

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月1日現在

機関番号：24403  
 研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21570138  
 研究課題名（和文）Ras、RhoファミリーGTPaseによる細胞内部位特異的シグナル伝達機構の解析  
 研究課題名（英文）Analysis of subcellular region-specific signaling by Ras and Rho family GTPases  
 研究代表者  
 佐藤 孝哉（SATO TAKAYA）  
 大阪府立大学・大学院理学系研究科・教授  
 研究者番号：20251655

研究成果の概要（和文）：Ras ファミリーおよび Rho ファミリーGTPase は、細胞内シグナル伝達系において、分子スイッチとして重要な機能を担っている。近年、細胞内シグナル伝達系の細胞内部位特異的な調節メカニズムが注目されており、その解明が重要な課題となっている。本研究では、当該 GTPase のうち、Rac1、RhoA、Rap1 に着目し、それらが関与する新規のシグナル伝達系における細胞内部位特異的な制御機構の解析を行った。

研究成果の概要（英文）：Ras and Rho family GTPases play an important role as a molecular switch in intracellular signal transduction. Recently, its subcellular region-specific regulatory mechanisms are featured. In this study, we analyzed the subcellular region-specific regulatory mechanism underlying newly identified signaling pathways involving the GTPase Rac1, RhoA, or Rap1.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
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・機能生物化学

キーワード：ゲノム、細胞・組織、シグナル伝達、蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

低分子量 GTPase (GTP 結合蛋白質) は、種々の哺乳動物細胞の細胞内シグナル伝達系において、重要な機能を担っている。このうち、Ras ファミリーは、主に増殖や分化を制御し、Rho ファミリーは、形態、接着、運動、小胞輸送などを制御していることがよく知られている。個体レベルでは、種々の器官形成や神経回路網の構築などの高次生命現象の発現に非常に重要であると考えられている。一方、これらの GTPase の機能の異常は、癌を

はじめとする様々な病態を引き起こす。さらに、細胞内シグナル伝達系においては、これらの GTPase が複雑なネットワークを形成している。したがって、Ras ファミリーおよび Rho ファミリーGTPase のネットワークの調節機構の解明は、高次生命機能や細胞癌化の分子レベルでの理解に必須であり、今後の重要な課題である。

Ras は主として細胞膜内側に、一部はゴルジ装置などの細胞内膜系に局在し、Rho ファミリーは、小胞体やゴルジ装置を含む種々の

細胞内領域に存在している。いずれも、細胞質、細胞内膜系、細胞膜の間でダイナミックに局在が変化しており、それぞれの細胞内部位で選択的な活性調節を受けて機能していると予想される。したがって、Ras ファミリーおよび Rho ファミリー蛋白質が形成するシグナル伝達ネットワークを制御する分子機構を解明するためには、各分子の細胞内領域特異的な活性化を検出し、三次元的に情報を解析することが非常に重要である。さらに、細胞内部位に特異的な活性制御に関与する調節因子の同定を行う必要がある。

細胞内シグナル伝達研究における空間情報の重要性は、国内・国外で広く認識されている。実際、多くのシグナル伝達分子の細胞内空間情報を含む活性化状態の可視化に蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) 法が応用されている。しかし、FRET 法の場合は、遺伝子導入を介してインディケータを細胞内で発現させる必要があり、内在性分子の活性化動態を検出することはできない。そこで我々はこれまでに、内在性の Ras ファミリーおよび Rho ファミリー GTPase の活性化を可視化する手法の開発にとり組み、遺伝子操作マウスなどへの応用を目指して研究を進めてきた。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々が最近開発を進めている分子イメージング法を応用して、各分子の細胞内領域特異的な活性化を検出することにより、哺乳動物細胞において、Ras ファミリーおよび Rho ファミリーのシグナル伝達ネットワークやクロストークの三次元情報を含めた解析を行うことを目的としている。具体的には、シグナル伝達の空間的な制御が重要と考えられる (1) 骨格筋における糖取り込み、(2) エンドサイトーシス、(3) 細胞分裂と中心体複製、(4) 胎生期の血管形成の系に関して、これまでの研究成果をより発展させることを目指している。

## 3. 研究の方法

(1) 細胞表面に露出したときに抗 Myc タグ抗体で細胞外から検出される GLUT4 レポーターを用いて、マウス骨格筋での GLUT4 の細胞膜への移行を検出する系を確立し、この系を用いて、Rac1 の重要性を証明する計画である。GLUT4 レポーターの発現プラスミドをマウス腓腹筋にエレクトロポレーション法によって導入し、48 時間後にインスリンを尾静注し、腓腹筋を単離後、共焦点レーザー顕微鏡下での観察および画像解析により、GLUT4 レポーターの細胞膜への移行を検出、定量する計画である。予備的な解析により、エレクトロポレーション法による遺伝子導入が可能であることは既に確認している。また、インスリン依存性のレポーターの細胞膜移行も検出

