

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 6月 5日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011~2012

課題番号：23790331

研究課題名（和文）細胞の分裂増殖を制御する新たなシグナル伝達ネットワークの解析

研究課題名（英文）Analysis of a novel signaling network that regulates cell growth and division

研究代表者

足立 誠 (ADACHI MAKOTO)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30335244

研究成果の概要（和文）：研究代表者らは以前、細胞内シグナル伝達因子である IQGAP3 が癌原遺伝子産物である Ras の活性を制御することで細胞の増殖に重要な役割を果たしていることを明らかにした。本研究において、さらに当分子が細胞分裂過程にも直接的に機能的に関与していること、およびその分子メカニズムの一端を明らかにした。また、IQGAP3 の遺伝子発現は細胞増殖と密接に関連しているが、その分子機構について、および IQGAP3 の Ras への作用の分子機構についても解析を行なった。

研究成果の概要（英文）：We have previously shown that IQGAP3, an intracellular signaling molecule, is responsible for cell proliferation because of its ability to regulate Ras, a proto-oncogene product. In the present study, we showed that IQGAP3 is directly involved in the process of cytokinesis as well, and the underlying molecular mechanisms were also addressed. In addition, expression of the IQGAP3 gene, which is tightly co-related with the state of cell proliferation, as well as the molecular mechanisms with which IQGAP3 regulates Ras, was also investigated.

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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：細胞内シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまで主に Ras-ERK シグナル伝達経路の制御機構、および上皮細胞の形態形成について研究を行ってきた。そして上皮細胞間接着装置の裏打ちに局在する新規因子 IQGAP3 を同定した。この分子は IQGAP ファミリー（哺乳類では IQGAP1, 2, 3 から成る）に属するが、IQGAP1, 2 について細胞接着・細胞骨格の制御への関与が知られていた一方で、IQGAP3 については神経細胞の突起伸長へ関与を示唆する報告があったものの、その分子機能はほとんど未知であった。しかし研究

代表者らはこの分子が複数の細胞種においてその増殖に必須の機能を持っていることを明らかにした。すなわち IQGAP3 は増殖を行っている細胞にのみ特異的に発現すること、また Ras と結合してその活性に必要なこと、そしてこれらの特性が細胞の増殖に必要な不可欠であること、を見出した。またこうした特性は IQGAP1, 2 には認められず、IQGAP3 に特異的であった。さらにその後の研究から、研究代表者らは IQGAP3 が細胞質分裂過程を直接制御することでも細胞分裂増殖を制御していることを示唆するデータを得た。

2. 研究の目的

本研究課題においては、次第に明らかになりつつある IQGAP3 を中心とした細胞の分裂増殖制御シグナル伝達ネットワークについて、その詳細な解明を行なうことを目的とし、下記の4点に焦点を当てて研究を進めることとする。

(1) IQGAP3 による G₂/M(G₁/S)制御シグナル伝達機構の解明

これまでの研究結果から、IQGAP3 による細胞増殖の制御には Ras-ERK 経路が重要な役割を果たしていることが明らかになっている。一方、複数の細胞種において IQGAP3 の発現は細胞周期の進行に伴い周期的に変動し、G₂/M 期に最も多く発現することが見出された。さらに、IQGAP3 の RNAi によってその活性・発現に異常が認められるものには G₂/M 期制御に関わる因子が多く認められた。これらの結果は、IQGAP3 は G₂/M 期進行に関与していることを示唆している。しかし一方、Ras-ERK 経路は G₁/S に重要な機能を持つことがよく知られており、G₂/M 期への関与については諸説あって明確にされていない。また IQGAP3 の RNAi は G₂/M 期だけではなく G₁/S 期の調節因子にも異常を引き起こしていた。すなわち IQGAP3 の細胞周期制御における直接の作用時期が必ずしも明確になっていない。そこで IQGAP3 がどのような作用機序で細胞周期を制御しているのか、具体的には IQGAP3 の下流のターゲットとなる転写因子について、また Ras-ERK 経路以外の経路の関与について、各々検討する。一方、IQGAP3 自身の遺伝子発現には逆に ERK の活性が必要であることが明らかになっている。このことは IQGAP3 自身の制御が IQGAP3→Ras→ERK→IQGAP3 というポジティブフィードバック制御機構の中にあることを示唆しており、このシステムが細胞増殖に重要な役割を果たしている可能性がある。この仮説を検証するため、IQGAP3 の発現誘導に必要な転写因子の同定とその制御機構を明らかにした上で、IQGAP3 の発現制御のシグナル伝達経路を解明する。

