

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590308

研究課題名（和文）

Rhoファミリーシグナル伝達系分子を対象とした疾患関連遺伝子の探索と解析

研究課題名（英文）

Analysis of disease-related genes involved in Rho family small GTPase signaling

研究代表者

天野 睦紀 (AMANO MUTSUKI)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90304170

研究成果の概要（和文）：本研究ではヒト疾患（循環器疾患や精神疾患等）の発症に関わる低分子量 GTPase Rho ファミリーシグナル伝達系分子の同定とその分子基盤を明らかにすることを目的としている。Rho ファミリーメンバーの Rac の活性抑制因子である ARHGAP9 の PH ドメイン中に存在する SNP (Ala370Ser) が薬物誘発性冠攣縮と関連が認められることを見出し、SNP によって細胞接着や遊走能に差が生じることを示した。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to identify and characterize the disease-related genes involved in Rho family small GTPase signaling pathways to understand the pathogenesis of cardiovascular diseases and mental disorders. We found that the SNP (Ala370Ser) within PH domain of ARHGAP9, which is a negative regulator of Rac, was associated with a significant risk of coronary artery spasm. The Ala370Ser polymorphism counteracted ARHGAP9-reduced cell migration, spreading and adhesion, suggesting that it results in a critical difference in ARHGAP9 function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：シグナル伝達、Rho ファミリー、循環器、冠攣縮、精神疾患、キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

個体発生や組織の再構築、癌細胞の浸潤、循環器疾患等においては、細胞形態や細胞接着のダイナミックな再構築と細胞の収縮や遊走が重要な役割を果たしている。このような過程には空間的位置情報と時間情報が細胞内に伝達・統合され、細胞骨格分子、接着分子が再構築されることが必須である。低分子量 GTPase Rho ファミリーがこの過程に

重要な役割を果たすことは知られていたものの、疾患の発症や進展過程における詳細な分子メカニズムには不明の部分が多かった。

申請者らは、平成 18、19 年度の基盤研究 (C)において Rho ファミリー分子および Rho ファミリーの活性制御因子の 38 遺伝子（特にアミノ酸置換を伴う 57 SNPs）について解析を行い、薬物誘発性冠攣縮と関連が認められる候補遺伝子 (ARHGAP9 A370S) を見出し

た。これは、冠攣縮性狭心症（異型狭心症）の診断に用いられるアセチルコリン等の負荷試験により、冠動脈に攣縮が認められた群と認められなかった群を比較した結果による。冠攣縮性狭心症は日本人に多いとされ、突然死の原因ともされている。しかし、この時点では ARHGAP9 の生理機能や SNP の影響についてはほとんどが明らかにされていなかった。

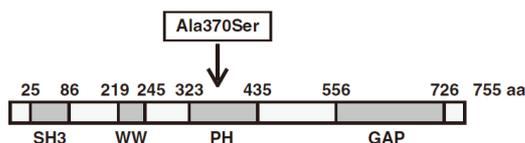
2. 研究の目的

前述の研究成果を基盤として、平成 20-22 年度の基盤研究（C）においては ARHGAP9 の生理機能や疾患への関与、SNP の影響などを明らかにすることを目的とした。さらに、他の Rho ファミリー関連分子についても疾患への関わりについて解析を試みることにした。

3. 研究の方法

通常、冠動脈にアセチルコリンを作用させると血管内皮細胞に作用して血管の弛緩が起こるが、アセチルコリンが血管の収縮を起こすことがある。これは、血管内皮が障害されてアセチルコリンが平滑筋に直接作用する、あるいは血管内皮の NO 産生能が低下している、などの理由が考えられているが、その実体については不明の部分も多い。薬物誘発性冠攣縮との関連が認められた ARHGAP9 は Rho ファミリーの不活性化因子であり、保存された GAP ドメイン（Rho ファミリーの不活性化を担うドメイン）と共に SH3 ドメインと PH ドメインから構成されている（図 1）が、詳細については殆ど明らかにされていない。

（図 1：ARHGAP9 のドメイン構造と SNP の位置）



Rho/Rac/Cdc42 は低分子量 GTPase Rho ファミリーのメンバーであり、アクチンや微小管などの細胞骨格や細胞接着を制御することが知られている。ARHGAP9 の 370 番目のアラニン型とセリン型の変異体を作製し、生化学的および細胞生物学的な解析を行った。PH ドメイン内の変異であるので、脂質との親和性や細胞内局在、ダイナミクスに差があるかどうかとも検討した。in vitro および in vivo で Rho/Rac/Cdc42 GAP 活性に差があるかどうかとも検討した。さらに、細胞にアラニン型とセリン型のそれぞれを過剰発現させて細胞の形態や接着性、運動性に差があるかも検討した。

