

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570184
 研究課題名（和文）抗がん遺伝子産物 START-GAP ファミリーの構造と機能

研究課題名（英文）Structure and function relationships of the anti-oncogenic START-GAP family gene products

研究代表者
 八木澤 仁 (HITOSHI YAGISAWA)
 兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・准教授
 研究者番号：40192380

研究成果の概要： 哺乳動物には、START ドメインを持つ Rho ファミリー低分子量 G タンパク質に対する GTP アーゼ活性化タンパク質 (START-GAP) をコードする遺伝子が 3 つ存在し、これらの遺伝子産物の抗腫瘍活性が注目されている。それぞれの生化学・細胞生物学的性質を比較解析したところ、START-GAP の接着斑への局在化が細胞運動性や形態維持に重要な役割を果たしていることが判明した。また、局在化に必要な領域を同定し、その分子機構の一部を解明した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

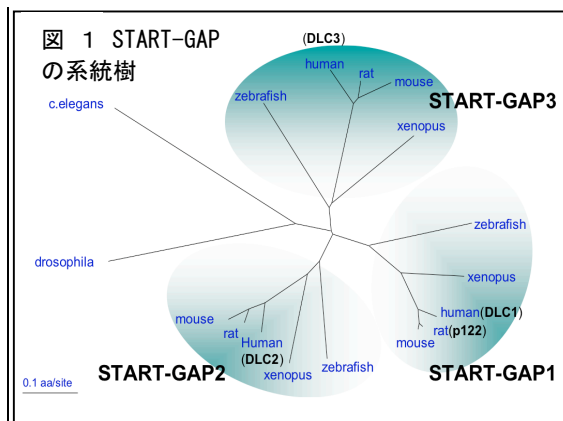
研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：シグナル伝達、細胞骨格・運動、抗がん遺伝子

1. 研究開始当初の背景

ヒト染色体上には、GAP (GTPase 活性化タンパク質) ドメインの C 末端側にセラミドやコレステロール結合タンパクに存在する *steroidogenic acute regulatory-related lipid transfer* (START) ドメインを含む、相同性のある分子量約 12 万のタンパク質をコードする 3 つの遺伝子が存在する [図 1]。これらは哺乳動物に共通しており、機能と構造的特徴とから、我々はこれらの遺伝子産物を START-GAP と呼んでいる。ヒトの場合、START-GAP をコードする遺伝子は、8 番染色体に存在する *DLC* (*deleted in liver cancer*) 1



(human *START-GAP1*)と 13 番染色体の *DLC2* (human *START-GAP2*)である。これらは、逆遺伝学的解析などにより、肝がんや乳がんなど、転移をともなうがんの一部で欠失あるいは不活化されている抗腫瘍遺伝子として同定され、実際に一部のがん細胞の増殖や転移を抑えることが細胞培養系や動物実験で判明している。*DLC1*のラットオルソログは、ホスホリパーゼ C(PLC) δ_1 結合タンパク質として我々の研究協力者である本間好博士(福島県立医大)がクローニングした p122RhoGAP である。本研究開始とほぼ同時期に、我々と米国の Popescu らは、X 染色体にも *START-GAP* をコードする遺伝子 (*DLC-3* あるいは human *START-GAP3*) が存在することを見いだした。しかし、当初 *START-GAP3/DLC3* の生化学的性質や細胞内分布は不明であった。

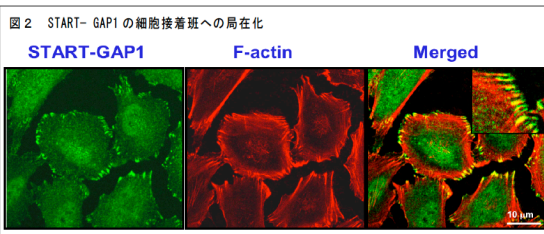
2. 研究の目的

本研究は *START-GAP/DLC* 遺伝子産物ファミリーの構造と機能を比較解析することにより、細胞のがん化および発生におけるこれらのタンパク質の役割を解析しようとするものである。