(2) 細胞の分裂を制御する分子機構の解明

分裂・出芽酵母並びに線虫において IQGAP ホモログ分子が細胞質分裂に重要な役割を果たすことが報告されている。研究代表者らは、哺乳類培養細胞においては IQGAP ファミリー分子の中で IQGAP3 のみが特異的に分裂期細胞の分裂溝へ局在することを見出した。さらに RNAi による実験から、IQGAP3 が実際に細胞質分裂に重要な機能を持つことを明らかにした。すなわち IQGAP3 は G₂/M(G₁/S)期制御と細胞質分裂という2つの側面から細胞増殖を制御していると考えられる。もしかすると、IQGAP3 にはこの2つのイベントを協調させる役割があり、このメカニズムが細胞周期

を適切に進めるためには重要なかもしれない。そこで、IQGAP3 の分裂溝への局在の制御機構、および細胞質分裂への機能的関与の詳細とその機序を明らかにする。

(3) 癌との関連の解明

IQGAP3 は細胞増殖と深い関係を持つことからその癌との関連が疑われるが、実際に関与を示唆する知見がある。すなわち、研究代表者が GEO など公開されている複数のアレイデータを統合的に検討した結果、IQGAP3 の発現が様々な癌細胞において顕著に上昇している傾向が認められた。こうした点を踏まえ、IQGAP3 が癌に対し有為に機能的な関連を持っているかについて、明らかにする。

(4) Ras への作用機序の解明

研究代表者らは IQGAP3 の GAP ドメインが Ras への作用に重要であることを明らかにしている。しかし一般的に GAP ドメインは Ras を不活性化するものとして知られており、IQGAP3 の GAP ドメインのように逆に Ras の活性化を引き起こすような例はこれまでに知られていない。また、このような作用は原癌遺伝子産物でもある Ras の新たな制御機構としても重要である。そこでこの制御の分子機構を明らかにするため、GAP ドメインの組換え蛋白質を発現精製し、Ras に対する活性を生化学的に解析するとともに、その構造を X 線結晶構造解析によって明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ①2011年度：IQGAP3 の細胞周期(G₁/S, G₂/M 期)に対する作用点を明らかにするため、HeLa, NIH3T3, EpH4 細胞に IQGAP3 の RNAi を行い(細胞種により ERK の作用点に差があるとの報告があり、3種の細胞で検討する)、細胞周期への影響を PI-FACS 解析、細胞周期関連因子の蛍光顕微鏡観察・ウェスタンブロットなどで明らかにする。また G₁/S, G₂/M 期活性化因子 (CyclinD1+Cdk4, CyclinB1+Cdc2 など) の過剰発現が増殖阻害を rescue できるかも検討する。またこの RNAi の効果と ERK 経路の阻害剤 U0126 の効果を比較、あるいは両者を併用した効果を検討するなどして細胞周期に対する IQGAP3 と ERK 経路の関係を明らかにする。また必要に応じ、同様の手法を用いて他のシグナル伝達経路との関係を明らかにする。一方、IQGAP3 の転写制御機構を明らかにするために、増殖因子刺激や細胞周期変動に伴う IQGAP3 の発現変化を明らかにし、その発現パターンを再現するのに必要十分なプロモーター領域をレポーターアッセイで同定する。プロモーターの配列情報、IQGAP3 の発現変動パターンと相関から、IQGAP3 の転写因子の候補を複数挙げる。それらについて i) ChIP アッセイ (プロモーターへの結合能)、ii) レポーターアッセイ (プロモーターの活性化能)、iii) RNAi

