

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657127

研究課題名（和文） ガイダンスシグナル破綻による発ガンの機構

研究課題名（英文） Molecular mechanism of cancer induction -failure in regulation of guidance signalling

研究代表者 生沼 泉 (OINUMA IZUMI)

京都大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：40452297

研究成果の概要（和文）：本研究で、我々は、がん細胞において、ガイダンス因子シグナル破綻により、活性が亢進することが知られている低分子量 G タンパク質、R-Ras の、細胞内情報伝達機構を明らかにした。生化学的実験により、R-Ras の新奇エフェクターとして、アクチン骨格制御タンパク質の Lamellipodin を同定した。その上で、R-Ras-Lamellipodin の経路が、反発性ガイダンス因子シグナルの下流で駆動されるシグナル伝達経路であることを、確かめた。

研究成果の概要（英文）：In this project, we revealed the signal transductions of a small GTPase R-Ras. In cancer cells, R-Ras activity is reported to be increased by miss-regulation of guidance factors. Through biochemical research, we identified Lamellipodin as a novel effector for R-Ras. We also confirmed that the R-Ras-Lamellipodin pathway is utilized by the guidance factor signaling.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：R-Ras、低分子量 G タンパク質、ガイダンス因子、アクチン、セマフォリン

1. 研究開始当初の背景

現在までに、様々な軸索ガイダンス因子が同定されており、その作用から大きく 2 つのグループに分類され、1 つは軸索を誘引する因子で、netrin や、NGL-1 が知られている。もう 1 つのグループは、軸索を反発させる因子で、semaphorin (Sema) ファミリー、slit ファミリー、ephrin ファミリーなどである。また、これらの因子に対する受容体も次々に同定されている。しかしながら、これらのガイダンス因子がどのような分子機構で軸索誘導を引き起こすのかという研究は、まだ、始まったばかりである。さらに、最近の報告によって、元来、神経系におけるガイダンス因子として同定された Sema が、がん細胞の転移・浸潤に関わっていることが、わかって

きており、転移能の高く悪性度の高いがん細胞においては、Sema やその受容体の Plexin に変異が入っており、機能できなくなっていることがわかってきている。Plexin ファミリーの細胞内領域には、種をこえてとてもよく保存された領域、C1 および C2 がある。この領域が、Ras ファミリーの 1 つ、R-Ras に対する GAP を直接コードしており、細胞膜を伸展させる R-Ras の活性を負に制御することにより、神経細胞の成長円錐の縮退を引き起こすことを、我々は以前の研究で明らかにしていた。また、R-Ras は細胞接着因子受容体インテグリンを活性化するが、Plexin はその R-Ras GAP 活性により、インテグリンの活性化を抑制し、神経軸索の伸長を抑制し、さらに、神経細胞以外の培養細胞においても、

インテグリン依存的な細胞運動を抑制することを、明らかにしていた。Semaに加えて、**ephrin**も代表的な反発性ガイダンス因子であり、その受容体は**Eph**で、チロシンキナーゼ活性を持つ。最近の報告で、**Eph**が**R-Ras**をチロシンリン酸化することにより、**R-Ras**の活性を抑制し、軸索の反発性作用を發揮することがわかってきた。また、このリン酸化による**R-Ras**活性制御以外にも、**R-Ras**に対する**GAP**が受容体**Eph**の細胞内領域に直接結合し、**R-Ras GAP**活性を示すことでも、**ephrin/Eph**は**R-Ras**を不活性化する。このことから、**R-Ras**が様々なガイダンス因子シグナルで活性を受けることが明らかになってきている。しかしながら、**R-Ras**そのものの情報伝達機構はほとんどわかっていない。また、様々なガイダンス因子が**R-Ras**の活性を制御することがわかってきているが、**Sema**やその受容体の**Plexin**以外に関しては、がん細胞の悪性度との関連性の報告はない。

2. 研究の目的

本研究は、軸索ガイダンス因子の細胞内伝達で、その活性制御が重要な役割を果たすことが明らかになってきたにもかかわらず、いまだその細胞機能がほとんど知られていない**Ras**ファミリー低分子量**G**タンパク質の1つ、**R-Ras**の情報伝達機構の解明をすることを目的とする。**R-Ras**は神経系に限らず、幅広い組織で発現している。このことから、**R-Ras**の情報伝達経路の解明を行うことにより、神経系のみならず、幅広い細胞腫においてのガイダンス分子の情報伝達の共通で基本的な機構の解明につなげることを目的として、研究を行う。

3. 研究の方法

研究前半では、主に、(1)**R-Ras**による細胞接着因子インテグリンの活性制御の分子機構、および、(2)**R-Ras**による細胞骨格因子の制御の分子機構について、生化学的手法を用いて明らかにする。

計画後半では、研究前半で同定した各分子について、各種ガイダンス因子シグナルとの関わり合いを、検証していく。

4. 研究成果

(1) **R-Ras**による細胞接着因子インテグリンの活性制御の分子機構について
がん細胞の転移・浸潤には、細胞の細胞外基質との接着の制御の破綻がある。われわれは、**R-Ras**による細胞接着因子、インテグリンの活性制御の分子機構を明らかにすることを試みた。酵母 two-hybrid 法を用い、活性化型 **R-Ras** に結合するタンパク質をラット脳 cDNA ライブラリーを対象にスクリーニングしたところ、**RIN2** が得られた。**RIN** ファミ

リータンパク質は **RIN1**、**2**、**3** で構成される分子で、各々の相同性は高く、分子内に低分子量 **G** タンパク質、**Rab5** の活性化ドメインや、**Ras** 結合ドメインを有するタンパク質で、これまでの報告で、種々のチロシンキナーゼ型受容体の受容体輸送に関わっているタンパク質である。また、**R-Ras** サブファミリーは、**R-Ras**、**TC21(R-Ras2)**、および **M-Ras(R-Ras3)** からなる。**GST-pull down** アッセイ、および免疫沈降法を用いた結合実験により、**RIN** ファミリーと **R-Ras** サブファミリーとの結合を調べた。その結果、**RIN1** および **RIN2** が **R-Ras** サブファミリーの全ての分子と結合し、さらに、その結合は **R-Ras** サブファミリーの活性依存的な結合であることがわかった。

つぎに、**R-Ras** サブファミリーと **RIN** の結合の意味を調べるために、神経系の突起伸長をモデルとして、評価することにした。とくに、**RIN1** の mRNA が海馬神経細胞の樹状突起発達期に上昇してくることから、**RIN** と **R-Ras** サブファミリーの結合の意義を、海馬神経細胞の樹状突起伸展で検討した。その結果、**RIN1** の過剰発現により樹状突起伸展が促進され、分枝数も増加することがわかり、このフェノタイプは、**R-Ras** サブファミリーの1つである、**M-Ras** の過剰発現によって得られるフェノタイプと類似していた。また、**RIN1** の中の **Ras** 結合ドメインを欠失させた変異体では、そのような突起伸展の促進は見られなかった。

以上の結果から、**RIN1** は **M-Ras** のエフェクターとして突起伸展の促進を担っていると考えられた。今後、この突起伸展がインテグリン受容体の活性を介したものであるかどうかを、インテグリンに対する中和抗体等で検討していく必要がある。

(2) **R-Ras** による細胞骨格因子の制御の分子機構について

ガイダンス因子刺激は、細胞骨格のダイナミックな変化を引き起こす。そこで、われわれは、**R-Ras** による細胞骨格制御因子の制御の分枝メカニズムの同定を行った。その結果、**Afadin** と **Lamellipodin** を同定した。

① **Afadin** について

これまでの研究で、**R-Ras** は神経軸索の形成に必要であることが明らかになっていた。しかしながら、どのような分子機構で軸索の形態を制御するかは不明であったので、われわれは **R-Ras** による軸索の形態制御に必要な下流のエフェクター分子の同定を試みた。酵母のツーハイブリッドシステムを用いた結合蛋白のスクリーニングにより、活性化型 **R-Ras** の結合蛋白質として、アクチン細胞骨

格に連結した足場蛋白質である Afadin を得た。Afadin は N 末端側に Ras 蛋白質ドメインを有する蛋白質で、*in vitro* での結合実験により、R-Ras は活性依存的に Afadin の RA ドメインに結合することが明らかになった。また、初代培養神経細胞における内在性 Afadin 蛋白質の発現を調べたところ、大脳皮質および海馬由来の神経細胞のいずれにおいても、Afadin は培養初期の軸索の形成時期に多く発現していることがわかった。また、培養 2 日目の初代培養大脳皮質神経細胞を用いた免疫沈降実験によって、内在性の R-Ras と Afadin の結合が確認された。

次に、初代培養大脳皮質神経細胞の軸索形態における R-Ras および Afadin の役割を検討した。活性型の R-Ras を大脳皮質神経細胞に発現させると、神経軸索の分枝化が引き起こされ、この分枝化は内在性 Afadin のノックダウンにより阻害されることがわかった。さらに、R-Ras および Afadin を過剰発現した際に見られる、軸索の分枝の亢進は、アクチン重合阻害剤で阻止された。

以上の結果から、神経細胞において R-Ras は Afadin を介して、アクチン細胞骨格系のリモデリングを介して、軸索の分枝化を制御することが示唆された。なお、この成果は米国細胞生物学会誌 (*Molecular Biology of the Cell*) に掲載され、その刊の表紙を飾った。今回の研究では、神経軸索をモデル系として、シグナル伝達経路の解明を行ったが、今後は、R-Ras-Afadin によるアクチン細胞骨格制御システムが、がん細胞の浸潤の際の浸潤突起などの突起形成にも共通の分子機構として働いているのかどうかを、検討していく。

② Lamellipodin について

R-Ras サブファミリーには R-Ras(R-Ras1)、TC21(R-Ras2)、および M-Ras(R-Ras3)があり、われわれは過去に、M-Ras が樹状突起の形態制御を行っているという研究結果を報告している。しかしながら、下流の分枝機構は不明であったので、M-Ras による樹状突起形成をモデル系として、その作用に必要な下流のエフェクターの同定を試みた。データベースを用いた結合蛋白質のスクリーニングにより、M-Ras の新奇結合蛋白質として、アクチン細胞骨格系制御因子 Ena/VASP 蛋白質の結合蛋白質である Lamellipodin (Lpd) を得た。

Lpd は N 末端側に Ras 蛋白質ドメインを有する蛋白質であり、*in vitro* での結合実験により、M-Ras は活性依存的に Lpd に結合することが明らかになった。また、大脳皮質初代培養神経細胞において、M-Ras と Lpd の内在性の結合が確認された。

次に、樹状突起形成における Lpd の役割を検討した。われわれは以前の報告で、活性型

の M-Ras (M-RasQL) を過剰発現させると、大脳皮質神経細胞において樹状突起伸長が引き起こされることを明らかにしている。この条件において、内在性の Lpd を shRNA を用いてノックダウンしたところ、M-RasQL による樹状突起伸長が抑制された。以上の結果から、Lpd は M-Ras による樹状突起伸長作用に必須であることが明らかになった。

さらに、ガイダンス因子のさらなる普遍的役割を解明することができた。われわれは以前の報告で、反発性ガイダンス因子 Sema 受容体、Plexin はそれ自身の持つ R-Ras GAP 活性により直接的に R-Ras を不活性化し、神経細胞の軸索に対して反発作用を示すことを明らかにしているが、Sema 刺激によって軸索に加え、樹状突起が退縮し、それに伴ってアクチン骨格が樹状突起の先から消えて無くなっていることがわかった。さらに、これらの樹状突起の分枝の退縮やアクチン骨格の消失は、M-RasQL を導入しておいてやることで、阻止され、Sema による樹状突起の分枝の退縮には受容体の Plexin が M-Ras に対する GAP 活性を発揮して M-Ras の活性を抑制することで、アクチン骨格の崩壊を引き起こすことが必要であることが明らかになった。

さらに、分子メカニズムを詳細に検討したところ、活性型である M-RasQL は Lpd に結合してそれを細胞膜へ運ぶ作用があることが生化学的な分画実験により明らかになった。一方で、不活性型である M-RasSN にはそのような作用はなかった。このことから、Lpd は M-Ras の活性依存的に細胞膜へ運ばれると考えられる。大脳皮質神経細胞に Sema 刺激を加えると、膜画分に存在する Lpd の量が減少していた。Lpd を強制的に細胞膜に移行させる CAAX シグナルを付加した Lpd-CAAX を大脳皮質神経細胞に発現させておいた神経細胞では、Sema によって引き起こされる樹状突起の退縮が阻止された。

