

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成31年 4月 9日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 北海道大学大学院医学研究院  
職 名 助教  
研究代表者 築山 忠維

下記のとおり平成30年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号: 18014 )

1. 共同研究課題名	Wnt シグナルが恒常性維持に果たす役割のゼブラフィッシュモデルを用いた解明			
2. 共同研究目的	Wnt シグナルは形態形成だけでなく、幹細胞維持や代謝調節などを介した成体の恒常性に深く関与していることが知られている。また、この生体調節機構が破綻すると恒常性が失われ、がんをはじめとする様々な疾患を引き起こして死に至ることも知られている。本研究申請では Wnt シグナルの調節機構が、どのように恒常性維持メカニズムへ関与しているかゼブラフィッシュモデルを用いて解明することを目的とし、その結果生体の調節機構を明らかにするだけでなく、疾患発症機構の理解と診断治療への応用を目的とする。			
3. 共同研究期間	平成30年 4月 1日 ~ 平成31年 3月31日			
4. 共同研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 築山 忠維	北海道大学大学院医学 研究院医化学教室	助教	研究の総括・実験・解析全般	
(分担研究者)				
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	個体統御システム	氏 名	石谷 太

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

## 6. 共同研究計画

申請者はこれまでに、膜型ユビキチンリガーゼである RNF43 が Wnt シグナルを負に制御していることを報告した(Tsukiyama et al., MCB 2015)。RNF43 は幹細胞特異的に発現するユビキチンリガーゼであり、その機能は Wnt 受容体である Fzd のユビキチン化依存的エンドサイトーシスによる分解である。実際、RNF43 とそのホモログである ZNRF3 をノックアウトすると、マウス腸管における幹細胞領域の著明な拡大が認められる。またがん患者において RNF43 の遺伝子変異が高頻度に同定されており、その変異は Ras 変異と相関関係にある。これらの研究により、RNF43 は幹細胞で Wnt シグナルを抑制することにより幹細胞の分化増殖を維持しており、またその調節メカニズムの破綻によりがんが発症することが明らかになった。最近申請者らは、RNF43 による Wnt シグナル調節が RNF43 自身の発現調節に加え、RNF43 の翻訳後修飾によって行われていることを見出した。現在は、貴研究所の石谷太教授との共同研究により、ゼブラフィッシュモデルを用いて RNF43 の翻訳後修飾が Wnt シグナル調節に関与することを検討する計画であった。

## 7. 共同研究の成果

本共同研究では、RNF43 のユビキチン化活性がリン酸化により厳密に調節されていること、このリン酸化は 4 つのセリン残基に段階的に起こること、Wnt シグナルレポーターアッセイ、フローサイトメトリー、正リン酸ラベルによる生化学的手法、質量分析器を用いた解析により明らかにした。また Wnt シグナル活性が RNF43 のリン酸化によりファインチューニングされていることを、Wnt レポーターゼブラフィッシュモデルとマウス腸管オルガノイドを用いて検討した。その結果、ゼブラフィッシュの体軸伸長において、また同時に腸管幹細胞の自己複製による長期的な腸管恒常性維持において、RNF43 のリン酸化スイッチがオフになる必要があることが示された。この Wnt レポーターゼブラフィッシュによる RNF43 の機能検討実験は、群馬大学生体調節研究所・石谷太教授によって行われた。この RNF43 のリン酸化を受けるセリンは、多種の動物間において、さらに同種内においてはそのホモログである ZNRF3 においても高度に保存されていた。

また、RNF43 は p53 経路の下流を抑制すること、その抑制には RNF43 のリン酸化状態は関与しないとことを明らかにした。さらに包括的なデータベース解析の結果、がん患者における RNF43 の遺伝子変異は APC の変異と同様に p53 の変異と相互排他的であること、p53 変異を持つがん患者の予後を悪化させなかったことから、RNF43 は Wnt シグナルと p53 シグナルの両方の上流に位置し、がん抑制遺伝子として 2 つの独立した機能を持つことを明らかにした。

これらの結果より、RNF43 に遺伝子変異が起こること、その変異と Ras の活性化変異がリンクすることによって、古くから知られる腸管上皮の多段階発がんモデルにおいて、RNF43 と Ras の 2 つの変異のみで発がんに必要な 3 つのステップ、1. Wnt シグナルの異常活性化、2. Ras の活性化、3. p53 の不活性化の 3 段階を満たすことが示唆された。そこでスフェロイド形成アッセイ、コロニー形成アッセイ、マウスへの細胞移植実験により実際に予想通り RNF43-Ras 変異が発がんを司っていることを証明した。

この結果は、石谷教授を共著者、共同研究先を群馬大学生体調節研究所と記載し、現在は Nature Communications 誌に修正投稿中である。

## 8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

### ①本研究所の担当教員の氏名の記載のある論文

現在、修正投稿中 (Nature Communications 誌)

### ②この共同研究に基づくとの記載のある論文

現在、修正投稿中 (Nature Communications 誌)