3. 研究の方法

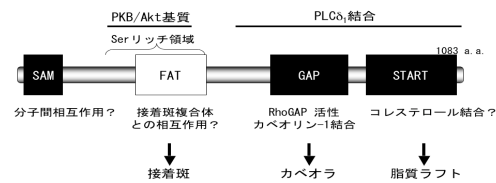
(1) *START-GAP1* の接着斑局在化機構の解析: 内在性の *START-GAP1* について調べるため、本研究の準備段階で *START-GAP1* に対する特異抗体を作成した。ラット NRK 細胞を用いて免疫染色を行ったところ、細胞内および細胞周辺に斑点状の分布を示した。各種の細胞骨格系タンパク質やオルガネラ特異的タンパク質に対する抗体を用いた蛍光免疫染色を手段として、顕微染色像を比較することにより、斑点状の分布は、細胞・細胞基質間接着を担う接着斑(focal adhesions)であることを明らかにした【**図 2**】。

次に、*START-GAP1* の接着斑局在に関わる領域を調べた。緑色蛍光タンパク質 GFP を融合



した各種変異体を作成して細胞に発現し、N 末端側の 286-459 アミノ酸領域内に、接着斑局在化機能が存在することを、本研究の開始段階までに明らかにした。この *START-GAP1* の接着斑局在化領域(「FAT(focal adhesion-targeting)領域」と命名: **図 3** 参照)を発現した細胞では、内在性 *START-GAP1* が接着斑から解離しており、細胞運動性、および、進展などの形態の変化において、

図 3 FAT ドメインを含む *START-GAP1* の模式図



START-GAP1 が接着斑で機能することを示している。本研究では FAT 領域そのものの機能とともに、これに対する他の分子内領域の影響を検討した。

(2) FAT 領域の絞り込み、および、*START-GAP1* 結合タンパク tensin2 との相互作用の解析: 本研究では、FAT 領域をさらに細分化し、これらのサブ領域の欠失変異体や単離発現変異体を組み合わせて、FAT 領域中で、接着斑局在化に必須な領域を絞り込んだ。また、本研究開始直後に、国外の 2 つのグループから、接着斑構成因子の一つであり、インテグリンのシグナルをアクチンに伝達するのに重要であるとされる tensin ファミリーが *START-GAP1* の FAT 領域近傍と相互作用するとの報告がなされたために、上記変異体を用いて tensin2 と *START-GAP1* FAT 領域との間の分子間相互作用の詳細を、FAT サブ領域変異体ならびにアミノ酸点変異を導入した変異体を用いて、主としてインビトロの結合実験で解析し、相互作用に重要な領域と残基を同定した。

(3) *START-GAP1* 結合タンパクの探索: 我々は、ラット肝臓抽出液から *START-GAP1* の FAT 領域の GST 融合タンパクをベイトとして、FAT 領域に特異的に結合するタンパク質の候補を SDS-PAGE 法によっていくつかのバンドとして分離した。それらのタンパク質バンドの各々を MALDI-TOF 質量分析法を利用したペプチドフィンガープリント法によって解析したところ、小胞体輸送関連分子である Sec23A、転写因子である p105 coactivator、脂質代謝酵素である 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase IV などが同定された。これらの中で最も高い候補タンパクとしての統計的スコアを与えた Sec23A について、実際に細胞内において *START-GAP1* との結合がおこるかどうかを、Sec23A の細胞内発現系を用いることによって解析した。

(4) *START-GAP* ファミリーの生化学的性質の比較: 前述のように、哺乳動物においては *START-GAP* ファミリーは *START-GAP1*, *START-GAP2*, *START-GAP3* の 3 つのアイソフォームからなる。これらのアイソフォームが一部のがん細胞に対して増殖・転移抑制活性を示すことは本研究開始前および開始直後に報告されていたが *START-GAP2*, *START-GAP3* の生

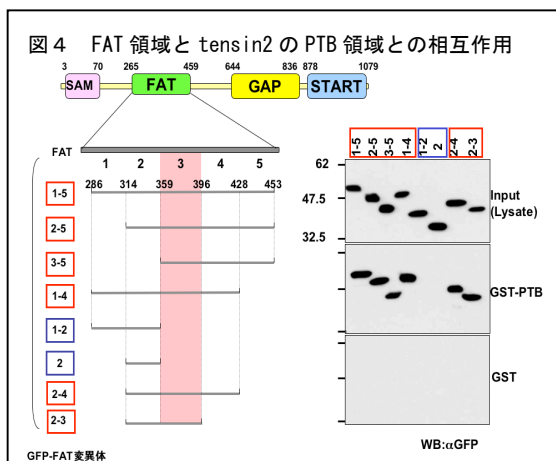
化学的性質についての解析はほとんどなされていなかった。本研究では、これら3つのアイソフォームのRhoファミリータンパク質（GTPase活性）とPLCδ1（PIP2分解活性）に対する影響を検討した。

