

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 12 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591348

研究課題名（和文） MLL と融合蛋白を形成する LARG の核内標的分子の同定と核内機能解析

研究課題名（英文） The function of LARG in the nucleus

研究代表者

鈴木 信周 (Suzuki Nobuchika)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任助教

研究者番号：90247007

研究成果の概要（和文）：RH-RhoGEF ファミリーの一員である p115RhoGEF (guanine nucleotide exchange factor for Rho)は、核内に移行して蛋白複合体を形成し、HL60 白血病細胞株の分化に関与している。

研究成果の概要（英文）：The signal through p115RhoGEF in the nucleus, collaborating with the canonical $G\alpha_{13}$ -p115RhoGEF~RhoA pathway at the plasma membrane, may regulate the differentiation of HL60 cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児血液学

1. 研究開始当初の背景

Leukemia-Associated RhoGEF (LARG)は、 $G\alpha$ サブユニットの内因性 GTP 水解活性を促進する RGS(Regulator of G protein Signaling) Homology ドメイン (RH)を有する Rho 活性化因子(RH-RhoGEF)の一員である。私たちは、LARG が、三量体 G 蛋白質の一つ、G12 ファミリー(G12/G13)によって直接活性化され、低分子量 G 蛋白質 Rho のグアニンヌクレオチド変換を促進するとともに、 $G\alpha$ サブユニットを

不活化することを既に報告している。このように、LARG は G 蛋白質共役型受容体(GPCR)のある膜近傍で機能するものと一般に考えられていた。Leukemia-Associated RhoGEF (LARG)は、元来、急性骨髄性白血病患者より、mixed lineage leukemia (MLL)と融合蛋白を形成するパートナーとして同定された。MLL 融合遺伝子の発現は小児白血病の 70%にみられ、非常に予後不良であることが知られている。MLL 融合タンパクは造血幹細胞の

みでなく、分化した白血球にも本来を持たない自己複製能や幹細胞様遺伝子発現プログラムを与え、白血病幹細胞化させる。50種ほどの融合パートナーの多くが DNA 結合蛋白であり、その解析は進んでいるが、LARG の様な本来細胞質にあると思われる蛋白の核における意義については不明な点が多かった。一方で、私たちは、独自に作成したポリクロナール抗体を用いた蛍光免疫細胞染色により、LARG が核内にも存在することを見いだしていた。実際、他の RhoGEF または RGS 蛋白も、細胞質-核シャトリングをおこし、核において転写制御に関わることも示唆されている。そこで、LARG 自身が造血細胞の分化・自己複製機能に関する遺伝子発現調節に核内で何らかの機能を果たしているのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

そこで、本課題では LARG の核内機能とその標的分子の同定を目標として研究を開始した。経過中、HL60 細胞株においては、LARG ではなくそのホモログの p115RhoGEF が重要な役割を果たしていることが解ったため、p115RhoGEF の核内機能を中心に解析した。特に次の 2 点、

(1) LARG の細胞質-核シャトリング制御機構の解明

(2) LARG の核内標的分子の同定・核内機能の解析

明らかにして、p115RhoGEF の HL60 細胞の分化における役割を明らかにするのが目的である。

3. 研究の方法

p115RhoGEF 抗体を用いたショットガンプロテオミクスによる核内標的分子の同定と、形成される複合体の分子生物学的・生化学的な解析が軸となった。

(1) 実験モデルとして、HL60 白血病細胞の ATRA や PMA による好中球や、マクロファージへの分化系のシステムを用いる。

(2) p115RhoGEF 特異的・高親和性モノクローナル抗体の開発

(3) p115RhoGEF の核内標的分子の同定：
1 で得られたモノクローナル抗体を用いて、高感度免疫沈降法による、核内 LARG 蛋白複合体の LC-MS 解析（ショットガンプロテオミクス）をして、核において LARG と複合体を形成している分子を同定する。

(4) p115RhoGEF の細胞質-核シャトリング制御機構の解明：生化学的な実験においては細胞分画法により、細胞質と核成分を分離する。それぞれの細胞分画成分についてショットガンプロテオミクスを行い、比較することで、核内 p115RhoGEF の蛋白質修飾の同定を行う。修飾や部位が同定されれば、点変異体を作製して、細胞に強制発現して、細胞内局在を蛍光免疫細胞染色等を行い観察する。

