

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔平成29年度研究進捗評価用〕

平成26年度採択分  
平成29年3月10日現在

**Girdin ファミリー分子の機能と精神神経疾患・がんの  
病態形成における役割**

Functional analyses of Girdin family proteins in  
psycho-neurologic disorder and cancer

課題番号：26221304

高橋 雅英 (TAKAHASHI MASAHIDE)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授



研究の概要

申請者らが発見し、研究を進めてきたアクチン結合蛋白 Girdin は運動する細胞の先端で Akt キナーゼによりリン酸化を受け、アクチン線維の再構成を引き起こすことによりがん細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞、成体脳の新生ニューロンの運動を制御している。本研究の目的は、Girdin およびそのファミリー分子 Daple によって制御される細胞機能の詳細な分子機構および精神神経疾患・がんの病態形成における役割を各種遺伝子改変マウスの作成、結合蛋白の同定による機能解析を通じて、明らかにすることである。

研究分野：実験病理学

キーワード：Girdin、Daple、細胞運動、精神神経疾患、がん

1. 研究開始当初の背景

われわれはセリン・スレオニンキナーゼ Akt の新規基質として Girdin(girders of actin filaments)と名付けたアクチン結合蛋白を同定し、培養細胞およびノックアウトマウスを用いてその機能解析を進めてきた。Girdin は Akt によるリン酸化で機能制御を受けることで、血管新生、神経新生およびがんの進展など生理的、病的現象に関わる細胞運動を制御することが明らかになりつつある。興味深いことにノックアウトマウスの解析から、Girdin の機能は胎生期の発生過程には重要ではなく、生後から成体期に観察される血管新生および海馬歯状回や脳室下帯における神経幹細胞からの神経新生に特異的に関与していることが明らかになった。さらに、Girdin ファミリー分子である Daple が Wnt シグナルの下流で Dishevelled(Dvl) と結合することにより Rac 活性を制御し、がん細胞や線維芽細胞の運動に関与していることも明らかにした。

2. 研究の目的

以上の背景をもとに、本研究では (1) Girdin およびそのファミリー分子 Daple による細胞運動制御を含む細胞内機能の詳細な分子機構と (2) これらの分子の精神神経疾患およびがんの病態形成における役割の解明をめざすことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) Girdin および Daple の精神神経疾患およびがんにおける分子病態に果たす役割

Girdin のノックアウトマウスや Akt キナーゼによってリン酸化を受けるアミノ酸に変異を導入したノックインマウスを用いて、神経機能に関わる Girdin の役割の解明を病理組織学的、細胞生理学的、行動解析により進める。Daple ノックアウトマウスを用いて、Daple が神経発生および神経機能にどのような異常が生じるかを解明する。Girdin および Daple のノックアウトマウスあるいはノックインマウスに腫瘍を移植し、Girdin あるいは Daple の機能を有しないホストの微小環境が腫瘍増殖に及ぼす影響について解析する。

(2) Girdin および Daple の細胞内結合タンパクの同定と機能解析

Girdin と Daple のドメイン依存的に結合する分子群をアフィニティークロマトグラフィー、免疫沈降法、質量分析法を組み合わせた方法で包括的に同定し、これらの分子と Girdin あるいは Daple との複合体形成ががん細胞や神経細胞の運動能、生理機能に果たす役割を明かにする。

(3) Girdin の EGF receptor および Src キナーゼのリン酸化による機能制御

Girdin のチロシン 1764 と 1798 のリン酸化の意義を明らかにするため、これらのチロシンに変異を導入したノックインマウスを作成する。個体レベルで Girdin チロシンリン酸化の細胞運動能など細胞機能における意義について解析する。

4. これまでの成果

(1-1) Girdin の精神神経疾患およびがんに

### おける分子病態に果たす役割

1)常染色体劣性遺伝を示すヒト PEHO-like syndrome (小頭症、てんかん発作などを示す)における Girdin (CCDC88A)変異をイギリスのグループとの共同研究により世界で初めて同定に成功した。

2)Girdin の Akt のリン酸化がシナプス形成、長期記憶に果たす役割を明らかにした。海馬神経細胞において BDNF/TrkB シグナルと NMDA 受容体シグナルが Girdin のリン酸化を介してクロストークし、記憶の形成に関与する新たな機序を示した。

3)リン酸化 Girdin の腫瘍微小環境における役割、特にがん関連線維芽細胞内における Akt-Girdin シグナルが腫瘍の増殖に寄与していることを明らかにした。