また、ARHGAP9 以外にも疾患への関連が示唆されている Rho ファミリーシグナル系分子、

特にキナーゼについて解析を行った。

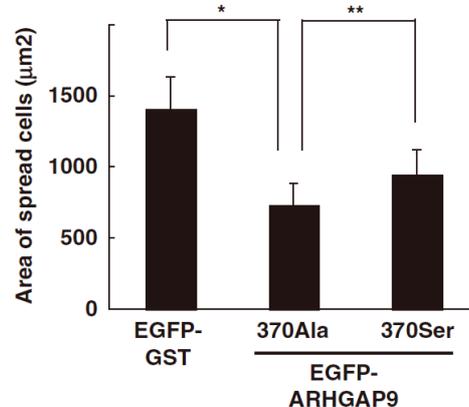
4. 研究成果

(1) ARHGAP9 の性状解析

ARHGAP9 は血球系に特異的に発現が認められた。ARHGAP9 は、Rho ファミリー活性を抑制する GAP ドメインと SH3 ドメイン、PH ドメインから構成される。Ala370Ser のアミノ酸置換を生じる SNP は、脂質や蛋白質との相互作用に関わる PH ドメインの中に位置する。まず、SNP によって遺伝子発現に差があるかを、血液サンプルを用いた RT-PCR により検討したところ、mRNA の発現レベルに顕著な差は認められなかった。

ARHGAP9 は in vitro で Rho ファミリーメンバーの中でも Rac と Cdc42 特異的に活性抑制効果があることが報告されていた。そこで、細胞内においても同様の特異性を示すか、COS7 細胞を用いて検討したところ、COS7 細胞において ARHGAP9 は Rac の活性を抑制したが Cdc42 や Rho の活性は抑制しないことを見出した。Rac のアイソフォーム (Rac1 と Rac2) に対してはいずれに対しても効果を示した。また HeLa 細胞やマクロファージ様細胞である RAW264 細胞に ARHGAP9 を発現させると細胞の接着能や運動能が低下した。このことは、Rac が細胞接着や細胞運動に必須の機能を持つこととよく一致する。さらに SNP によるアミノ酸置換が細胞接着能や運動能に影響を与えるかどうかを解析したところ、370Ala 型の方が 370Ser 型より接着能・運動能に対する抑制効果が強かった（図 2）。このことは 370Ser 型を有する白血球やマクロファージは 370Ala 型より高い接着能・運動能を持つことを示唆する。冠攣縮が認められた群では 370Ser 型の出現頻度が有意に高く、マクロファージ等の接着能・運動能の違いが血管内皮機能の障害に影響している可能性が考えられる。

（図 2：HeLa 細胞の接着能に及ぼす影響）



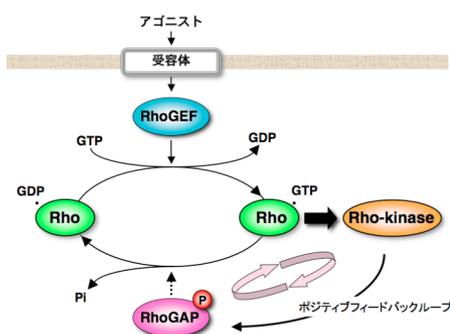
370 番目のアミノ酸置換の生理的意義を詳細

に検討するために、まず SNP の存在する PH ドメインに注目し、PH ドメインの脂質に対する特異性を調べた。その結果、ARHGAP9 の PH ドメインは PI(4,5)P2 と PI(3,4,5)P3 に高い親和性を示した。SNP に伴うアミノ酸置換により脂質への結合能に変化があるかを検討したが、370Ala 型と 370Ser 型の間で顕著な差は無かった。さらに、ARHGAP9 の SNP が血球系細胞や HEK293 細胞を用いた再構成系において活性酸素種の産生に影響を及ぼすかについても検討したが、顕著な差は認められなかった。370 番目の多型の生理機能への影響については今後のさらなる解析が必要である。

(2) Rho ファミリーシグナル系のキナーゼの基質の探索

Rho とそのエフェクターである Rho-kinase の異常な活性化が冠攣縮の原因となりうることを示唆されている。しかしながら、なぜ Rho/Rho-kinase の活性が冠攣縮部位で高く維持されるのか、その分子基盤についてはほとんど明らかにされていなかった。本研究では血管平滑筋細胞において Rho-kinase が Rho の不活性化因子である p190RhoGAP をエンドセリンなどのアゴニスト依存的にリン酸化することを見出した。Rho-kinase によるリン酸化により p190RhoGAP の活性が抑制されるというポジティブフィードバックループ(図 3)の存在を示唆するデータを得ており、この機構によって Rho/Rho-kinase の活性が高く維持されるのではないかと考えている。

(図 3 : Rho 活性化のポジティブフィードバックループ)



上述の Rho-kinase を含む Rho ファミリーの下流のキナーゼの基質の網羅的探索と同一を行った。Rho ファミリーの下流には Rho-kinase 以外にも PAK, aPKC など複数のキナーゼが存在し、それぞれ疾患への関与が示唆されている。Rho ファミリーとこれらのキナーゼがどのように疾患の発症や進展に寄与するかを解析するために、プロテオミクス的手法を用いて基質の探索を試みた。Rho-kinase, PAK7, aPKC, PKN についてそれぞれ多数の新規基質候補を得ており、さらに

その一部については in vitro でのリン酸化を確認した。Rho-kinase については細胞骨格を構成する分子が、また PAK7 については低分子量 GTPase の活性化因子や活性抑制因子が多数得られ、それぞれのキナーゼの機能を予測する上で有用な情報であると考えられる。

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 6 件)

- ① Takefuji, M., Asano, H., Mori, K., Amano, M., Kato, K., Watanabe, T., Morita, Y., Katsumi, A., Itoh, T., Takenawa, T., Hirashiki, A., Izawa, H., Nagata, K., Hirayama, H., Takatsu, F., Naoe, T., Yokota, M., and Kaibuchi, K. Mutation of ARHGAP9 in patients with coronary spastic angina. *Journal of Human Genetics* 査読有 55, 42-49 (2010)
- ② Amano, M., Tsumura, Y., Taki, K., Harada, H., Mori, K., Nishioka, T., Kato, K., Suzuki, T., Nishioka, Y., Iwamatsu, A., and Kaibuchi, K. A proteomic approach for comprehensively screening substrates of protein kinases such as Rho-kinase. *PLoS ONE* 査読有 5, e8704 (2010)
- ③ Amano, M., Nakayama, M., and Kaibuchi, K. Rho-kinase/ROCK: A key regulator of the cytoskeleton and cell polarity. *Cytoskeleton* 査読有 67, 545-554 (2010)
- ④ Mori, K., Amano, M., Takefuji, M., Kato, K., Morita, Y., Nishioka, T., Matsuura, Y., Murohara, T., and Kaibuchi, K. Rho-kinase Contributes to Sustained RhoA Activation through Phosphorylation of p190A RhoGAP. *The Journal of Biological Chemistry* 査読有 284, 5067-5076 (2009)
- ⑤ Iwasaki, T., Katsumi, A., Kiyoi, H., Tanizaki, R., Ishikawa, Y., Ozeki, K., Kobayashi, M., Abe, A., Matsushita, T., Watanabe, T., Amano, M., Kojima, T., Kaibuchi, K., and Naoe, T. Prognostic implication and biological roles of RhoH in acute myeloid leukaemia. *European Journal of Haematology* 査読有 81, 454-460 (2008)

[学会発表] (計 1 1 件)

- ① Amano, M. A proteomic approach for comprehensively screening substrates of protein kinases. *Neuro 2010* (2010.9.4) Kobe, Japan
- ② 天野睦紀、蛋白質間相互作用を利用したキナーゼ基質の網羅的解析、第 61 回日本細胞生物学会大会 (2009.6.4) 名古屋

- ③ Amano, M. Screening of Protein kinase Substrates by an Interactome Approach. Tsuruoka Proteomics Meeting 2009 (2009.12.7) Tsuruoka, Japan
- ④ Amano, M. Roles of Rho/Rho-kinase in Cellular functions and Diseases. 10th International Symposium on Mechanisms of Vasodilation (2009.6.3) Matsushima, Japan
- ⑤ 天野睦紀, Rho-kinase bによる Rho の持続的活性化と血管平滑筋収縮、第 82 回日本薬理学会年会 (2009.3.18) 横浜
- ⑥ Amano, M. Rho-kinase and Rho family GTPase signaling. FASEB Summer Research Conferences (2008.7.14) Vermont, USA

[図書] (計 0 件)

[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.med.nagoya-u.ac.jp/Yakuri/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

天野 睦紀 (AMANO MUTSUKI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90304170

(2) 研究分担者

貝淵 弘三 (KAIBUCHI KOUZOU)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00169377