(5) 抗START-GAP2および抗START-GAP3抗体の作成と細胞内分布の解析：

START-GAP2, START-GAP3 に対する抗体は市販されていないので、START-GAP2, START-GAP3 に対する特異的なウサギポリクローン抗体を作成した。これらの抗体を用いて、内在性 START-GAP2, START-GAP3 の細胞内分布を蛍光顕微鏡下において解析した。

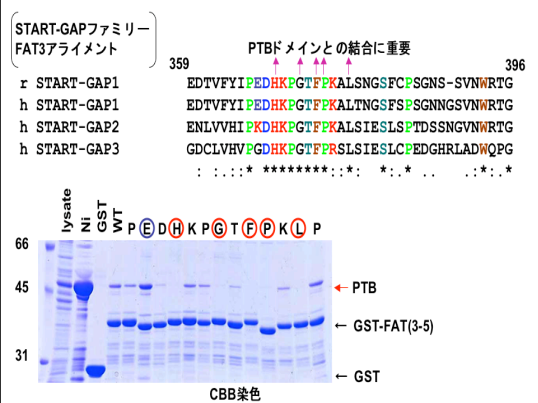
4. 研究の成果

(1) 前項(1)および(2)の結果より、 START-GAP1 の接着斑局在化に必要な領域は314-452の約140アミノ酸からなる領域に絞られ、この中でも359-396領域が特に重要であることが判明した。また、START-GAP1の過剰発現による形態変化には、FAT領域とGAP領域が相乗的に関与することが明らかになった。また、START-GAP2にも機能的なFAT領域がほぼ同じ部位に存在し、この領域の細胞内発現は内在性 START-GAP1 の接着斑への局在化を抑制し、細胞の形態にも影響を与えた。このように細胞の形態の維持において、START-GAPのFAT領域を介する接着斑標的化が重要な役割を担っていることが示された。また、START-GAP1ではFAT領域中の359-396領域に存在する数個のアミノ酸残基が、tensin2のインテグリンとの結合領域であることが報告されているPTB（リン酸化チロシン結合）領域と、チロシンリン酸化に依存しない様式で結合することを見いだし、START-GAP1がインテグリンシグナルの直接制御因子である可能性を示した【図4, 5】。



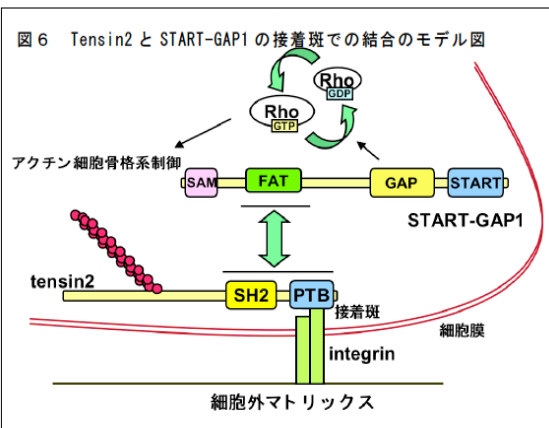
さらに、START-GAP1の428-453残基の部分は、tensin2のSH2 (Src homology 2) 領域と相互作用することが、上述のPTBドメインとの相互作用の解析とほぼ同様の手法で明らかになった。従って、START-GAP1のFAT領域とtensin2の間の結合には、相互に独立し

