗体の作製を検討した。即ち, コンピューター解析により抗原として適当と推定されたそれぞれのリボゾームタンパク質 (計 10 種類) のペプチド配列を化学合成し, ヘモシアニン (KLH) に結合し, これをメスのニワトリに免疫した。このニワトリの卵黄から精製された抗体 (IgY) について酵素免疫定量法およびラットリボゾーム等を用いたイムノブロティングによって反応性を調べた。その結果精製リボゾームに反応する新しい抗体 3 種類 (抗 S3a, 抗 S19 および抗 L10a) を得た。このうち 2 種類 (抗 S3a および抗 L10a) は細胞溶解液中の抗原タンパク質とも特異的に反応した。これらの抗体はたとえば別項のアポトーシスにおけるリボゾームタンパク質の解析等に應用されている。また我々は個々のリボゾームタンパク質の未知の extraribosomal function を網羅的に解明するため, 昨年 pGEX にサブクローニングしたすべてのリボゾームタンパク質の cDNA を利用して, 77 種類のリボゾームタンパク質について GST 融合タンパク質として大腸菌内に発現させ精製を行った。現在各 GST 融合タンパク質を用いて各リボゾームタンパク質の自己リン酸化活性をスクリーニング中である。

(3) リボゾームタンパク質を過剰発現させたトランスジェニックマウスの作製

リボゾームタンパク質ならびにリボゾーム関連タンパク質の生体内における役割を検索し, かつ明快に示すため, これらのタンパク質の遺伝子を過剰に発現したトランスジェニックマウスの作製を試みた。解析対象としてヒトリボゾームタンパク質 Sa (培養細胞において過剰発現によって細胞周期制御活性とアポトーシス促進活性が示された), ヒトリボゾームタンパク質 L29 gene 1 (多型が存在することを見いだした), および gene 2 (我々の研究より新たに見いだされた遺伝子) を選択し, 全組織における過剰発現を目的としてそれぞれのタンパク質 (野生型) の全長を含む cDNA を β -アクトチンプロモーターでドライブする発現用カセット

に組み込んだ。各 cDNA を含む発現用カセットは C57BL/6 の受精卵に注入した後、仮親に移した。産子の尾 DNA を PCR を利用して遺伝子型解析することにより上記の遺伝子が組み込まれたマウスを選択することに成功した。今後、この遺伝子が子孫に遺伝すること、および組織において遺伝子産物が過剰発現することを確認し、各遺伝子の過剰発現に伴う表現系を解析する予定である。

(4) リボゾームタンパク発現プロファイリングによる extraribosomal function をもつリボゾームタンパク質のスクリーニング

がんの発生、正常発生および突然変異体の発生過程におけるリボゾームタンパク質の関与を同定するために、extraribosomal function を有するリボゾームタンパクのマウスでのスクリーニングを検討した。マウス発がんモデルにおける多段階発がんの各過程での背景遺伝子としてのリボゾーム遺伝子の影響を調べるため、発がん修飾遺伝子座とリボゾームタンパクのマップの比較を行いながら候補となるリボゾームタンパクを確認した。さらに発がん過程に関与する遺伝子をスクリーニングするため、マウス皮膚がんモデルより得られた正常ケラチノサイトを含む各段階の培養細胞を樹立し、この細胞間でマウス遺伝子の発現量の差をスクリーニングした。即ち発現量の少ない遺伝子の On-Off を検索する目的でのサブトラクション法、および絶対値で定量化し発現量が検出可能な Affymetrix array を用いたスクリーニングを試みた。またがん発生に加え、正常発生については、組織特異的に胎生時期の器官形成期に発現量が変わる遺伝子および変異個体として発生するマウス胎児の奇形器官発生で正常器官発生と異なる遺伝子発現量を示す遺伝子のスクリーニングをも実施した。正常発生においては胎生 13 週と 15 週の比較で乳腺については S5, S10, L41, S12, S16 タンパク質、顎下腺については L35a, L7, L32 タンパク質の発現変化が認められ、重粒子線を用いた変異導入により作製した神経系の発達遅延マウスで S3, S5, S28, L3, L6, L10a の発現抑制が認められた。このような発生、発達、がん発生過程等で発現量が変化するリボゾームタンパク質には、その表現型の変化に直接あるいは間接的な影響を与えているものが含まれている可能性があると考えられる。さらにスクリーニングして行く中で extraribosomal function を持つと予想される候補リボゾームタンパクを同定し詳細なタンパク機能を解明して行くと同時に、候補が同定された時点で表現型としての発生過程等がすでに分かっていることから、発生過程などの系を直接利用した詳細な検討も実施して行く。

*1 研究協力員, *2 研修生

誌 上 発 表 Publications

(原著論文) *印は査読制度がある論文誌

Maruyama W., Irie S., and Sato T.: "Morphological changes in the nucleus and actin cytoskeleton in the process of Fas-induced apoptosis in Jurkat cells", *Histochem. J.* **32**, 495-503 (2000). *

Sato T. and Nadano D.: "Caspase-3-dependent and -independent degradation of 28S ribosomal RNA may be involved in the inhibition of protein synthesis during

apoptosis initiated by death receptor engagement", *J. Biol. Chem.* **275**, 13967-13973 (2000). *

Mukai J., Hachiya T., Hoshino S., Kimura M., Nadano D., Suvanto P., Hanaoka T., Li Y., Irie S., Greene L., and Sato T.: "NADE, a p75NTR-associated cell death executor, is involved in signal transduction mediated by the common neurotrophin receptor p75NTR", *J. Biol. Chem.* **275**, 17566-17570 (2000). *

口 頭 発 表 Oral Presentations

(国際会議等)

Kusakabe M., Yoshiki A., Hiraiwa N., Ike F., Yoshida-Noro C., Nagase H., and Yano Y.: "A novel strategy for mutagenesis in the mouse: Heavy ion beams and fetal phenotype screening: I. An overview", 14th Int. Mouse Genome Conf. (IMGC 2000), (RIKEN and others), Narita, Nov. (2000).

Yoshiki A., Yoshida-Noro C., Nagase H., Hiraiwa N., Kogiso A., Masuda T., and Kusakabe M.: "A novel strategy for mutagenesis in the mouse: Heavy ion beams and fetal phenotype screening: II. Production and screening", 14th Int. Mouse Genome Conf. (IMGC 2000), (RIKEN and others), Narita, Nov. (2000).

Yoshida-Noro C., Nagase H., Yoshiki A., and Kusakabe M.: "A novel strategy for mutagenesis in the mouse: Heavy ion beams and fetal phenotype screening: III. Expression profiling in the mutant tissues", 14th Int. Mouse Genome Conf. (IMGC 2000), (RIKEN and others), Narita, Nov. (2000).

(国内会議)

灘野大太, 青木智景, 吉仲桃子, 星野志咲子, 入江新司, 佐藤孝明: "すべてのヒトリボソームタンパク質に対する抗体の系統的作成: ヒトガン細胞株における S11 および S30 の発現量の変動", 第 59 回日本癌学会総会, 横浜, 10 月 (2000).

永瀬浩喜: "マウス皮膚癌モデルを用いた癌モディファイア遺伝子座間の遺伝的インターアクションの同定", 第 59 回日本癌学会総会, 横浜, 10 月 (2000).

永瀬浩喜: "発がんにおける遺伝的素因: マウスモデルを用いたアプローチ", 第 59 回日本癌学会総会, 横浜, 10 月 (2000).

佐藤孝明, 向井淳, 木村真, 星野志咲子, 灘野大太, 入江新司, 佐藤孝明, 向井淳, 木村真, 星野志咲子, 灘野大太, 入江新司: "神経成長因子 (p-75 NTR) を介したアポトーシス誘導機構の解析", 第 73 回日本生化学会大会, 横浜, 10 月 (2000).

野呂 (吉田) 知加子, 吉木淳, 永瀬浩喜, 平岩典子, 池郁生, 日下部守昭: "重イオンビームを用いた新しい変異マウス作製および解析システム", 第 23 回日本分子生物学会年会, 神戸, 12 月 (2000).

Research Subjects and Members of Molecular Oncology Laboratory

1. Investigation of Mechanisms of TNF/NGF Receptor-Mediated Signal Transduction
2. Investigation of Oncogenes and Tumor Suppressor Genes Responsible for Primary Breast and Ovarian Cancers
3. Ribosome Engineering and Development of Its Potential Function in Mammalian Cells

Head

Dr. Yoshiharu DOI

Members

Ms. Mariko NAGAYOAH
Dr. Shinji IRIE
Dr. Daita NADANO
Ms. Chikage AOKI*

Mr. Jun IGARASHI*
Ms. Mika KIMURA*
Ms. Kaoru TAKIZAWA*
Dr. Yuji NAKAI*
Dr. Hiroki NAGASE*
Ms. Tomomi NOTSU*
Ms. Shisako HOSHINO*
Mr. Takayuki HIDA*
Dr. Kouichi MIZUNO*
Dr. Toko YOSHINAKA*
Ms. Naomi FURUYA*

* Contract Researcher

Visiting Members

Dr. Jun MUKAI (Columbia Univ., USA)

Trainees

Makoto KIMURA (Dept. Med., Tottori Univ.)