

機関番号：32607

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21870031

研究課題名（和文）細胞極性形成における FilGAP のリン酸化による活性制御機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of the activation mechanism of FilGAP by phosphorylation in establishment and maintenance of cell polarity.

研究代表者

中澤 友紀 (NAKAZAWA YUKI)

北里大学・理学部・助教

研究者番号：50508851

研究成果の概要（和文）： RacGAP 因子、FilGAP の活性制御機構の解析のため、その結合因子を探索した結果、FilGAP は複数の RNA 結合タンパク質と複合体を形成することが示唆された。このうちの RBM10 は細胞伸長端などで Src ファミリーによるチロシンリン酸化下流で FilGAP と結合し、FilGAP の発現に寄与する可能性が示唆された。また抗-リン酸化抗体を用いた解析から、細胞の形態変化の際の FilGAP の活性化（リン酸化）状態の変化も明らかになった。

研究成果の概要（英文）： To understand the activation mechanism of the Rac GAP FilGAP, several FilGAP-binding proteins were isolated and identified by mass-spectrometry. The analysis demonstrated that FilGAP forms complexes with several RNA binding proteins. One of them, RBM10 was found to bind to FilGAP at cell edges and its tyrosine phosphorylation by Src-family enhances their binding. It appeared that RBM10 regulates expression of FilGAP. In addition, analysis using an antibody against phosphorylated(activated) FilGAP demonstrated the activation level of FilGAP during cell spreading.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010 年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：機能生物化学

キーワード：細胞極性 リン酸化

1. 研究開始当初の背景

Rho ファミリーG タンパク質は、様々な局面において細胞骨格の再編成を制御する。このうちの Rac と Rho は互いが互いを不活性化しており、これらの細胞内における活性のバランスが細胞極性の形成や維持に寄与する。RacGAP 因子の一つである FilGAP は、Rho の下流で働き、Rac を特異的に不活性化するこ

とで、葉状仮足の形成を阻害する働きを持つ。このため、FilGAP は極性形成に重要な役割を持つと考えられる。

FilGAP は Rho の標的である ROCK によって分子中央部のセリン/スレオニンをリン酸化されると細胞内での活性が上昇する。FilGAP の非リン酸化型（不活性化型）変異体と疑似リン酸化型（活性化型）変異体を用いた以前の解析から、**1) FilGAP の活性化は**

リン酸化による直接的なものではないこと、2) 非リン酸化型 FilGAP は細胞骨格に局在する何らかの因子と結合し、活性が抑制されていることが示唆された。

しかし、細胞内における FilGAP の活性化の分子メカニズムや、活性化型 FilGAP がどこでどのように働くのかは不明であった。

2. 研究の目的

(1) FilGAP の活性抑制機構の解析

FilGAP の活性抑制機構を分子レベルで解析し、これが担う細胞極性への役割を明らかにすることを目的とした。FilGAP は非リン酸化状態で細胞骨格に局在する阻害因子と結合し、活性が抑制されると考えられるため、まず、非リン酸化型 FilGAP のみに特異的に結合する因子を単離し、この因子が FilGAP の細胞内活性にどのように関与するかを検討し、この阻害因子による FilGAP の活性抑制機構を明らかにすることを目的とした。

(2) 細胞極性形成における活性化 FilGAP の機能の解析

実際の極性形成の際、細胞内における活性化型の FilGAP がどのように働くのかを解析するため、活性化型 (リン酸化型) FilGAP 特異的な抗体を作成し、この抗体を用いて細胞内の FilGAP のリン酸化状態の変化を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) FilGAP の活性抑制機構の解析

① 非リン酸化型 FilGAP 特異的に結合する因子の探索

FilGAP の非リン酸化型変異体 (以後 ST/A) は細胞内で活性をもたず、細胞骨格や細胞接着斑に局在し、疑似リン酸化型変異体 (以後 ST/D) は細胞内で活性を持ち、細胞骨格とは共局在しないという性質を持つ。細胞骨格に局在し、非リン酸化状態の FilGAP の活性を抑制する因子を同定するため、FilGAP の細胞骨格局在に必要な最小ドメイン (Δ PH Δ GAP 変異体、図 1) を HEK 細胞で発現させ、免疫沈降で Δ PH Δ GAP-ST/A と特異的に共沈降する因子を質量分析で同定した。

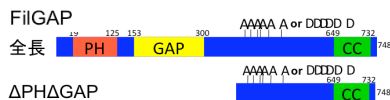


図 1 FilGAP のドメイン構造

またその後、FilGAP に、より直接関与する因子の同定のため、細胞分画法を用いて細胞骨格成分にのみ着目した。 Δ PH Δ GAP-ST/A、ST/D 発現細胞を TritonX-100 可溶性画分と不溶性画分 (細胞骨格画分) に分画し、細胞骨

格画分のみ 0.1%SDS を含む lysis buffer で抽出した。これを用いて免疫沈降を行い、 Δ PH Δ GAP-ST/A 変異体特異的に共沈降した因子を単離、その後質量分析で結合因子を同定した。

② 細胞内における FilGAP との結合の検討

①で単離された結合因子候補の遺伝子をクローニングし、HEK 細胞内で ST/A および ST/D と共に発現させ、免疫沈降法とウエスタンブロットにより候補因子と ST/A との結合を検討した。また、細胞分画法を用いた免疫沈降法で単離された RBM10 の解析の際には、細胞内のチロシンリン酸化状態を Src ファミリーキナーゼ Fyn の過剰発現、および pervanadate 処理によって変化させ (後述)、FilGAP との結合の変化を検討した。

③ 結合ドメインの同定

結合因子と FilGAP の様々なフラグメントを作成して細胞内で発現させ、②と同様に結合の有無を検討し、それぞれ結合に必要な結合ドメインの同定を試みた。

④ 細胞内局在の観察

結合因子と ST/A、ST/D、野生型 FilGAP を HeLa 細胞、A7 細胞に発現させ、FilGAP と共局在するかを間接蛍光抗体法により観察することで検討した。

⑤ FilGAP の活性に及ぼす効果の検討

FilGAP の活性については、FilGAP を過剰発現させた HEK 細胞に、結合因子の発現抑制もしくは過剰発現を行った場合、細胞内での Rac-GTP レベルが変化するかを検討した。

(2) 細胞極性形成における活性化 FilGAP の機能の解析

① 抗リン酸化抗体の特異性の検討

以前の解析から、FilGAP のアミノ酸配列 402 番目のセリン S402 のリン酸化が活性化に重要であることがわかっており、この S402 がリン酸化された FilGAP ペプチドを抗原としてウサギに免疫を行い、抗血清を得た。抗原ペプチドでアフィニティー精製後、この抗体がリン酸化型 FilGAP を特異的に認識するかを検討した。

まず S402 リン酸化ペプチド (抗原ペプチド) と非リン酸化ペプチドへの抗体の反応を ELISA により検討した。

次に細胞内のリン酸化型 FilGAP を認識するかを調べるため細胞に発現させた FilGAP を免疫沈降により単離し、脱リン酸化酵素処理を行った場合と行わない場合でこの抗体の反応の有無をウエスタンブロットで検討した。

また、S402 をアラニンに置換した FilGAP

の非リン酸化変異体 S402A と、疑似リン酸化型変異体 S402D、野生型を細胞で発現させ、この抗リン酸化抗体を用いたウエスタンブロットにより各 FilGAP への反応を検討した。

また、この抗体を事前に抗原ペプチドに反応させておく場合と、させない場合において、細胞に発現させた野生型 FilGAP に対する反応をウエスタンブロットで検討した。

② 極性形成の際の FilGAP のリン酸化状態の変化の検討

細胞の形態が変化する際、細胞内の FilGAP のリン酸化状態が変化するかを、①で特異性が確認できた抗体を用いて検討した。

まず野生型 FilGAP を発現させた A7 細胞にファイブロネクチンをコートしたカバースリップ上で伸展させ、シグナル伝達の誘導を行った。伸展後、0、15、30、60 分後の細胞を回収し、免疫沈降で沈降させた FilGAP に対し、抗リン酸化抗体を用いたウエスタンブロットを行い、反応の変化を検討した。