図5 Tensin2 PTB 領域との結合に重要なアミノ酸と結合親和性



START-GAP1のH369,G372,F373,P374,L377がPTBドメインとの結合に重要。E367AはPTBドメインとの結合を強化する。

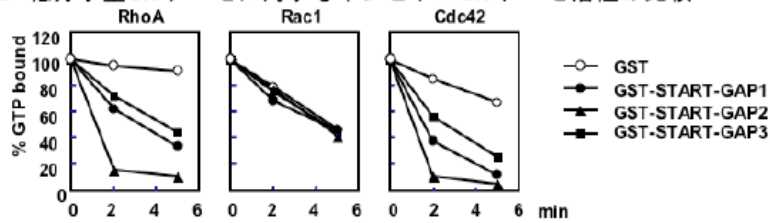
た相互作用が協調しあって働いている可能性が高い【図6】。



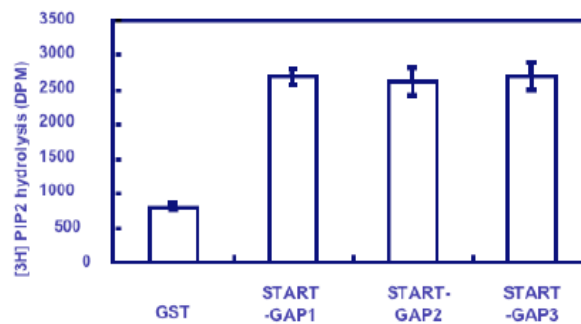
(2) 前項(3)の結果は、 START-GAP1が接着斑構成タンパク質以外に細胞内物質輸送に関わるタンパク質の1つであるSec23とも相互作用するという予想外のものであった。一般に、タンパク質は小胞体で合成された後、COP (coat protein complex) II と呼ばれる小胞によって覆われ、ゴルジ体へと順行輸送されるが、このCOPIIを構成するタンパク質の中に Sec23/24 複合体がある。ゴルジ体から小胞体への逆行輸送を司るCOPI小胞とRhoファミリー低分子量Gタンパク質との関係は報告されているが、小胞体からゴルジ体への輸送過程にRhoGTPアーゼが関わるかどうかについては不明であり、このプロセスにSTART-GAPファミリータンパク質が関わっている可能性が示されたことは極めて興味深い。実際、HeLa細胞内でGFP融合タンパクとして発現させたSec23Aおよびその複合体パートナーであるSec24CとともにSTART-GAP1のFAT領域に結合した。しかしSTART-GAP2のFAT領域はSec23A, Sec24Cともに結合せず、これはSTART-GAP1とSTART-GAP2の機能の差をするものとして興味深い。またSec23A

図7 START-GAP ファミリーの RhoGTP アーゼ、PLC δ 1、細胞形態に与える影響の比較

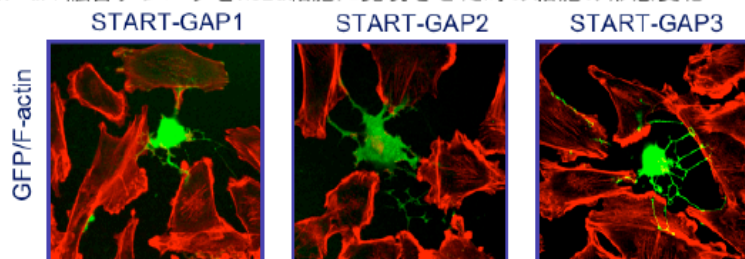
A. 低分子量GTPアーゼに対するインビトロGTPアーゼ活性の比較



B. PLC δ 1に対するインビトロ活性亢進作用



C. GFP融合タンパクをHeLa細胞に発現させた時の細胞の形態変化



は START-GAP1 と結合する tensin2 の SH2/PTB 領域を含む C 末端領域とも結合し、COPII、あるいは、その前駆体が接着斑における物質輸送になんらかの形で関わっていることを示唆している。

(3) 前項(4)の結果、START-GAP タンパク質のいずれも、Rac1 以外の RhoA および Cdc42 に対する GAP 活性を示し [図7A]、また、PLC δ 1 の活性亢進を引き起こすこと [図7B] が明らかになった。また、それぞれを細胞に過剰発現すると、アクチンストレスファイバーが消失して、突起形成と細胞質の収縮を伴う形態変化 (非扁平化) が起こること [図7C] が示され、いずれの START-GAP もその正常な発現が、細胞の形態や運動性の維持にかかわっていることが示された。

(4) 前項(5)の結果、内在性の START-GAP2, START-GAP3 の一部は接着斑へ局在化するものの、一部が細胞核の周辺に分布することが判明した。特に START-GAP2 は一部がゴルジ体のマーカーと共局在した。前述のように、START-GAP2 と Sec23A や Sec24C との結合は、現在のところ確認されていないが、START-GAP が細胞内物質輸送、特に、ゴルジ周辺で