されている。まずはこの系において、種々の Rho ファミリー GTPase の恒常的活性型変異体を共発現させた場合の効果を検討する計画である。培養細胞系の場合と同様に、活性型 Rac1 がインスリンと同様の効果を示すことが期待される。次に、骨格筋特異的 rac1 ノックアウトマウスを用いて同様の実験を行い、インスリン依存性の GLUT4 の細胞膜移行が阻害されるかどうか、検討する計画である。さらに、ブルダウンアッセイおよび我々が開発した活性化部位の可視化法により、インスリンを尾静注後に腓腹筋において実際に Rac1 が活性化されていることを証明する計画である。

(2) Rac1 の下流で小胞輸送が抑制されるメカニズムの解析を進める。エフェクター変異体の効果や既知の標的分子の siRNA による発現抑制などの効果を検討する。標的分子の一つとして既にシナプトジャニン 2 が報告されているが、Rac1 の細胞内膜系での特異的な活性化とシナプトジャニン 2 の作用機構には不明の点が多いので、解析を進める計画である。

(3) HeLa 細胞において RhoA のグアニンヌクレオチド交換因子である ARHGEF10 を RNAi 法によりノックダウンすると、細胞分裂時に多極化が誘導されることを見出した。また、ARHGEF10 と相互作用する分子として KIF3B を同定し、これらの分子が細胞分裂と中心体複製を制御するメカニズムの解析を行っている。本研究では、RhoA の活性化部位を可視化し、ARHGEF10 の特異的作用を解析する計画である。また、セルソーターを用いた解析から、多極化が細胞質分裂の異常に起因しているのか、中心体の過剰複製に起因しているのか明らかにする予定である。

(4) RA-GEF-1 ノックアウトマウスは、胎生致死であり、胎生 7.5 日以降の胎児本体と胚膜での血管形成に異常が認められた。この表現型はインテグリンやカドヘリンのノックアウトマウスの表現型に類似しており、RA-GEF-1 が内皮細胞の接着を制御し、血管形成に関与している可能性を示唆している。本研究では、胎児由来の培養細胞系を用いた解析を進める予定である。胎生 7.5 日の尿膜を単離し、24 時間培養することにより血管網の形成が観察されるが、RA-GEF-1 ノックアウトマウスの場合、どこに異常があるかを検討する。一方、ES 細胞からの *in vitro* 血管形成の系も導入する。既に作成済みの RA-GEF-1 flox/+ ES 細胞から RA-GEF-1 flox/flox ES 細胞を樹立し、Cre リコンビナーゼを導入して RA-GEF-1 <sup>-/-</sup> ES 細胞を単離する。この細胞と野生型 ES 細胞からの三次元培養下での血管形成を比較する計画である。

## 4. 研究成果

(1) マウス骨格筋においても、インスリン応

答性の糖取り込みに Rac1 が重要であるかどうか、検討を行った。エレクトロポレーション法により、糖輸送担体 GLUT4 のレポーターの発現ベクターをマウス骨格筋に導入した後、発現した GLUT4 レポーターの細胞外領域のタグを免疫蛍光染色法により検出することで、GLUT4 の細胞膜への移行 (糖取り込み) を評価した。その結果、コントロールマウスの骨格筋においては、尾静注により投与したインスリンに応答した GLUT4 レポーターの細胞膜への移行が観察されたが、骨格筋特異的 rac1 ノックアウトマウスではそれが完全に抑制されていた。一方、恒常的活性型 Rac1 の発現により、コントロールマウスでも骨格筋特異的 rac1 ノックアウトマウスでも、インスリン刺激がない状態で、GLUT4 の細胞膜移動が誘導された。以上の結果より、インスリン応答性の糖取り込みに Rac1 が重要であることが、マウス骨格筋においても示された。内在性の GLUT4 分子の電子顕微鏡観察からも、同様の結論が導かれた。さらに、従来インスリン受容体の下流で GLUT4 の細胞膜移行を誘導する重要なシグナル伝達分子と考えられていたセリントレオニンキナーゼ Akt と Rac1 との関係についても、マウス骨格筋の系で検討を行った。コントロールマウスおよび骨格筋特異的 rac1 ノックアウトマウスにインスリンを尾静注した後、単離した骨格筋における Akt の 473 番目のセリンのリン酸化を解析したところ、両者に有意差は認められず、Rac1 は Akt の上流では機能していないことが示唆された。

(2) エフェクター変異体の効果や既知の標的分子の siRNA による発現抑制などの効果を検討したが、標的分子の同定には至っていない。Rac1 の細胞内膜系での特異的な活性化のシナプトジャニン 2 への作用についても解析を進めている。

(3) 特異的 siRNA によって RhoA を部分的にノックダウンすると、ARHGEF10 をノックダウンした場合と同様に分裂装置が多極化することが明らかとなった。また、ARHGEF10 のノックダウンによる分裂装置の多極化は、活性型 RhoA の異所性発現によって回復した。以上の結果より、ARHGEF10 は、RhoA を介して、細胞周期進行に伴って中心体数が適正になるように制御していると考えられる。細胞分裂の際の中心体数の異常が起こる原因としては、中心体複製の異常と細胞質分裂の異常による多核化が考えられる。そこで、セルソーターを用いて検討したところ、ARHGEF10 をノックダウンした細胞においても多核化の有意な上昇は認められなかった。したがって、ARHGEF-RhoA 経路は、中心体の複製過程を調節しており、過剰な複製が起こらないようにしていると確認された。さらに、KIF3B をノックダウンした細胞でも分裂装置の多極化

が観察された。したがって、KIF3B は、ARHGEF10 の活性や細胞内局在を制御することで、RhoA 依存的な中心体複製の負の制御系の調節に関与していることが示唆された。(4) RA-GEF-1 がマウス胎生期の血管形成に必須である分子機構を解析した。野生型マウスと RA-GEF-1 ノックアウトマウスの胎生 8.5 日の胎児から単離した尿膜嚢の器官培養や OP9 細胞上での血管内皮細胞培養を応用して、RA-GEF-1 ノックアウトにより、血管内皮細胞の集積、管腔構造の形成と細胞接着因子 VE カドヘリンの内皮細胞接着面への集積、ならびに Rap1 の活性化が顕著に低下することを明らかにした。また、これらの低下は、恒常的活性型 Rap1 のレンチウイルスベクターによる発現により是正された。これらの結果は、RA-GEF-1 による Rap1 活性化が血管内皮細胞の VE カドヘリン依存性の接着の促進を介して、胎生期の血管 (脈管) 形成を誘導するという機構を強く支持した。

#### 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. Shymaa E. Bilasy, Takaya Satoh, Toshio Terashima, and Tohru Kataoka: RA-GEF-1 (Rapgef2) is essential for proper development of the midline commissures. *Neurosci. Res.* 71 (3), 200-209 (2011) 査読有
2. Shuji Ueda, Sohei Kitazawa, Kota Ishida, Yuki Nishikawa, Megumi Matsui, Hikaru Matsumoto, Takuji Aoki, Shinsuke Nozaki, Tomoya Takeda, Yoshikazu Tamori, Atsu Aiba, C. Ronald Kahn, Tohru Kataoka, and Takaya Satoh: Crucial role of the small GTPase Rac1 in insulin-stimulated translocation of glucose transporter 4 to the mouse skeletal muscle sarcolemma. *FASEB J.* 24 (7), 2254-2261 (2010) 査読有
3. Ryoichi Ono, Hidetoshi Kumagai, Hideaki Nakajima, Ai Hishiya, Tomohiko Taki, Keisuke Horikawa, Kiyoshi Takatsu, Takaya Satoh, Yasuhide Hayashi, Toshio Kitamura, and Tetsuya Nosaka: Mixed-lineage-leukemia (MLL) fusion protein collaborates with Ras to induce acute leukemia through aberrant Hox expression and Raf activation. *Leukemia* 23 (12), 2197-2209 (2009) 査読有
4. Hoshimi Kanemura, Takaya Satoh, Shymaa E. Bilasy, Shuji Ueda, Masanori

Hirashima, and Tohru Kataoka: Impaired vascular development in the yolk sac and allantois in mice lacking RA-GEF-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387 (4), 754-759 (2009) 査読有

5. Takuji Aoki, Shuji Ueda, Tohru Kataoka, and Takaya Satoh: Regulation of mitotic spindle formation by the RhoA guanine nucleotide exchange factor ARHGEF10. *BMC Cell Biol.* 10, 56 (2009) 査読有
6. Shymaa E. Bilasy, Takaya Satoh, Shuji Ueda, Ping Wei, Hoshimi Kanemura, Atsu Aiba, Toshio Terashima, and Tohru Kataoka: Dorsal telencephalon-specific RA-GEF-1 knockout mice develop heterotopic cortical mass and commissural fiber defect. *Eur. J. Neurosci.* 29 (10), 1994-2008 (2009) 査読有

[学会発表] (計 11 件)