4. 研究成果

(1) FilGAP の活性抑制機構の解析

① 結合候補因子 G3BP1 の同定

$\Delta PH \Delta GAP-ST/A$ と $\Delta PH \Delta GAP-ST/D$ を発現させた細胞を用いた免疫沈降法とその後の質量分析から、 $\Delta PH \Delta GAP-ST/A$ 特異的に結合する因子候補が複数単離できた。その中に G3BP1 が存在した。G3BP1 は RNA 結合タンパク質でもあり、近年発見された細胞接着班前駆体 Spreading initiation center に含まれるとされていたため、まずこの因子に注目した。細胞に G3BP1 と ST/A、または ST/D (全長) を発現させて行った免疫沈降法から、G3BP1 と ST/A との特異的な結合が確認できた。また、これらを Hela 細胞で発現させて行った間接蛍光抗体法による観察から、G3BP1 と ST/A が葉状仮足などで共局在することも確認できた。しかし、その後 G3BP1 の FilGAP との直接的結合や FilGAP 活性への影響を検討したところ、G3BP1 は FilGAP と直接結合しておらず、FilGAP の活性に変化を与えないことがわかった。そこで、新たな結合因子の単離のため、単離の方法に改良を加えた。

② 細胞骨格画分を用いた結合因子の探索と、結合因子 RBM10 の単離

前回の探索では G3BP1 を含め、RNA 結合タンパク質が複数単離されていた。これまで細胞伸張端で細胞骨格と RNA が共局在し、細胞極性形成に働くという報告や、RNA 結合タンパク質と RNA の複合体が細胞接着班に局在してタンパク質の供給を担い、細胞運動に寄与

するという報告があった。そのため、非リン酸化型 FilGAP も細胞骨格や接着班で RNA 結合タンパク質との複合体を形成する可能性が考えられるが、単離された結合因子候補と ST/A との結合を確かめた結果、細胞内での結合は見られたものの、結合は不安定で直接的なものではなかった。そこで、FilGAP により直接的に関与する因子の同定のため、細胞骨格成分にのみ着目した。細胞から Triton-X100 不溶性の細胞骨格画分のみを抽出し、これを用いた免疫沈降法で $\Delta PH \Delta GAP-ST/A$ に特異的に共沈降した因子を単離した。この中で主要なバンドであったものが、RNA 結合タンパク質である RBM(RNA binding motif protein)10 であった。

③ RBM10 と FilGAP の細胞内での結合

RBM10 は分子内に複数の RNA 結合ドメイン (RRM1, Zinc finger, G-patch) を持つが、詳しい機能は不明である (図 2A)。この RBM10 全長と FilGAP 変異体を細胞内で発現させ、細胞骨格画分のみを用いた免疫沈降法でこれらの結合を検討した結果、RBM10 は ST/A と共沈降したが、ST/D とは結合しないことがわかった。しかしその後、細胞全体の抽出液を用いた免疫沈降では ST/A、ST/D、野生型ともに RBM10 と結合することがわかった (図 2B)。

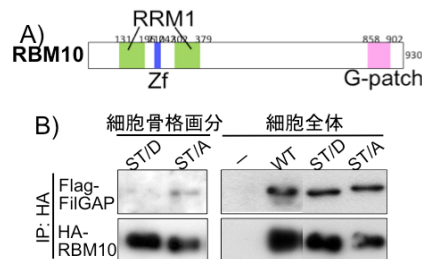


図 2 RBM10 のドメイン構造と FilGAP との結合

④ RBM10 と FilGAP の結合とチロシンリン酸化シグナルとの関係

RBM10 の機能は不明であるが、チロシンキナーゼ Src によって直接リン酸化を受けるといった報告があった。極性形成の際の細胞接着班や葉状仮足においては、インテグリンや EGF 刺激の下流で FAK や Src といったチロシンキナーゼによるリン酸化がシグナル伝達初期で重要な役割を果たす。また、これまでの解析で、細胞に発現させた FilGAP が葉状仮足や接着班に局在することが分かっていたため、以後 FilGAP と RBM10 の結合が、極性形成時のチロシンリン酸化シグナル下流でどのような働きを持つのかについての解析を進めた。

そこで、FilGAP と RBM10 の結合がチロシンリン酸化によって変化するかを検討した。

まず Src ファミリーキナーゼである Fyn を細胞に過剰発現させた。Fyn は Src と相同性

が高く、過剰発現では Src の基質もリン酸化を受ける。RBM10 と FilGAP を共発現させた細胞に、Fyn を過剰発現させた場合とさせない場合で RBM10 と FilGAP の結合の変化を検討した。その結果、Fyn を過剰発現させた場合で RBM10 と共沈降する FilGAP が多くなっていた。つまりこれらの結合が強くなることがわかった (図 3)。

次に、RBM10 と FilGAP を過剰発現させた細胞に pervanadate 処理を行ってリン酸化チロシンの脱リン酸化を阻害し、細胞内のチロシンリン酸化レベルを上昇させた。その結果、無処理の場合と比べて RBM10 と共沈降する FilGAP がわずかに多くなった。つまりこの場合でも同様に、これらの間の結合強くなることがわかった (図 3)。

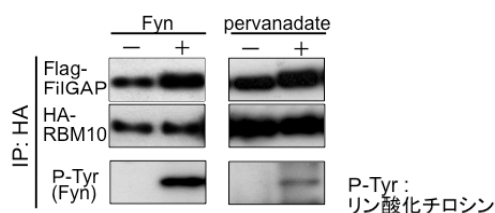


図 3 RBM10 と FilGAP の結合とチロシンリン酸化

これらのことから、RBM10 と FilGAP の結合は Src ファミリーキナーゼによるチロシンリン酸化シグナル下流で何らかの働きを持つことが示唆された。

⑤ RBM10 と FilGAP の細胞内局在とチロシンリン酸化の関係

RBM10 と FilGAP を A7 細胞に発現させたところ、細胞先端などで一部共局在が観察された。④において、RBM10 と FilGAP の結合が Src ファミリーによるチロシンリン酸化によって強くなることが明らかになったため、RBM10 と FilGAP に Fyn をさらに共発現させ、それぞれの局在を観察した。その結果、RBM10、FilGAP とともに Fyn によって形成された突起に局在することがわかった (図 4)。

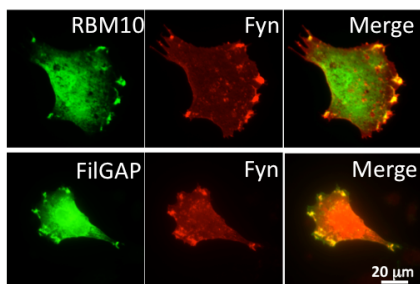


図 4 FilGAP および RBM10 と Fyn の共局在

この結果からも、FilGAP と RBM10 は葉状仮足もしくは接着斑において Src ファミリーキナーゼ下流で働くことが示唆された。

また、内在性の RBM10 や単独で発現させた RBM10 は、そのほとんどが核内に局在するが、

Fyn を共発現させると核への局在が減少し、Fyn と共局在するようになった。

このことから、チロシンリン酸化のシグナル伝達によって、RBM10 は核から細胞膜付近に移動すると考えられる。

⑥ 結合ドメインの同定

RBM10 は FilGAP の Δ PH Δ GAP 変異体を用いた免疫沈降法で単離された因子であり、その後 RBM10 と Δ PH Δ GAP を発現させた細胞を用いた免疫沈降法からも、RBM10 と Δ PH Δ GAP は結合することがわかった。このことから、FilGAP のリン酸化ドメインもしくは coiled-coil ドメインが結合に重要であることが示唆された。

一方、RBM10 は 4 つの RNA 結合ドメインを持つ (図 2A)。RBM10 の 2 つの RRM1 ドメインと Zf ドメインを含む N 末半分と C 末半分の断片を作成して HEK 細胞に発現させ、それぞれが FilGAP と結合するかを免疫沈降により検討したところ、RBM10 の C 末のみに FilGAP が共沈降した。このことから、FilGAP との結合には G-patch を含む C 末部分が重要であることがわかった。

⑦ RBM10 の FilGAP の発現量に対する影響

FilGAP は RBM10 と共発現させると、発現量がわずかに上昇することがわかった。また Δ PH Δ GAP の場合はより顕著であり、単独ではほとんど発現しないこの変異体は RBM10 と共発現させると発現量が上昇していた。

RBM10 はその一時構造から mRNA と結合し、プロセッシングを行うことが予測される。そのため RBM10 が mRNA と結合し、FilGAP の発現の調節に関与する可能性が示唆された。

(2) 細胞極性形成における活性化 FilGAP の機能の解析

① 抗リン酸化抗体の特異性の検討

FilGAP の S402 リン酸化ペプチドを抗原として免疫したウサギから得た抗血清、およびアフィニティー精製後の抗体を用いて ELISA 判定を行ったと結果、非リン酸化ペプチドに対しリン酸化ペプチド特異的な反応が確認できた。

次に細胞内で発現させ、免疫沈降により単離した野生型 FilGAP と、同様の FilGAP を脱リン酸化酵素により脱リン酸化させたものに対し、この抗リン酸化抗体の反応を検討した結果、脱リン酸化された FilGAP への反応が弱くなっていた。また、この抗体は細胞内で発現させた S402A 変異体への反応を示さなかった。さらに、この抗原ペプチドをあらかじめ抗体に反応させた後では、FilGAP への反応が弱くなっていた。

これらのことからリン酸化 FilGAP 特異的な抗体が作製できたと考えられる。

② 極性形成の際の FilGAP のリン酸化状態の変化の検討

細胞をファイブロネクチンなどの細胞外基質上に落とすと、インテグリンからの刺激によって細胞内でシグナル伝達が誘導されて Rac が活性化し、細胞が伸展する。野生型 FilGAP を発現させた場合、Rac が不活性化するため細胞は伸展しないが、この発現量を抑えた A7 細胞を伸展させ、伸展させてから経時的に細胞を回収し、FilGAP のリン酸化状態がどう変化するかを抗リン酸化抗体を用いたウエスタンブロットで検討した。この結果、伸展前に見られた FilGAP への抗体の反応が、伸展が進むに従って弱くなった。

このことから、FilGAP は刺激前にはリン酸化を受けているが、インテグリンからの刺激によるシグナル伝達で脱リン酸化されて、活性が低くなるという可能性が示唆された。

以上の結果から、今回のスクリーニングで得られた ST/A 結合因子候補は、当初目的としていた「非リン酸化状態の FilGAP に特異的に結合し、その活性を抑制する」働きとは別の働きを持つことが示唆された。この中の RBM10 は、今回の結果から接着斑や細胞の伸張端で Src ファミリーによるチロシンリン酸化シグナルによって核から細胞膜付近へと移動し、その下流で FilGAP と結合すると考えられる。また、RBM10 は FilGAP の発現の制御への関与も示された。

ST/A 変異体結合タンパク質のスクリーニングの結果から、FilGAP は RBM10 や G3BP1 を含めた RNA-RNA 結合タンパク質複合体を細胞接着斑および細胞伸張端で形成していると考えられる。これまで RNA や RNA 結合タンパク質の複合体が細胞極性形成への重要性が報告されているが、これらの詳細な機能はいまだ明らかになっていない。本研究で RBM10 と FilGAP の結合が持つ機能を明らかにすることにより、RNA と RNA 結合タンパク質が持つ細胞極性形成への役割への理解が進むと考えられる。

また、細胞極性形成の際には、細胞外からの刺激によってまず FAK、Src などのチロシンキナーゼが活性化し、これらによるチロシンリン酸化シグナル下流で Rac や Rho の活性が制御され、アクチンの再編成が起こる。これまで、このシグナル下流で働く Rho や Rac の活性化因子 (GEF) の解析に比べ、不活性化因子 (GAP) による活性制御の解析は進んでいない。FilGAP は Rac 特異的な GAP であるため、この機能解析を行う本研究からチロシンリン酸化シグナル下流で働く GAP による負の制御機構への理解が進むと期待できる。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 中澤友紀、太田安隆
RacGAP 因子 FilGAP のリン酸化による制御機構について 生体運動合同班会議
2009 年 1 月 9 日 - 11 日 東京

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中澤 友紀 (NAKAZAWA YUKI)
北里大学・理学部・助教
研究者番号：50508851

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：