

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390060

研究課題名(和文) G12/13-RhoGEFシグナル伝達系分子機構の解明

研究課題名(英文) the mechanism of RH-RhoGEF activation by G12/13

研究代表者

小笹 徹 (Kozasa, Tohru)

東京大学・先端科学技術研究センター・特任教授

研究者番号：70202059

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は今回新たにG<sub>12</sub>とp115RhoGEFのRHドメインの複合体結晶構造を決定した。先に報告したG<sub>13</sub>とp115RhoGEFのRHドメインの複合体構造と比較して、p115RhoGEF活性化の違いを結晶レベルで解明した。大腸癌細胞においてGRP受容体-G<sub>13</sub>-PDZ-RhoGEFシグナルが作用し、癌細胞の転移浸潤に関わっていることを明らかにした。更に、急性骨髄性白血病細胞の分化系システムをプロテオミクス解析する事で、新規RH-RhoGEFシグナルが分化の過程で作動していることを発見した。

研究成果の概要(英文)：RH-RhoGEFs (Rho guanine nucleotide exchange factor containing a regulator of G protein signaling homology domain) including PDZ-RhoGEF, p115RhoGEF, and leukemia-associated RhoGEF potentiated by direct binding with activated heterotrimeric G proteins G12/13 have been thought to play a pivotal role in malignancy progression through the small GTPase RhoA activation. Here we describe a key mechanism for GRPR-regulated colon cancer cell migration through the G<sub>13</sub>-PDZ-RhoGEF-RhoA-ROCK pathway. We have also found that GEF-independent function of p115RhoGEF, one of RH-RhoGEFs promotes differentiation of human leukemic cells. In addition, we successfully solved the crystal structure of G<sub>12</sub> and the RH domain of p115RhoGEF. We are solving the mechanism by which p115RhoGEF is activated by G<sub>13</sub>, but not G<sub>12</sub>.

研究分野：生化学

キーワード：G蛋白質 癌細胞

## 1. 研究開始当初の背景

Gタンパク質共役受容体(GPCR)を介する細胞情報伝達系は多様な細胞外シグナルの受容に用いられる分子機構で、三量体型Gタンパク質を介して下流のエフェクター分子の活性を制御することによりほとんどすべての生理機能に関与している。現在使われている薬物の半数以上がGPCRを標的とすることからも明らかのように、GPCRは薬物の標的分子としても極めて重要である。

特にG12/G13を介する伝達系は、細胞の増殖や癌化に関連が深いことが報告されている。しかし、その分子機構には未だ不明の点が多い。研究代表者はp115RhoGEF (RhoGTPaseに対するグアニンヌクレオチド交換因子)をG12/13の直接のエフェクターとして世界に先駆けて同定した(Kozasa et al. *Science* 280, 2109-11, Hart et al. *Science* 280, 2112-2114, 1998)。これは全く新しいGPCR伝達系の発見であり、細胞外刺激がGPCRを介してRhoGTPaseの活性を制御する分子機構を解明した点で重要である。哺乳動物細胞ではG $\alpha$ 12/13のエフェクターとして機能するRhoGEFとしてp115RhoGEF, LARG, PDZ-RhoGEFの三種がRGS-RhoGEFファミリーを形成している。これらのRhoGEFはアミノ末端にG $\alpha$ 12/13と特異的に相互作用をするRGS (Regulator of G protein Signaling)ドメインを有し、このG $\alpha$ -RGSの相互作用がDH/PHドメインの構造変化をもたらしてRhoを活性化すると考えられる。更に、G12/13-伝達系は細胞増殖、癌細胞の転移や浸潤で重要な役割を果たしている。野生型G $\alpha$ 12は、NIH3T3の発癌遺伝子として同定された唯一のG $\alpha$ サブユニットであり、LARGは急性骨髄性白血病でMLL融合遺伝子として同定された。更に最近、前立腺癌、乳癌、卵巣癌などの癌の転移浸潤にG12/13シグナルが重要であることが示された。また、GRP, S1Pな

どのG12/13共役GPCRの異所性過剰発現が乳癌、大腸癌などを含む様々な癌において高率に報告されている。更に、我々は細胞接着因子受容体のインテグリンの細胞内ドメインとG $\alpha$ 13の直接相互作用がRhoAの活性化を調節して細胞接着能を制御することを示した(Gong H et al.: *Science* 237: 340-343, 2010)。これにより、細胞接着、癌転移などに関わるインテグリン系とG13-RhoGEF伝達系とのネットワークがはじめて明らかになった。上記の結果は、G12/13-RhoGEFシグナル伝達系が発癌、癌転移あるいは浸潤に重要であることを強く示唆している。