### (1-2) Daple の精神神経疾患およびがんにおける分子病態に果たす役割

1)Daple ノックアウトマウスにおいて脳室上衣細胞の繊毛運動異常を生じ、水頭症の発症に寄与することを明らかにした。

2)Daple の胃がんの浸潤、転移における役割を解析した。胃がん細胞株を用いた実験により、Daple をノックダウンすると Wnt5a で誘導される Rac および JNK の活性と laminin $\alpha$ 2 の発現が低下し、さらに細胞運動能、浸潤能も低下した。胃がん細胞のマウスへの移植系において、Daple をノックダウンした細胞では肝臓への転移能が有意に低下し、Daple が non-canonical Wnt シグナルを介した胃がん細胞の浸潤、転移に重要な役割を果たしていることを示した。

### (2) Girdin の細胞内結合タンパクの同定と機能解析

Girdin と dynamin2 の結合による選択的エンドサイトーシスの制御機構を解析した。細胞がエンドサイトーシスにおいてカーゴを取り込むためには、まず細胞膜が内側にくびれ、膜小胞として細胞膜と遊離する必要がある。細胞膜の遊離に重要な働きをする分子として dynamin2 が知られており、Girdin が dynamin2 と直接結合し、dynamin2 の GTPase 活性を上昇させ、膜小胞の遊離に関与することを明らかにした。

### (3) Girdin の EGF receptor および Src キナーゼのリン酸化による機能制御

Girdin チロシン 1798 に対するポリクローナル抗体を作成し、EGF 依存性の Girdin リン酸化を培養細胞を用いて証明した。ヒトおよびマウスの種々の組織を用いて免疫染色を行った結果、消化管に存在する Tuft 細胞と名付けられた特徴的な形を示し、機能不明な細胞を特異的に染色した。リン酸化 Girdin が Tuft 細胞の特異的マーカーになることを明らかにした。

### 5. 今後の計画

### (1) Girdin および Daple の精神神経疾患およびがんの分子病態における役割

1) 神経特異的 Girdin コンディショナルノックアウトマウスで起きるてんかん発作が、ヒトの内側側頭葉てんかんのモデルになるかどうかを組織学的、生理学的にさらに検討を進める。

2) Daple ノックアウトについて引き続き神経系における詳細な病理組織学的な解析、行動解析を進め、神経系の発生、機能、ヒト疾患の病態形成における役割について解析する。

### (2) Girdin および Daple の結合タンパクの同定と機能解析

質量分析により同定された、Girdin および Daple の結合分子候補について推定される機能より絞り込みを行い、細胞レベルでの機能解析を進めていく。

### (3) Girdin のチロシンリン酸化(Y1764, Y1798)による機能制御

チロシンリン酸化部位 (Y1764, Y1798) に変異を導入したノックインマウスの作製に成功したので、詳細に表現型の解析を進める。リン酸化とがん細胞の運動能 (浸潤・転移) における役割を明らかにする。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Nahorski, M.S, Asai, M., Asai, N., Takahashi, M. et al. CCDC88A mutations cause PEHO-like syndrome in humans and mouse. **Brain** 139: 1036-1044 (2016).

2. Ara, H., Enomoto, A., Asai, M., Asai, N., Takahashi, M. et al. Role for Daple in non-canonical Wnt signaling during gastric cancer invasion and metastasis. **Cancer Sci.** 107: 133-139 (2016).

3. Omori, K., Asai, M., Enomoto, A., Asai, N., Takahashi, M. et al. Girdin is phosphorylated on tyrosine 1798 when associated with structures required for migration. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 458: 934-940 (2015).

4. Yamamura, Y., Asai, N., Enomoto, A., Takahashi, M. et al. Akt-Girdin signaling in cancer-associated fibroblasts contributes to tumor progression. **Cancer Res.** 75: 813-823 (2015).

5. Nakai, T., Asai, N., Enomoto, A., Asai, M., Takahashi, M. et al. Girdin phosphorylation is crucial for synaptic plasticity and memory: Potential role in the interaction of BDNF/TrkB/Akt signaling with NMDA receptor. **J. Neurosci.** 34: 14995-15008 (2014).

6. Weng, L., Enomoto, A., Asai, N., Asai, M., Takahashi, M. et al. Regulation of cargo-selective endocytosis by dynamin 2 GTPase-activating protein girdin. **EMBO J.** 33: 2098-2112 (2014).

ホームページ等 : 無