(5) レンチウイルスを用いて、p115RhoGEF を HL60 細胞に強制発現させたり、ノックダウンすることで、HL60 細胞の分化に及ぼす影響を、フローサイトメトリーを用いて解析する。

4. 研究成果

私達は、“RH-RhoGEF 自身が、直接細胞悪性化に関与する” という仮説を立て、白血病細胞 HL60 の分化誘導系を用いて今まで不明であった RH-RhoGEF の核内標的分子の同定と核内機能解析を遂行した。その結果、RH-RhoGEF が HL60 細胞分化を誘導する事を見出した。

(1) HL60 細胞の分化誘導時に、核と細胞質で p115RhoGEF の著明に蛋白発現が増加した。

(2) 内因性 RH-RhoGEF を認識できる高感度

特異的なモノクローナル抗体を」開発した。

(3) ショットガンプロテオミクスによる RH-RhoGEF の新たなターゲットを同定した。

(4) 核内 RH-RhoGEF が、転写抑制因子 RFP (Ret Finger Protein、TRIM27)、細胞増殖抑制作用を持つと考えられている PML (Promyelocytic Leukemia、TRIM19) と分化に応じて動的な蛋白複合体を形成する可能性が示唆された。

(5) RH-RhoGEF の HL60 細胞への強制発現により分化促進作用を観察した。

(6) HL60 細胞分化に応答して修飾される p115RhoGEF のリン酸化部位の同定、リン酸化による細胞質-核シャトリング制御機構について明らかにすることができた。

今後、RH-RhoGEF の急性骨髄性白血病細胞分化促進機構のより詳細な分子機構の解析ができれば、新しい分化誘導療法の開発のための低分子化合物の開発に発展できると考える。

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 4 件)

1. KOZASA, T., HAJICEK, N., CHOW, C. R. & SUZUKI, N. 2011. Signalling mechanisms of RhoGTPase regulation by the heterotrimeric G proteins G12 and G13. *J Biochem*, 150, 357-69

2. IWANARI, H., NAKADA-NAKURA, Y., KUSANO-ARAI, O., SUZUKI, N., KODAMA, T., SAKIHAMA, T. & HAMAKUBO, T. 2011. A method of generating antibodies against exogenously administered self-antigen by manipulating CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol Methods*, 369, 108-14.

3. SUZUKI, N., HAJICEK, N. & KOZASA, T. 2009a. Regulation and physiological functions of G12/13-mediated signaling pathways. *Neurosignals*, 17, 55-70.

4. SUZUKI, N., TSUMOTO, K., HAJICEK, N., DAIGO, K., TOKITA, R., MINAMI, S., KODAMA, T., HAMAKUBO, T. & KOZASA, T. 2009b. Activation of leukemia-associated RhoGEF by Galpha13 with significant conformational rearrangements in the interface. *J Biol Chem*, 284, 5000-9.

[学会発表] (計 3 件)

1. Gordon Research conference, Phosphorylation & G-Protein Mediated Signaling Networks (University of New England / 6/10/2012 - 6/15/2012), The role of p115RhoGEF during differentiation of human myeloid HL60 leukemia cells

2. 日本生化学会(2011年9月24日京都) The role of the RH-RhoGEF signaling pathway in differentiation of human myeloid HL60 leukemia cells

3. 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会 (神戸ポートアイランド、2010/12/7-10) The role of the G13~RH-RhoGEF signal pathway in differentiation of human myeloid HL60 leukemia cells

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 : 権利者 :

種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.lsbm.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 信周 (Suzuki Nobuchika)
東京大学・先端科学技術センター・特任助教
研究者番号：90247007

(2) 研究分担者

小笹 徹 (Kozasa Tohru)
東京大学・先端科学技術センター・特任教授
研究者番号：70202059

(3) 研究分担者

川村 猛 (Kawamura Takeshi)
東京大学・先端科学技術センター・特任助教
研究者番号：70306835