(IQGAP3 の発現制御能)、を検討して候補を絞り込む。②2012年度：IQGAP3 の RNAi が作用する時点を明確にし、その時強く影響を受けているシグナル伝達因子、転写因子を明らかにして IQGAP3 から転写制御へ繋がるシグナル伝達経路を解明する。G₂/M 期の制御が明らかになった場合は特に ERK 以外の経路の関与について詳細に検討する。最下流にある転写因子の RNAi の効果で IQGAP3 の RNAi の表現型を模倣可能か、また逆にその転写因子を過剰発現して IQGAP3 の RNAi を十分 rescue できるかを検討する。一方 IQGAP3 自身の発現を制御する転写因子について、上流のシグナル伝達因子とそれによる制御機構（ポジティブフィードバック機構を考える上で、特に IQGAP3 自身の RNAi の影響について）を明らかにし、またその RNAi が細胞周期の進行に与える影響（特に、上記の IQGAP3 のターゲットとなる転写因子の活性・発現へ及ぼす影響）を検討する。これらのデータを総合的に解析し、IQGAP3 を中心とする細胞増殖シグナル伝達経路の構造と機能を明確にする。

(2) ①2011年度：IQGAP3 の分裂溝への局在機構を明らかにするため、様々な欠失変異体を HeLa 細胞に stable に発現させて観察し、局在に必要な十分な IQGAP3 の領域を同定する。この領域特異的に結合する分子を、既知の結合因子や既知の分裂溝因子との共沈実験、あるいは yeast two-hybrid 法や IQGAP3 と共沈する内在性物質の質量分析でのスクリーニングによって同定する。得られた分子の局在、また必要に応じてその RNAi が IQGAP3 の局在に与える影響、および結合の制御機構（＝分裂溝局在の制御機構？）を明らかにする。IQGAP3 の細胞質分裂での機能を明らかにするため、HeLa 細胞での RNAi の表現型をライブ観察やマーカー分子の免疫蛍光染色観察によって記述する。この細胞にマウス IQGAP3 を stable に発現させて表現型が rescue されることを確認する。分裂溝の局在に必要な十分な領域は含むがその他の領域を様々に欠損させたマウス IQGAP3 変異体が RNAi の表現型を rescue できるかを検討する。Rescue 能の無い変異体が欠失した領域は IQGAP3 が細胞質分裂を制御するためのエフェクターが結合する領域だと推定され、この領域に結合する分子を上記の方法で同定する。必要な場合その分子の抗体を作製する。なお、細胞質分裂と関連が深い Rho ファミリー G 蛋白質が IQGAP3 と直接結合することを明らかにしており、それらについては IQGAP3 の局在制御因子およびエフェクターの両方の候補として特に検討する。②2012年度：同定した IQGAP3 のエフェクターが分裂溝と関連深い局在を示した場合、その分裂期における挙動（局在・発現量・翻訳後修飾）

を詳細に記述する。各挙動が IQGAP3 に依存するかについて、またこの分子自身の分裂における機能について、各々 RNAi により解析する（必要に応じ両者のダブルノックダウンを行なう）。なお、この因子の IQGAP3 との結合について、Ras のそれとの関係を調べる。例えばこのエフェクターの IQGAP3 との結合が Ras と競合的であるなら、Ras を介する G₂/M(G₁/S) 期の制御とこのエフェクターを介する細胞質分裂期の制御とは同時に生じ得ず、従って両イベントのタイミングを保証するメカニズムとなっているのかもしれない。この仮説を内在性分子間の結合の変動の解析などから解析する。

(3) ①2011年度：GEO 等のデータベースに公開されている複数のマイクロアレイや SAGE データセットを整理・統計処理し、IQGAP3 の発現を有意に上昇させているファクターを絞り込む。特に癌についてその臓器、悪性度、患者の予後、変異遺伝子などとの関連を検討する。*in silico* 解析から IQGAP3 と関連が特に高いと推測される癌腫について、当該癌細胞由来の RNA を、研究協力者からの供与を募るか、市販のものを購入して入手する。これらにおける IQGAP3 の発現量が正常臓器に対して有意に変化しているかを定量的 RT-PCR、ノザンプロットなどにより検討する。②2012年度：IQGAP3 の発現変化と有意な関連が認められた癌種のモデル系が存在する場合、RNAi を用いて IQGAP3 の発現阻害の効果を検討する。また逆にその癌種に対応する正常組織由来の細胞に IQGAP3 を過剰に発現させた時の細胞増殖・形質転換への効果をヌードマウスなどへの細胞移植、トランスジェニックマウスおよび培養細胞の *in vitro* のコロニー形成アッセイ系などで検討し、これらによって IQGAP3 が癌と機能的な関連があるのかを明らかにする。

(4) ①2011年度：IQGAP3 の GAP ドメインは各種大腸菌株、酵母、Sf9 細胞、蚕個体などでは不溶性画分のみ発現し、適切な可溶性蛋白質が得られないことが分かっている。そこで Sf9 細胞での発現系の更なる条件検討（ウイルスのクローン化、タグの変更、培養条件の変更、発現する蛋白質領域の至適化など）、ならびに哺乳類培養細胞系(293f cell)での発現を試みる。精製はタグでのアフィニティー精製、タグの切断、イオン交換カラム、ゲル濾過カラムを組み合わせる。蛋白質の精製標品が得られたら、Ras の GTP→GDP 加水分解活性および GDP→GTP 置換反応に対する効果を *in vitro* のアッセイで検討する。②2012年度：前年度に確立した発現精製系で組換え蛋白質を大量に精製する。この際、先に測定された Ras に対する活性を指標とすることで正しいフォールディングの蛋白質のみを選択的に精製する。ミリグラム

単位の蛋白質が得られたら、様々な結晶化条件をスクリーニングし、最終的にX線結晶構造解析でその構造を解く。可能であれば Ras との複合体の解析を行い、より正確な Ras に対する作用機序の解明につなげたい。ただ、結晶解析には蛋白質が十分得られない、適切な結晶が得られないなどの問題が多い。その場合少量の蛋白質で行なえ、また結晶化の必要も無い単粒子解析に切り替えるなどの対策を講じる。単粒子解析では情報の分解能は落ちるが、蛋白質複合体の結晶解析が困難な場合が多いことを考えると、複合体の解析手法としてはむしろ適しているかもしれない。よって GAP ドメイン単独の結晶解析と、GAP ドメインと Ras の複合体の単粒子解析を並行して進める。

4. 研究成果

(1) 研究代表者らは以前にIQGAP3が分裂増殖している細胞にのみ特異的に発現していることを見出しており、2011年度までにそれを制御する転写因子の候補を複数同定することに成功した。ただ2012年度は他の研究課題に労力を取られたため、それらの候補の中からの絞り込みを含め、この課題については殆ど研究の進展が見られなかった。

(2) 研究代表者らは2011年度までに、IQGAP3が哺乳類の分裂期の細胞の分裂溝に局在し、細胞質分裂の制御に関わっていることを見出している。2012年度においては、IQGAP3自身の分裂溝への局在機構の解明、およびIQGAP3が分裂制御を行なう上での直接のエフェクターを同定することにそれぞれ成功した。これらについて論文を投稿し、現在リバイス中である。ただし今回明らかになったメカニズムが、我々が以前見つけたIQGAP3によるRasを介したG₁/S期(G₂/M期)の制御とどのような関連があるのかについては、今後の検討課題として未検討のままである。

(3) 2011年度までの様々なデータベースの解析から、IQGAP3の発現と複数の癌種との間に強い関連があることを見出されており、これを踏まえ2012年度はその分子メカニズムの解明および機能的意義を明らかにすることを計画していたが、他の課題との兼ね合いで殆ど研究を進めることが出来なかった。

(4) IQGAP3のRasGAPドメインを介したRasへの作用の分子メカニズムを解明することを目的とし、2012年度においてはRasGAPドメインの組換え蛋白質を安定的に発現精製すること、およびこの蛋白質を用いて形状・大きさの良い結晶を再現性良く作ることにそれぞれ成功した。現在はこの結晶を用いたX線結晶構造解析を行なっている。

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1件)

Hirate, Y., Hirahara, S., Inoue, K., Suzuki, A., Alarcon, V.B., Akimoto, K., Hirai, T., Hara, T., Adachi, M., Chida, K., Ohno, M., Marikawa, Y., Nakao, K., Shimono, A. and Sasaki, H. Polarity-dependent distribution of angiominin localizes Hippo signaling in preimplantation embryos. *Curr. Biol.* (in press)

[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：
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

足立 誠 (ADACHI MAKOTO)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：30335244

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：