## 2. 研究の目的

本計画では、G12/13-RhoGEFシグナル制御の複合体の構造解析、生化学的解析、および癌細胞でのプロテオミクス解析を行いG12/13-RhoGEF伝達系の分子機構を詳細に理解することを目指す。

主に以下の3つを目的とした。

(1) **G $\alpha$ 12/13-RhoGEFの複合体の構造と機能の解析**: 本計画では、G $\alpha$ 13、RGS-RhoGEF及びRhoの三者複合体を精製してその結晶構造を明らかにする。G $\alpha$ 12とG $\alpha$ 13は相同なG $\alpha$ であるが機能的には明らかな違いがある。そこで、G $\alpha$ 12とRGS-RhoGEFの複合体構造を決定し、G $\alpha$ 13の複合体の構造と比較して両者の機能の差を理解する。

(2) **RGS-RhoGEFのリン酸化修飾と機能の解析** RhoGEFメンバーの多くはリン酸化修飾によりその機能が制御されている(Schmidt and Hall *Genes Dev* 16, 1587-1609, 2002)。RGS-RhoGEFも細胞内でリン酸化修飾を受け、特にLARGのチロシンリン酸化はG $\alpha$ 12との共役に必須である(Suzuki et al. *PNAS* 100, 733-8, 2003)。本計画ではRGS-RhoGEFの細胞内でのリン酸化修飾の

解析を行い、その機能を解明する。

(3) **G12/13-RhoGEF シグナル伝達系のプロテオミクス解析**  $G\alpha_{12/13}$  あるいは RGS-RhoGEF に対するモノクローナル抗体を用いて、癌細胞より内在性のシグナル複合体を免疫沈降しショットガンプロテオミクス解析を行い、相互作用するタンパク質を同定する。また、G12/13 共役型の GPCR のアゴニスト刺激に伴うシグナル複合体の変化を解析する。

### 3. 研究の方法

(1)  **$G\alpha_{12/13}$ -RhoGEF の複合体の構造と機能の解析**: 研究代表者は、現在までに  $G\alpha_{12/13}$  単体、及び  $G\alpha_{13}$  と p115RhoGEF の RGS ドメイン複合体の X-線結晶構造を明らかにした (Kreutz et al. Biochemistry 45, 167-74, 2006, Hajicek et al. J Biol Chem. 286:20625-20636 (2011) この構造解析と SPR による相互作用の解析より  $G\alpha_{13}$  の RGS ドメインへの結合がアロステリックに DH/PH ドメインの構造を変化させ、RhoGEF 活性化をもたらすことを明らかにした (Suzuki et al. JBC 284, 500-9, 2008) (図3)。今後、更に  $G\alpha_{13}$ -RhoGEF 伝達系を理解するためには、RGS, PH/DH ドメインを含む RGS-RhoGEF と  $G\alpha_{12/13}$  の複合体の結晶構造を決定することが極めて重要である。しかし最近の実験から、精製した p115RhoGEF では RGS ドメインと DH/PH ドメインの間のリンカー領域が構造上極めて不安定なため、その結晶化を妨げていることが明らかとなった。そこで、p115 と LARG についてこのリンカー領域の欠失変異体作成し、これらの変異体について HeLa 細胞を用いて SRE (Serum Responsive Element) のルシフェラーゼレポーターアッセイ、GTP 結合 Rho の pull-down アッセイを行い、活性型  $G\alpha_{13}$  により RhoGEF が活性化されるような欠失変異体を選択する。上記アッセイで選ばれた変異体について、

そのリコンビナントタンパク質を Sf9-バキュロウイルス系を用いて発現精製し、 $G\alpha_{13}$ -RhoGEF 二者複合体及び  $G\alpha_{13}$ -RhoGEF-Rho 三者複合体を調製する。これら複合体について結晶条件のスクリーニングを行い、X-線結晶構造を決定する。

### (2) **RGS-RhoGEF のリン酸化修飾と機能の解析**

: 研究代表者は内在性の p115RhoGEF を認識する特異的モノクローナル抗体を作製し、川村らと共同で HL60 細胞の分化に伴う p115 の特異的リン酸化部位を高感度質量分析計を用いて同定することに成功した。図4に示すように、細胞分化特異的にリン酸化部位が同定された。本研究計画では、この手法を用いて種々の癌細胞における RGS-RhoGEF のリン酸化部位の特定と、その機能に及ぼす影響を解析する。PDZ-RhoGEF についても、モノクローナル抗体が得られている。各モノクローナル抗体を低ノイズ磁気ビーズに固定化し、癌細胞株 (MCF-7, T47D, PC-3 など) から内在性の RGS-RhoGEF を免疫分離し、オービトラップ質量分析計を用いてリン酸化修飾部位を同定する。課題1の複合体構造から RhoGEF の機能に影響を及ぼすと予想されるリン酸化部位について、リン酸化欠損あるいは疑似リン酸化変異体を作製して再構成実験を行いその機能を解析する。