の小胞輸送や START ドメインを介した脂質輸送に関わっている可能性が示された。

これらの成果をまとめると、本研究により、START-GAP ファミリー、特に START-GAP1 の接着斑局在化の分子機構の解明が進み、細胞形態や運動性の制御における役割がさらに詳細に明らかになった。また、START-GAP ファミリーが基本的には共通の生化学的性質を示すことから、機能的によく保存され、進化的にも近いことが判明した。しかし、内在性 START-GAP の視覚化により、細胞内では微妙にそれぞれの分布が異なり、おそらく担っている役割も若干異なっている可能性が新たに示された。これまでの細胞内過剰発現系によって得られた知見と比べて、これらの新たな情報は、実際の細胞内での START-GAP の機能を解析して行く上で重要である。

今後の研究の展開としては、それぞれのアイソフォーム遺伝子のノックダウンやコンディショナルノックアウト、あるいは、ノックイン等の方法により、それぞれがどのような細胞機能を担い、また、互いに機能の補完をするのか、あるいは阻害をするのかなどの点を調べて行く必要がある。

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 7 件)

- ① Uekama, N., Sugita, T., Okada, M., Yagisawa, H. and Tuzi, S.: Phosphatidylserine induces functional and structural alterations of the membrane-associated PH domain of phospholipase C- δ 1 *FEBS J.* 274: 177-187 (2007). 査読有
- ② Matsuura, D., Taguchi, K., Yagisawa, H. and Maekawa S.: Lipid components in the detergent-resistant membrane microdomain (DRM) obtained from the synaptic plasma membrane of rat brain. *Neurosci. Lett.* 423:158-161 (2007). 査読有
- ③ Kawai, K., Kiyota, M., Seike J., Deki, Y. and Yagisawa H.: START-GAP3/DLC3 is a GAP for RhoA and Cdc42 and is localized in focal adhesions regulating cell morphology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 364: 783-789 (2007). 査読有
- ④ Yamaga, M., Kawai, K., Kiyota, M., Homma Y. and Yagisawa, H.: Recruitment and activation of phospholipase C (PLC)- δ 1 in lipid rafts by muscarinic stimulation of PC12 cells: contribution of p122RhoGAP/DLC1, a tumor-suppressing PLC δ 1 binding protein. *Adv. Enzyme Regul.* 48: 41-54 (2008). 査読有
- ⑤ Otsuka, A., Abe, T., Watanabe, M., Yagisawa, H., Takei, K. and Yamada, H.: Dynamin 2 is required for actin assembly in phagocytosis in Sertoli cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 378: 478-482(2009). 査読有
- ⑥ Kawai, K., Iwamae, Y., Yamaga, M., Ishii, H., Hirata, H., Homma, Y. and Yagisawa, H.: Focal adhesion-localization of START-GAP1/DLC1 is essential for cell motility and morphology, *Genes Cells* 14: 227-241 (2009). 査読有
- ⑦ Kawai, K., Seike, J., Iino, T., Kiyota, M., Iwamae, Y. and Yagisawa, H.: START-GAP2/DLC2 is localized in focal adhesions via its N-terminal region. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380: 736-741 (2009). 査読有

[学会発表] (計 16 件)

- ① 上釜 奈緒子、八木澤 仁、辻 暁、西村 勝之: 固体 NMR による膜表在性タンパク質 PLC- δ 1PH ドメインの局所運動性解析. 第 46 回 NMR 討論会(2007 年 9 月 10-13 日、札幌)
- ② Yagisawa, H., Kawai, K., Iwamae, Y., Kiyota,

M. and Yamaga, M.: Regulation of intracellular localization of a dual functional PLC δ 1-binding protein, p122RhoGAP/DLC1, a member of the tumor suppressing START-GAP family proteins. 48th International Symposium on "Regulation of Enzyme Activity and Synthesis in Normal and Neoplastic Tissues, (2007 年 9 月 24-25 日, Bologna, Italy)

- ③ Fujii, M. and Yagisawa, H.: Phosphorylation of phospholipase C- δ 1 regulates its enzymatic activity. Howard Hughes Medical Institute, Janelia Conference on "Inositide Signalling," (2007 年 11 月 4-7 日, Virginia USA)
- ④ Yagisawa, H., Seike, J., and Kawai, K.: START-GAP1, a PLC δ 1-binding RhoGAP, in focal adhesions regulates cell morphology and motility, Howard Hughes Medical Institute, Janelia Conference on "Inositide Signalling," (2007 年 11 月 4-7 日, Virginia USA)
- ⑤ 上釜 奈緒子、青木 隆広、丸岡 俊宏、栗栖 聖治、畠山 明子、岡田 雅司、八木澤 仁、西村 勝之、辻 暁: 脂質二重膜表面の曲率とホスホリパーゼ C- δ 1 PH ドメインの立体構造変化: 固体 NMR 分光法による解析. BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会合同大会) (2007 年 12 月 11-14 日、横浜)
- ⑥ 川合 克久、清田 稔、清家 淳一、岩前 由衣、八木澤 仁: p122RhoGAP による細胞形態変化には接着斑への局在化が寄与する。BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会) (2007 年 12 月 11-14 日、横浜)
- ⑦ 上釜 奈緒子、八木澤 仁、辻 暁、西村 勝之: 固体 NMR 分光法による膜表在性タンパク質 PLC- δ 1 の局所運動性の解析. 日本生物物理学会第 45 回年会 (2007 年 12 月 21-23 日、横浜)
- ⑧ 三宅 健史、川合 克久、八木澤 仁、辻 暁: ホスホリパーゼ C- δ 1 PH ドメインおよび EF-hand ドメインの脂質二重膜上における構造とダイナミクス. 日本生物物理学会第 45 回年会 (2007 年 12 月 21-23 日、横浜)
- ⑨ 徳田 尚美、八木澤 仁、福井 泰久、辻 暁: 脂質二重膜表面における pleckstrin homology domain の動的構造の解析. 日本生物物理学会第 45 回年会 (2007 年 12 月 21-23 日、横浜)
- ⑩ Yagisawa, H. and Okada, M.: Ca²⁺-dependent nuclear accumulation of phospholipase C- δ 1: 第 31 回神経科学学会大会 (2008 年 7 月 9-11 日、東京)
- ⑪ Mimura, T., Mitsuhashi, N., Richardso, A., Chung, S-K. and Yagisawa, H.: Measurement

of inositol polyphosphates by ion chromatography and their physiological status in higher plants. 第 31 回神経科学会大会 (2008 年 7 月 9-11 日、東京)

- ⑫ 徳田 尚美、八木澤 仁、福井 泰久、辻 暁
脂質膜上における局所構造の特徴に基づ
く pleckstrin homology domain-脂質膜間
相互作用の解析. 第 47 回 NMR 討論会
(2008 年 11 月 12-14 日、筑波)
- ⑬ 八木澤 仁: イノシトールリン脂質代謝酵
素の核-細胞質間移行とその生理的意義
BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年
会・第 81 回日本生化学会大会合同大会シ
ンポジウム「核-細胞質間輸送と生命機能
制御のインターフェイス」(2008 年 12 月
9-12 日、神戸)
- ⑭ 北村 真也、前平 航司、川合 克久、西谷 秀
男、八木澤 仁: START-GAP1 の接着斑局
在化におけるテンシン 2 との結合の役割.
BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年
会・第 81 回日本生化学会大会合同大会
(2008 年 12 月 9-12 日、神戸)
- ⑮ 川合 克久、北村 真也、川合 由華、西谷 秀
男、八木澤 仁: START-GAP1 は接着斑局
在化領域のテンシン 2 に対するリン酸化
依存的結合により接着斑に局在化する.
BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年
会・第 81 回日本生化学会大会合同大会
(2008 年 12 月 9-12 日、神戸)
- ⑯ Uekama, N., Aoki, T., Muraoka, T., Yagisawa,
H., Nishimura K. and Tuzi, S.: Influence of
membrane curvature on the structure of the
phospholipase C (PLC)- $\delta 1$ PH domain:
implication in intracellular localization.
Gordon Research Conference on "Signal
Transduction Within the Nucleus." (2009 年
3 月 29 日-4 月 3 日, California, USA)

[図書] (計 1 件)

- ① Yagisawa, H.: Phosphoinositide-specific
phospholipase C: Isoforms and related
molecules. In "**Handbook of
Neurochemistry and Molecular
Neurobiology (3rd Edition)**, *Neural Signal
Mechanism* Vol. 1b (ed. Mikoshiba K.),
Chapter 14: Phospholipid signaling and cell
function, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg:
pp.269-296 (2009).

[その他]

ホームページ URL:

<http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/biosig/kenkyu.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八木澤 仁 (YAGISAWA HITOSHI)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・准
教授

研究者番号: 40192380