

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24700961

研究課題名(和文) Ralキナーゼの同定とその発癌における役割の解明

研究課題名(英文) Identification of Ral kinase and characterization of its role in tumorigenesis

研究代表者

白川 龍太郎 (Shirakawa, Ryutaro)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：50581039

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：低分子量GTP結合蛋白質RalAは、細胞の増殖や、遊走、細胞内小胞輸送、癌化など様々な機能を制御している。多くの知見は、RalAの活性化が発癌性Ras誘導性のヒト細胞の癌化に必須であることを示しているが、その分子メカニズムは明らかでない。本課題では、ラット脳細胞質よりRalAエフェクターを精製することを目的とし、硫酸沈殿分画、イオン交換クロマトグラフィー、RalAアフィニティークロマトグラフィーを用いることにより、RalAに特異的に結合するエフェクター複合体を精製することに成功した。本複合体はキナーゼ活性を有し、RalA依存性の細胞癌化に関わっている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The small GTPase RalA regulates many cellular processes such as cell proliferation, migration, membrane traffic, and tumorigenesis. Accumulating evidence shows that activation of RalA GTPase is essential for oncogenic Ras-induced human cell tumorigenesis. However, the molecular mechanism by which RalA regulates tumorigenesis remains elusive. I tried to identify RalA effector proteins in rat brain cytosol and succeeded in purifying a RalA effector complex using several chromatography steps including ammonium sulphate precipitation, ion-exchange chromatography, and RalA affinity chromatography. This effector complex may be involved in RalA-dependent tumorigenesis.

研究分野：基礎医学

科研費の分科・細目：医科学一般

キーワード：Ral 低分子量GTP結合蛋白質

1. 研究開始当初の背景

低分子量 GTP 結合蛋白質はヒトでは約 150 種存在し、Ras スーパーファミリーを形成している。このうち Ral(Ras-like)は、一次構造上 Ras に最も高い相同性を示し、Ras、Rap、Rheb とともに Ras サブファミリーを形成する。他の GTP 結合蛋白質と同様に、Ral は GTP の結合した活性型と、GDP の結合した不活性型の 2 つの立体構造をとり、その活性化、不活性化はそれぞれ GEF(guanine nucleotide exchange factor)、GAP(GTPase-activating protein)により制御される。RalGDS(Ral GDP dissociation stimulator)を初めとして現在知られている RalGEF の多くは RalGEF ドメインに加え Ras 結合ドメインを有し、Ras の直接結合により活性化される。このことは、RalGEF/Ral が Ras 誘導性の発癌において何らかの役割をもつことを示唆するが、Robert Weinberg らは、ヒト線維芽細胞、胎児腎細胞、乳腺上皮細胞を用いた解析より、どの細胞種においても Ras 下流での RalGEF/Ral 径路の活性化が、細胞の癌化に必須であることを示している (Rangarajan, Cancer Cell, 2004)。この知見は培養細胞系を用いて示されたものであるが、K-Ras に変異をもつヒト膵臓癌検体で異常な Ral の活性化が見られること (Lim, Curr Biol, 2006)、RalGDS の遺伝子欠損マウスが Ras 誘導性の皮膚発癌モデルに抵抗性を示すこと (Gonzalez-Garcia, Cancer Cell, 2005)など、生体においても、Ral が Ras の主要な下流因子であることが強く示唆されている。

Ral には約 80%の高い相同性をもつ RalA と RalB の 2 つのアイソフォームが存在する。RalA と RalB は C 末端の hypervariable region を除いてほぼ同一のアミノ酸配列をもち、これまで知られている Ral の標的分子は RalA、RalB、両者に結合する。しかしながら、RNA 干渉法による RalA、RalB それぞれの抑制実験から、両者の細胞機能は同一でないことが示されている。すなわち、RalA は Ras 誘導性癌細胞の足場非依存性増殖

(anchorage-independent growth)に必須であり (Lim, Cancer Cell, 2005)、一方 RalB は Ras 誘導性癌細胞のアポトーシス回避に必要である (Chien, Cell, 2006)。これらの知見は、RalA と RalB が、それぞれに特異的なシグナリング径路を制御することを示唆している。最近の研究により、RalB の活性化によるアポトーシス回避の分子機構としては、RalB の下流で非古典的な I B キナーゼ TBK1 および NF B 径路が活性化され、抗アポトーシスシグナルが伝えられることが示されている (Chien, Cell, 2006、Barbie, Nature, 2009)。一方、RalA の活性化による足場非依存性増殖制御の分子機構については、現在のところ全く明らかにされておらず、本研究分野における最も重要な課題の 1 つとなっている。

2. 研究の目的

研究代表者は RalA の下流においても何らかのキナーゼが活性化されるのではないかとこの仮説のもとに、GTP 型 RalA によるアフィニティー精製法にオートラジオグラフィ法を組み合わせた手法を用い、RalA に結合するキナーゼの探索を行った。その結果、ラット脳細胞質中より GTP 型 RalA に結合するキナーゼ活性を見いだすことに成功した。本キナーゼ活性は、RalA 以外の GTP 結合蛋白質、RalB、Ras、Rap、Rho、Rab 等には結合しないことから、RalA 特異的なシグナリング径路を担うものであると考えられる。本研究では RalA 結合キナーゼを分子同定し、その活性化機構、作用機序を明らかにすることで、未だ未知である RalA 特異的なシグナリング径路の分子的解明を目的とした。

発癌性 Ras の下流径路としては Raf/MAPK 径路や PI3 キナーゼ径路が詳細に解析されているが、RalGEF/Ral 径路の解析は遅れているのが現状である。しかし、上述したように RalGEF/Ral 径路は発癌性 Ras によるヒト細胞の癌化にとって必須であり、さらに最近の研究により、腫瘍抑制因子 PP2A が RalA 自身を標的とすること (Sablina, Cell, 2007)、RalA が前立腺

癌細胞の骨転移を制御すること(Yin, MCB 2007)など、RalA と癌化、癌の進行との関連を示す知見が蓄積している。このような状況において、RalA 特異的なシグナリング経路を明らかにすることは極めて重要であり、本研究の遂行により RalA シグナリング経路の詳細が解明されれば、RalA による増殖制御機構の解明のみならず、発癌性 Ras の下流経路の統合的な理解につながりうると考えられた。

3. 研究の方法

本研究計画では、ラット脳細胞質を出発材料として連続カラム分画法により、RalA 結合キナーゼを精製、分子同定する。まず、非水解性 GTP 類似体 GppNHp 結合型 GST 融合 RalA により、目的キナーゼをブルダウンする。次に、 $[-^{32}\text{P}]\text{ATP}$ によるリン酸化反応後に SDS-PAGE、オートラジオグラフィーを行い RalA 結合キナーゼを含む画分を検出する。最終的には RalA アフィニティーカラムにより RalA 結合キナーゼを単一にまで精製する。

キナーゼが同定されれば、遺伝子クローニングを行い、リコンビナント蛋白質あるいは合成ペプチドを用いて抗体の作製を行う。また、大腸菌発現系、昆虫細胞発現系を用いてリコンビナント蛋白質を作製し、それらを用いてキナーゼの活性化機構を明らかにする。また、RNA 干渉による RalA 結合キナーゼの発現抑制、および変異体の発現が Ras 誘導性癌細胞の足場非依存性増殖におよぼす影響をソフトアガー培地を用いたコロニー形成アッセイにより検討する。さらに、RalA 結合キナーゼの基質を同定し、その作用機構を明らかにする。

また、ヒト癌細胞、組織中の本キナーゼの発現、リン酸化を検討し、Raf/MAPK や PI3K など他の Ras 経路との比較を行う。

4. 研究成果

本研究ではオートラジオグラフィーによる RalA 依存的リン酸化を指標として、ラット脳細胞質中より RalA 結合キナーゼを精製した。本キナーゼは、硫安沈殿分画、陰イオン交換カラム、ハイドロキシアパタイトカラム、陽イオン交換カラム、およびゲル濾過カラムにより収量を損なうことなく分離できることを精製の前段階として確認した。また、本キナーゼは RalB、H-Ras、RhoA、Rheb には結合しないため、RalA 特異的なエフェクターであると考えられた。

本キナーゼを単離、同定するために、まず、ラット脳細胞質 (20 匹分) より細胞質を調製し、硫安沈殿分画により RalA 結合キナーゼの分画を行った。RalA 結合キナーゼは

30% 飽和硫安画分に回収された。次に、本画分を MonoQ 陰イオン交換カラムにより分離し、キナーゼ活性を有する画分を、さらに MonoS 陽イオン交換カラムにより精製した。最終的に MonoS カラムの活性分画より RalA アフィニティーカラムを用いてキナーゼを含む RalA 結合蛋白質複合体を精製し、TOF-MS により本複合体構成蛋白質を同定することに成功した。

今後は本キナーゼおよび、複合体構成要素のノックダウン等により、本複合体の細胞癌化における意義を明らかにする予定である。

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 3 件)

Saito R, Shirakawa R, Nishiyama H, Kobayashi T, Kawato M, Kanno T, Nishizawa K, Matsui Y, Ohbayashi T, Horiguchi M, Nakamura T, Ikeda T, Yamane K, Nakayama E, Nakamura E, Toda Y, Kimura T, Kita T, Ogawa O, Horiuchi H. Downregulation of Ral GTPase-activating protein promotes tumor invasion and metastasis of bladder cancer. *Oncogene* 32 巻 894-902 頁 2013 査読有 doi: 10.1038/onc.2012.101.

Zografou S, Basagiannis D, Papafotika A, Shirakawa R, Horiuchi H, Auerbach D, Fukuda M, Christoforidis S. A complete Rab screening reveals novel insights in Weibel-Palade body exocytosis. *J Cell Sci* 125 巻 4780-90 頁 2012 年 査読有 doi: 10.1242/jcs.104174.

Boswell KL, James DJ, Esquibel JM, Bruinsma S, Shirakawa R, Horiuchi H, Martin TF. Munc13-4 reconstitutes calcium-dependent SNARE-mediated membrane fusion. *J Cell Biol* 197 巻 301-12 頁 2012 査読有 doi: 10.1083/jcb.201109132.

〔学会発表〕(計 3 件)

白川龍太郎、「血小板の低分子量 GTP 結合蛋白質活性の直接的評価」、第 79 回日本生化学会東北支部会例会、2013 年 5 月 11 日、仙台

白川龍太郎、「RalGAP の発現喪失は膀胱癌の浸潤・転移を促進する」、第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 20 日、札幌

白川龍太郎、「RalGAP の発現低下と膀胱癌悪性化」、第 78 回日本生化学会東北支部会例会、2012 年 5 月 26 日、山形

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/mcb/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

白川 龍太郎 (SHIRAKAWA, Ryutaro)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：50581039

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：