### (3) **G12/13-RhoGEF シグナル伝達系のプロテオミクス解析**

: 癌と G12/13 シグナルの関連を解明するためには、がん細胞 (での  $G\alpha_{12/13}$  あるいは RGS-RhoGEF を含むシグナル複合体のプロテオミクス解析が重要と考える。各タンパク質に対する抗体を用いて癌細胞株 (例えば HL60, Caco2, MCF-7) から免疫沈降を行い、細胞周期や分化段階のそろった細胞を FACS と細胞分配機で集め内在性のシグナル複合体をショットガンプロテオミクスで網羅的に解析する。新規タンパク質が同定されれば、そ

の機能について更に解析を進め、癌細胞における G12/13 を介したシグナルネットワークを明らかにする。

#### 4. 研究成果

我々は今回新たに G 12 と p115RhoGEF の RH ドメインの複合体結晶構造を決定した。先に報告した G 13 と p115RhoGEF の RH ドメインの複合体構造と比較して、p115RhoGEF 活性化の違いを結晶レベルで解明した。大腸癌細胞において G13 受容体～G 13～PDZ-RhoGEF シグナルが作用し、癌細胞の転移浸潤に関わっていることを明らかにした。更に、急性骨髄性白血病細胞の分化系システムをプロテオミクス解析する事で、新規 RH-RhoGEF シグナルが分化の過程で作動していることを発見した。

#### 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 7 件)

1. G 13/PDZ-RhoGEF/RhoA signaling is essential for gastrin-releasing peptide receptor-mediated colon cancer cell migration.  
Patel M, Kawano T, Suzuki N, Hamakubo T, Karginov AV, Kozasa T.  
Mol Pharmacol. 2014 Sep;86(3):252-62.  
doi: 10.1124/mol.114.093914.
2. Different Raf protein kinases mediate different signaling pathways to stimulate E3 ligase RFFL gene expression in cell migration regulation.  
Gan X, Wang C, Patel M, Kreutz B, Zhou M, Kozasa T, Wu D.  
J Biol Chem. 2013 Nov 22;288(47):3978-84.  
doi:10.1074/jbc.M113.477406.

3. G protein-dependent basal and evoked endothelial cell vWF secretion.  
Rusu L, Andreeva A, Visintine DJ, Kim K, Vogel SM, Stojanovic-Terpo A, Chernaya O, Liu G, Bakhshi FR, Haberichter SL, Iwanari H, Kusano-Arai O, Suzuki N, Hamakubo T, Kozasa T, Cho J, Du X, Minshall RD.  
Blood. 2014 Jan 16;123(3):442-50.  
doi: 10.1182/blood-2013-03-489351.
4. A computational model predicts that G 12 acts at a cleft between channel subunits to activate GIRK1 channels.  
Mahajan R, Ha J, Zhang M, Kawano T, Kozasa T, Logothetis DE.  
Sci Signal. 2013 Aug 13;6(288):ra69.  
doi: 10.1126/scisignal.2004075.
5. Modification of p115RhoGEF Ser(330) regulates its RhoGEF activity.  
Chow CR, Suzuki N, Kawamura T, Hamakubo T, Kozasa T.  
Cell Signal. 2013 Nov;25(11):2085-92.  
doi: 10.1016/j.cellsig.2013.06.012.  
Epub 2013 Jun 29.
6. Structural and functional analysis of the regulator of G protein signaling 2-g q complex.  
Nance MR, Kreutz B, Tesmer VM, Sterne-Marr R, Kozasa T, Tesmer JJ.  
Structure. 2013 Mar 5;21(3):438-48.  
doi: 10.1016/j.str.2012.12.016.
7. PRR5L degradation promotes mTORC2-mediated PKC-phosphorylation and cell migration downstream of G 12.

Gan X, Wang J, Wang C, Sommer E, Kozasa  
I, Srinivasula S, Alessi D, Offermanns  
S, Simon MI, Wu D.  
Nat Cell Biol. 2012 May  
20;14(7):686-96. doi:  
10.1038/ncb2507.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

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