これらの結果から、Sema が無い状態では受容体のプレキシンが活性化されていないため、樹状突起内の M-Ras の活性が高いため、Lpd が樹状突起の先端の細胞膜へ運ばれ、アクチン骨格系の伸長が起こるが、Sema が存在すると、受容体の Plexin の GAP 活性が活性化され、樹状突起内の M-Ras が不活性化状態に変換されることによって、ラメリポディンが樹状突起の先端の細胞膜へ運ばれなくなり、アクチン骨格系の伸長が抑制されるということが示唆された。

なお、今回の成果は米国神経科学学会誌 (*The Journal of Neuroscience*) に掲載され、その内容は 6 月 13 日 (京都新聞 (夕刊 6 面)) および 8 月 6 日 (読売新聞の科学 MONDAY (朝刊 31 面)) において新聞報道された。今回の研究では、神経樹状突起をモデル系として、シグナ

ル伝達経路の解明を行ったが、今後は、R-Ras-Lpd によるアクチン細胞骨格制御システムが、がん細胞の浸潤の際の浸潤突起などの突起形成や、細胞運動の亢進にも共通の分子機構として働いているのかどうかを、検討していく。

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 3 件)

(1) Gen-ichi Tasaka, Manabu Negishi, Izumi Oinuma.

Semaphorin 4D/Plexin-B1-mediated M-Ras GAP activity regulates actin-based dendrite remodeling through Lamellipodin. *The Journal of Neuroscience* 32: 8298~8305 (2012) 査読有
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0799-12.2012.

(2) Nariaki Iwasawa, Manabu Negishi, Izumi Oinuma

R-Ras controls axon branching through afadin in cortical neurons. *Molecular Biology of the Cell* 23: 2793~2804 (2012) 査読有
DOI: 10.1091/mbc.E12-02-0103.

(3) Izumi Oinuma, Kana Kawada, Kiyoka Tsukagoshi, and Manabu Negishi

Rnd1 and Rnd3 targeting to lipid raft is required for p190 RhoGAP activation. *Molecular Biology of the Cell* 23: 1593~1604 (2012) 査読有
DOI: 10.1091/mbc.E11-11-0900.

[学会発表] (計 7 件)

(1) 生沼 泉

神経回路形成における R-Ras サブファミリーの役割

第 3 5 回日本神経科学大会、サテライトシンポジウム

2012 年 9 月 19 日 名古屋国際会議場

(2) Izumi Oinuma

R-Ras family GTPases in semaphorin signaling

日米脳科学情報交換セミナー “Growth cones and axon regeneration: Entering the age of informatics”

2012 年 10 月 10 日 ヒルトンニューオリンズ (アメリカ合衆国)

(3) 岩澤 成晃、生沼 泉、根岸 学

1-afadin は海馬神経細胞において R-Ras のエフェクターとして機能し、軸索の分枝化を

促進する

第 8 4 回日本生化学会大会

2011 年 9 月 23 日 国立京都国際会館

(4) 田坂 元一、生沼 泉、根岸 学

大脳皮質ニューロンにおいて M-Ras は Lamellipodin を細胞膜に運ぶことにより樹状突起伸長を制御する

第 8 4 回日本生化学会大会

2011 年 9 月 22 日 国立京都国際会館

(5) 根岸 学、生沼 泉

神経突起形成における R-Ras サブファミリーの役割

第 8 4 回日本生化学会大会

2011 年 9 月 21 日 国立京都国際会館

(6) 岩澤 成晃、生沼 泉、根岸 学

海馬神経細胞においてアクチン結合分子である 1-afadin は R-Ras の下流で軸索の分枝化を制御する

第 3 4 回日本神経科学大会

2011 年 9 月 17 日 パシフィコ横浜

(7) 田坂 元一、生沼 泉、根岸 学

M-Ras の新奇エフェクターである Lamellipodin はアクチン骨格系の制御により樹状突起伸長を制御する

第 3 4 回日本神経科学大会

2011 年 9 月 15 日 パシフィコ横浜

[その他]

ホームページ等

研究成果は以下のホームページに掲載している。

(1) 研究室ホームページ

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/negishi/i/j/toppu.html>

(2) 個人ホームページ

http://sakura.canvas.ne.jp/spr/izumi_presto

6. 研究組織

(1) 研究代表者

生沼 泉 (OINUMA IZUMI)

京都大学・大学院生命科学研究所・助教

研究者番号：40452297

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし