

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591540

研究課題名(和文) p115RhoGEFを標的とする急性骨髄性白血病細胞分化誘導薬開発への基盤研究

研究課題名(英文) p115RhoGEF promote differentiation of human acute leukemic cells

研究代表者

鈴木 信周 (Suzuki, Nobuchika)

東京大学・先端科学技術研究センター・助教

研究者番号：90247007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：RH-RhoGEF (guanine nucleotide exchange factor) - RHDメインを有する低分子量G蛋白Rho活性化因子 - の一員、p115RhoGEFは、三量体G蛋白質、G13-RH-RhoGEF-Rho活性化を介したアクチン再構成カノニカルシグナルとは全く違う、新規シグナル伝達経路を用いて、急性骨髄性白血病細胞の分化の促進に作用していることを明らかにした。p115RhoGEFは、核膜構造変化や、転写調節因子とのタンパク複合体形成を制御して、分化に重要な役割を果たす。

研究成果の概要(英文)：Here we demonstrate that p115RhoGEF, a guanine nucleotide exchange factor for Rho, directly interacts with a protein at the nuclear periphery to organize the nuclear envelope and transcriptional regulators and thus promote differentiation of human leukaemic HL60 cells. Translocation of p115RhoGEF from the cytoplasm to the nucleus, in response to all-trans retinoic acid is initiated upon its phosphorylation on the specific phosphorylation site. This novel p115RhoGEF signal into the nucleus differentiates leukaemic cells, accompanied by the canonical p115RhoGEF-RhoA-actin organization at the plasma membrane.

研究分野：生化学

キーワード：細胞分化 RH-RhoGEF 核膜

1. 研究開始当初の背景

MLL (mixed lineage leukemia) 融合遺伝子の発現は小児白血病の70%にみられ、非常に予後不良である。3種類あるヒト

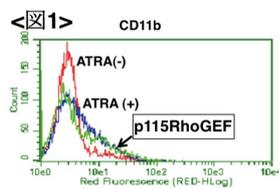
RH-RhoGEF (guanine nucleotide exchange factor) — RHドメインを有する低分子量G蛋白Rho活性化因子—の一員、

Leukemia-Associated RhoGEF (LARG)が、急性骨髄性白血病患者において、MLLの融合パートナーとして同定された (Kourlas et al., 2000)。トライソックスであるMLLが、パートナーを介して、正常では結合し得ない転写因子またはヒストン修飾酵素等と複合体を形成し、異常なクロマチン構造変化が惹起され、Hoxクラスター遺伝子または未知の標的遺伝子群の異常な発現が誘導され、白血病化が引き起こされる—エピジェネティック・プログラムの破綻—と想定される。しかし、LARGの様に本来細胞質にあると思われる蛋白の、核での機能については不明な点が多い。そこで私達は、”RH-RhoGEF自身が、MLLを介してではなく、直接細胞悪性化や分化に関与する“可能性に関して検討を行った。その解析中に、もう一つのRH-RhoGEF、p115RhoGEFを急性骨髄性白血病細胞株HL60細胞にLentivirusを用いて強制発現させると、好中球への分化が促進する事を見出した (図1、2)。

<私達が既に明らかにしたこと>

1. HL60細胞をATRA (all-trans retinoic acid) で好中球に分化誘導したところ、p115RhoGEFの発現の著明な増加が核と細胞質において観察された。一方でRhoAの活性は抑制された。

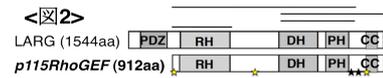
2. Lentivirusを用いてp115RhoGEFを強制発現したところ、HL60細胞が好中球に分化した (図1)。



3. HL60細胞の好中球分化時には、三量体Gタンパク質Gα13~p115RhoGEF~RhoAというよく知られ、私たちが発表してきた活性化シグナル (Suzuki et al., 2009a, Suzuki et al., 2009b, Suzuki et al., 2003) とは別のシグナルが、作動している可能性が示唆された。そこで、内因性p115RhoGEFを認識できる高感度特異的な抗体を独自に作製し、その免疫沈降物をLC-MS/MS (超高分解能質量分析計オービトラップ) によって解析し (ショットガンプロテオミクス) 新たな核内のターゲットを同定することに成功した。p115RhoGEFは、転写調節因子と相互作用をしてNuclear body (NB) といわれる動的な蛋白複合体を形成し、好中球の分化に寄与している可能性が示唆された (Brown et al., 2009)。

4. HL60細胞分化に应答して修飾される、p115RhoG

EFのリン酸化部位



もショットガンプロテオミクスを行い決定した (図2、星印)。

2. 研究の目的

そこで本研究では、p115RhoGEFのHL60細胞好中球分化促進作用を時間的・空間的に解析し、分化に重要なp115RhoGEFの領域を決定して新規分化誘導法開発の基盤を作ることを本研究の目標とする。

—(2)期間内に明らかにすること—

核におけるp115RhoGEFの分化促進の機構解析: p115RhoGEFと同定された転写調節因子間の蛋白相互作用がNuclear body (NB) 構成分子に与える影響と分化の関係

p115RhoGEFの結合が引き金となって構造変化が生じ、転写調節因子との分子間相互作用の変化が生じ、NB、タンパク複合体の再編成を惹起する可能性がある。電顕所見はNBとクロマチンの接触を指示している (Eskiw et al., 2004)。欠損変異体 (図2) 強制発現細胞での

免疫沈降や、蛋白再構成系での表面プラズモン共鳴法を用いて詳細な分子間相互作用解析を行い、複合体形成に重要なp115RhoGEFの領域を決定する。同時に分化度を表面マーカー細胞 (CD11b) 等の発現を指標としフローサイトメトリーによって観察する。

2. p115RhoGEF を核や細胞質に局在を規定する機構の解明：局在を規定するものはisoformによる違いなのか？細胞質—核間のshuttlingがあるのか？

局在の違いは機能の違いを規定する。核局在に重要な領域またはその修飾を決定する。

RH-RhoGEF が強制発現系で、C端のcoiled-coil領域を通じてdimerとなり細胞質に局在し、monomerになると核に移行するシャトリングの可能性が示唆された (Grabocka and Wedegaertner, 2007)。このmonomer-dimer形成には、C端の構造やリン酸化が関係しているかもしれない。前述のように既に私達は、HL60細胞の好中球分化の際にこの領域のリン酸化部位を同定している。この部分の変異体を作製し、強制発現することで、細胞内局在を確認する。蛋白を作製し、ゲル濾過などの手法を用いてdimerの形成を観察する。

3. p115RhoGEFによる細胞周期調節機構

私たちが同定したリン酸化部位はcyclin-dependent kinase(CDK)の基質となり得るモチーフを持っている。その部位はHeLa細胞を用いて細胞周期によるタンパクのリン酸化修飾の変化を網羅的に解析したグループの報告にも一部一致していた (Dephoure et al., 2008)。細胞周期に応じてp115RhoGEFがリン酸化され、Rhoの活性化能や細胞内局在が制御されている可能性もある。G1期からS期のエンタリーやcytokinesisにRhoAが関与していることも知られている。p115RhoGEF自身またはRhoAの活性制御を通して、細胞周期を調節し、白血病細胞分化に関与する可能性について検討する。

4. 細胞質のp115RhoGEFシグナルとRhoA活性化：新規相互作用蛋白によるGa13~p115RhoGEF活性化シグナルの修飾
質量分析や細胞蛍光染色の結果から、HL60細胞が分化する際に発現が増加した細胞質のp115RhoGEFはGa13と細胞膜で結合する、という現在までの知見と一致した結果を得たが、細胞全体では意外にもRhoを活性化していないことがわかった。canonicalなGa13~RH-RhoGEF~Rhoというシグナル伝達経路以外の新規パスウェイが細胞質で作動するはずである。細胞運動の様な外界に対する瞬時の反応と違って分化というような長い時間経過に対する細胞応答では、Ga13~RH-RhoGEFを修飾する他の蛋白との相互作用が生じ、RhoA活性の抑制が起きる可能性もある (Gong, 共同研究者小笹らによる報告, 2010)。この様な新規パスウェイを質量分析の結果を基に決定する。

3. 研究の方法

HL60細胞をATRAで分化誘導を行い分化前後の全細胞分画、核分画、細胞質分画を調整し、独自に開発したp115RhoGEF特異的抗体を用いてショットガンプロテオミクスを行い、核以降に必要なリン酸化部位を同定したり、各分画において、新規標的分子を同定する。HL60細胞にp115RhoGEFの野生型、または同定したリン酸化部位の疑似型または欠損型の変異体発現をするLentivirusを用いて強制発現を行い、その局在や細胞分化に対する影響を観察する。さらに、blastidicinによるセレクションを行い、安定発現株も樹立して解析の対象とする。一方で、ATARで分化誘導したHL60細胞に、p115RhoGEF miRNA—Lentivirusを強制発現させ、分化に対する抑制作用について解析を行う。

(1) p115RhoGEF を核や細胞質に局在を規定する機構の解明

(a)核局在に重要な領域またはその修飾を決定し、細胞質—核間shuttlingの可能性を探る。

私達は、HL60細胞の好中球分化の際にこの領域のリン酸化部位を同定している。この部分の変異体を（Aに置換した非リン酸化型、またはDに置換したリン酸型）作製し、強制発現することで、細胞内局在を蛍光免疫染色法を用いて観察する。

(b) 蛋白修飾酵素の決定

例えば、私たちが同定したリン酸化部位は cyclin-dependent kinase (CDK)の基質となり得るモチーフを持っていた。実際にCDKによりリン酸化されるのか、p115RhoGEF/CDKの再構成系と、細胞の強制発現系で観察する

(2) p115RhoGEF の好中球分化作用の解析
HL60細胞にp115RhoGEFの野生型、または同定したリン酸化部位の疑似型または欠損型の変異体発現をするLentivirusを用いて強制発現を行い、細胞分化に対する影響を表面マーカー細胞（CD11b）等の発現を指標としフローサイトメトリーによって観察するや核の形態を指標に観察する。

(3)核におけるp115RhoGEFの新規標的の同定と、分化促進の機構解析:

新規標的候補との相互作用を、免疫沈降や細胞免疫染色を用いて解析する。新規標的分子が絞られたら、蛋白再構成系を作製して、詳細な分子間相互作用解析を行い、複合体形成に重要なp115RhoGEFの領域を決定したり、好中球分化におけるタンパク複合体の役割について検討を行う。

4. 研究成果

私達は、本研究において、Gα13-RH-RhoGEF-RhoA というカノニカルな活性化経路とは全く違う、核内での新規シグナル経路を発見することができた。この系が作動することで、急性骨髄性白血病細胞の分化を促進させることが解った。更に、p115RhoGEF の核移行のメカニズムについても解明することができた。現在論文投稿中である。p115RhoGEF は核内で、核膜構成成分

や、転写調節因子と複合体を形成しながら、白血病細胞分化に関与していた。

本実験と並行して、もう一つのRH-RhoGEFである、LARGの細胞周期における役割を明らかにすることができたため、下記のように、論文発表を行った。

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 4件)

1. HELMS, MA., GRABOCKA, E., MARTS, MK., FISCHER, CC., SUZUKI, N., & WEDEGAERTNER, PB. (2015) Mitotic-dependent phosphorylation of leukemia-associated RhoGEF (LARG) BY CDK1. *Cellular signalling* **25**, 2015 Oct 16. pii: S0898-6568(15)00286-7.
2. PATEL, M., KAWANO, T., SUZUKI, N., HAMAKUBO, T., KARGINOV, A. V., and KOZASA, T. (2014) Gα13/PDZ-RhoGEF/RhoA Signaling Is Essential for Gastrin-Releasing Peptide Receptor-Mediated Colon Cancer Cell Migration. *Molecular pharmacology* **86**, 252-262.
3. RUSU, L., ANDREEVA, A., VISINTINE, D. J., KIM, K., VOGEL, S. M., STOJANOVIC-TERPO, A., CHERNAYA, O., LIU, G., BAKHSHI, F. R., HABERICHTER, S. L., IWANARI, H., KUSANO-ARAI, O., SUZUKI, N., HAMAKUBO, T., KOZASA, T., CHO, J., DU, X., and MINSHALL, R. D. (2014) G protein-dependent basal and evoked endothelial cell vWF secretion. *Blood* **123**, 442-450.
4. CHOW, C. R., SUZUKI, N., KAWAMURA, T., HAMAKUBO, T., and KOZASA, T. (2013) Modification of p115RhoGEF Ser(330) regulates its RhoGEF activity. *Cellular signalling* **25**, 2085-2092.
5. 鈴木信周、小笹徹。GPCR シグナルの動的

作用機構の解明-タンパク質表面のインターフェースに注目した、新たな熱力学的解析。2013。実験医学、399~405。

〔学会発表〕(計 3 件)

1. **SUZUKI, N.**, KAWAMURA, T., HAJICEK, T., HAMAKUBO, T. & KOZASA, T.
p115RH-RhoGEF targets lamin B to promote the differentiation of human leukemic cells.
(2014) **Gordon Research Conference**, "Phosphorylation & G-Protein Mediated Signaling Networks", June 15-20, 2014, University of New England, Biddeford, ME
2. M.C. Helms, E. Grabocka, M.K. Martz, **N. Suzuki** and P.B. Wedegaertner. (2014)
Cdk1-dependent phosphorylation of leukemia-associated RhoGEF during mitosis.
Thomas Jefferson Univ. and Univ. of Tokyo.
Experimental Biology, MONDAY, APRIL 28, 2014 San Diego Convention center *, D379, 802.30.
3. **SUZUKI, N.**, KAWAMURA, T., HAMAKUBO, T. & KOZASA, T. The role of p115RhoGEF during differentiation of human leukemia cells. (2012) **Gordon Research Conference** "Phosphorylation & G-protein Mediated Signaling Networks"(USA, ME, Biddeford, 6/10/12~6/15/12)

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rcast.u-tokyo.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木信周 (Suzuki, Nobuchika)

東京大学・先端科学技術研究センター・

特任助教

研究者番号：90247007

(2) 研究分担者

川村猛 (Kawamura, Takeshi)

東京大学・アイソトープ総合センター・

准教授

研究者番号：70306835

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