

様 式 F - 7 - 1

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成 23 年度）

1. 機関番号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学
3. 研究種目名 基盤研究(C) 4. 補助事業期間 平成 23 年度 ~ 平成 25 年度

5. 課題番号

2	3	5	7	0	1	6	6
---	---	---	---	---	---	---	---

6. 研究課題 核内に局在して発がんシグナルを制御する新規低分子量 G 蛋白質の機能解析

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
2 0 3 0 6 1 1 1	タゴ ケンジ 多胡 憲治	バイオサイエンス研究科	助教

8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

正常細胞ががん化する過程における、シグナル伝達系はこれまで多くの研究者によって研究されており、例えば低分子量GTP結合タンパク質（低分子量G蛋白質）Rasによる細胞の増殖、生存シグナルの活性化などが明らかにされている。B-Rasは転写因子NF- κ Bを阻害するRasファミリーの一つとして同定された。これまでに私達は B-Rasが、核と細胞質の間を行き来する蛋白質であることを見出し、NF- κ Bの活性化シグナルにおいて、転写活性化に重要なp300/CBPとNF- κ Bとの結合を B-Rasが抑制する阻害メカニズムを明らかにしてきた。さらに最近、私達は B-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促進的な役割を担っていることを見出した。興味深いことにこのとき、B-RasはGTP結合型である必要があり、GDP結合型 B-Rasは発がんシグナルに対して促進的な効果を示さないことも明らかになった。また、B-Rasを介した発がんシグナルを明らかにするため、私達はTAP法 (Tandem Affinity Purification 法) を用いて、B-Rasの蛋白質複合体を精製し、質量分析法により B-Ras結合分子を同定した。その結果、TRB3、SmgGDS (Rap1GDS) およびDDB1を同定した。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。B-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。

10. キーワード

(1) シグナル伝達系	(2)	(3)	(4)
(5)	(6)	(7)	(8)

11. 現在までの達成度

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

本研究の申請時に同定された B-Ras結合タンパク質のうち、STK38およびANKRD6に関しては B-Rasとの相互作用を確認することができなかった。しかしながら、その後の B-Rasタンパク質複合体から新たに同定されたTRB3、DDB1については B-Rasとの相互作用が確認された上、Ras (G12V) によるマウス線維芽細胞の形質転換に深く関わっていることも明らかにされてきた。また、現在解析を進めている B-Ras結合分子であるsmgGDS、TRB3、DDB1についてはレトロウイルスを用いた発現系により過剰発現および、shRNAを用いたノックダウン系の構築が完了している。以上のことから、現在まで本研究は概ね計画通りに進行していると言える。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

これまでに、B-RasがRas (G12V) 発現細胞の形質転換に必須であることは明らかになったが、その分子機構は不明な点が多い。今回、Ras (G12V) によるマウス線維芽細胞の形質転換に影響を与えるTRB3とDDB1について B-Rasとの機能的な関連性を明らかにすることにより、B-Rasがどのように発がんシグナルに関わっているのかを明らかにしていくことを計画している。また、smgGDS、TRB3、DDB1以外にも同定された B-Ras結合タンパク質の中に、発がんとの関わりが指摘されるRNA結合タンパク質も含まれており、それらの機能解析を網羅的に進めることにより、Ras (G12V)- B-Rasシグナルの発がん誘導機構の全貌を紐解いていく予定である。さらに、既に樹立されているヒト由来腫瘍細胞株とくにRas遺伝子に変異を有するものに関して、B-Rasの関与を明らかにすることをめざし、解析を行う予定である。

(次年度の研究費の使用計画)

次年度は、各種 B-Ras結合タンパク質を過剰発現、あるいはノックダウンした細胞株を樹立し、シグナル伝達機構の解析を行う。さらにこれらの細胞株を用いて軟寒天培地を用いたコロニー形成アッセイを行い、各種 B-Ras結合タンパク質の発がんシグナルへの関与を明らかにする。また、これらの解析が順調に進行した場合には、ヌードマウスを用いた生体内における腫瘍形成能の評価を計画している。これらを考慮し、分子生物学的試薬代として30万円、動物購入・飼育代として30万円を使用することを計画している。また、同定分子の特異的抗体の購入のために、一般試薬代として30万円を使用することを計画している。解析にはすべて培養細胞を用いるため、プラスチック器具代および細胞培養用試薬代として40万円を使用する予定である。

13.研究発表(平成23年度の研究成果)

〔雑誌論文〕計(5)件 うち査読付論文 計(0)件

著者名		論文標題			
Toriyama M, Mizuno N, Fukami T, Iguchi T, Toriyama M, Tago K, Itoh H.		Phosphorylation of doublecortin by protein kinase a orchestrates microtubule and actin dynamics to promote neuronal progenitor cell migration.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
J Biol Chem.	無	287 (16)	2 0 1 2	12691-12702	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
10.1074/jbc.M111.316307					

著者名		論文標題			
Sumi K, Tago K, Kasahara T, Funakoshi-Tago M		Aurora kinase A critically contributes to the resistance to anti-cancer drug cisplatin in JAK2 V617F mutant-induced transformed cells.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
FEBS Lett.	無	585 (12)	2 0 1 1	1884-1890	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
http://dx.doi.org/10.1016/j.febslet.2011.04.068					

著者名		論文標題			
Funakoshi-Tago M, Nakamura K, Tago K, Mashino T, Kasahara T		Anti-inflammatory activity of structurally related flavonoids, Apigenin, Luteolin and Fisetin.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
Int Immunopharmacol.	無	11 (9)	2 0 1 1	1150-1159	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					
http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2011.03.012					

著者名	論文標題			
Kamishimoto J, Tago K, Kasahara T, Funakoshi-Tago M.	Akt activation through the phosphorylation of erythropoietin receptor at tyrosine 479 is required for myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant-induced cellular transformation.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Cell Signal.	無	23 (5)	2 0 1 1	849-856
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)				
http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2011.01.009				

著者名	論文標題			
Funakoshi-Tago M, Tago K, Sato Y, Tominaga S, Kasahara T.	JAK2 is an important signal transducer in IL-33-induced NF- κ B activation.			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁
Cell Signal.	無	23 (2)	2 0 1 1	363-370
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)				
http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.10.006				

(学会発表) 計(2)件 うち招待講演 計(0)件

発表者名	発表標題	
多胡憲治, 多胡めぐみ, Susanna Chiocca, 水野憲一, 伊東広	Gタンパク質シグナルにより制御されるSUMO化とその分子機構の解析	
学会等名	発表年月日	発表場所
第84回日本生化学会大会	2011年9月24日	京都国際会議場

発表者名	発表標題	
多胡憲治, 多胡めぐみ, 深尾陽一, 杉山直幸, 富田勝, 水野憲一, 伊東広	Functional involvement of an atypical nuclear-cytoplasmic small GTPase B-Ras in oncogenic signaling pathway	
学会等名	発表年月日	発表場所
第34回日本分子生物学会年会	2011年12月16日	パシフィコ横浜

〔図書〕計(0)件

著者名	出版社			
書名			発行年	総ページ数
			年 月 日	

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出願〕計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

〔取得〕計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15. 備考

--