1. 野崎真輔, 武田朋也, 北浦拓也, 片岡徹, 佐藤孝哉: 骨格筋へのインスリン応答性糖取り込みにおける Rac1 の機能解析. 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 16 日 横浜
2. Kaori Nishihara, Shymaa E. Bilasy, Hironori Edamatsu, Toshio Terashima, Yuichi Ijiri, Takaya Satoh, and Tohru Kataoka: The Rap1 guanine nucleotide exchange factor RA-GEF-1 is essential for the proper development of the mouse cerebral cortex. 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 13 日 横浜
3. Shuji Ueda, Sohei Kitazawa, Kota Ishida, Yuki Nishikawa, Megumi Matsui, Hikaru Matsumoto, Takuji Aoki, Shinsuke Nozaki, Tomoya Takeda, Yoshikazu Tamori, Atsu Aiba, C. Ronald Kahn, Tohru Kataoka, and Takaya Satoh: Crucial role of the small GTPase Rac1 in insulin-stimulated translocation of glucose transporter 4 to the mouse skeletal muscle sarcolemma. 2011 Annual Meeting of the American Society for Cell Biology 2011 年 12 月 04 日 Denver, CO, USA
4. 寺島俊雄, シャイマー・ピラジィ, 薛富義, 佐藤孝哉, 片岡徹: 大脳皮質の交連線維形成におけるグアニンヌクレオチド交換因子 RA-GEF-1 の機能. 第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会 2011 年 03 月 28 日 横浜

5. Shymaa E. Bilasy, Takaya Satoh, Toshio Terashima, and Tohru Kataoka: The Rap1 guanine nucleotide exchange factor RA-GEF-1 is essential for the proper development of the mouse dorsal telencephalon. 31st Annual Meeting of the Australian Neuroscience Society 2011 年 02 月 03 日 Auckland, New Zealand
6. 野崎真輔, 武田朋也, 北浦拓也, 片岡徹, 佐藤孝哉: 骨格筋へのインスリン応答性糖取り込みにおける Rac1 の機能解析. 第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会 2010 年 12 月 10 日 神戸
7. Shymaa E. Bilasy, Takaya Satoh, Toshio Terashima, and Tohru Kataoka: The Rap1 guanine nucleotide exchange factor RA-GEF-1 is essential for the proper development of the mouse cerebral cortex. 第 83 回日本生化学会大会・第 33 回日本分子生物学会年会合同大会 2010 年 12 月 10 日 神戸
8. Shymaa E. Bilasy, Takaya Satoh, Toshio Terashima, and Tohru Kataoka: The Rap1 guanine nucleotide exchange factor RA-GEF-1 is essential for the proper development of the mouse cerebral cortex. 第 33 回日本神経科学大会 2010 年 09 月 04 日 神戸
9. Takuji Aoki, Shuji Ueda, Tohru Kataoka, and Takaya Satoh: Regulation of mitotic spindle formation by the RhoA guanine nucleotide exchange factor ARHGEF10. 第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 10 日 横浜
10. 金村星余, 佐藤孝哉, 上田修司, Shymaa E. Bilasy, 平島正則, 片岡徹: マウス胎生期の血管形成における RA-GEF-1 の機能解析. 第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 22 日 神戸
11. 寺島俊雄, Shymaa E. Bilasy, 佐藤孝哉, 上田修司, Ping Wei, 金村星余, 饗場篤, 片岡徹: 背側終脳特異的 RA-GEF-1 ノックアウトマウスは大脳皮質ヘテロトピアと交連線維系の欠損を示す. 第 32 回日本神経科学大会 2009 年 09 月 16 日 名古屋

[図書] (計 4 件)

1. Takaya Satoh: ACK1. Encyclopedia of Signaling Molecules (Sangdun Choi, ed; Springer) 印刷中(2012)
2. 佐藤孝哉: 低分子量 G タンパク質. 「キーワードで理解するシグナル伝達イラストマップ (改訂版)」 (山本雅, 仙波憲太郎, 山梨祐司 編, 羊土社) 印刷

- 中(2012)
3. 佐藤孝哉:「デブリン 生化学(第7版)」  
(上代淑人, 井原康夫, 渋谷正史 監訳,  
丸善)(原著:Thomas M. Devlin "Textbook  
of Biochemistry: With Clinical  
Correlations Seventh Edition" John  
Wiley & Sons, Inc.) 第3章(翻訳)印  
刷中(2012)
  4. 佐藤孝哉:「シグナル伝達-生命システムの  
情報ネットワーク- (第2版)」(上代  
淑人, 佐藤孝哉 監訳, メディカル・サ  
イエンス・インターナショナル)(原著:  
Bastien D. Gomperts, Ijsbrand M.  
Kramer, Peter E. R. Tatham "Signal  
Transduction Second Edition" Academic  
Press/Elsevier Inc.) 監訳、第1章 / 第  
2章 / 第3章 / 第4章 / 第19章(翻訳)  
(2011)

〔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.b.s.osakafu-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 孝哉 (SATOH TAKAYA)

大阪府立大学・大学院理学系研究科・教授  
研究者番号: 20251655

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし