

平成 22 年 6 月 15 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19370081
 研究課題名（和文）RacGAP 因子 FilGAP による細胞運動，接着，極性形成に関する研究
 研究課題名（英文）Studies on the role of FilGAP (RacGAP) in cell migration, adhesion, and polarization.
 研究代表者 太田 安隆 (OHTA YASUTAKA)
 北里大学・理学部・教授
 研究者番号：90192517

研究成果の概要（和文）：FilGAP は低分子量 GTP 結合タンパク質 Rac を特異的に不活化する因子である。本研究で FilGAP の細胞内活性制御機構を解析した。(1) FilGAP のリン酸化を介した制御機構として、非リン酸化型 FilGAP に特異的に結合する複数の結合タンパク質を同定した。(2) FilGAP は ROCK によって6ヶ所リン酸化されるが、402番目のセリン残基のリン酸化が FilGAP の活性化に重要であることを明らかにした。(3) FilGAP の PH ドメインは PIP3 と結合するが FilGAP の活性は PI3 キナーゼに依存しないことがわかった。また低分子量 GTP 結合タンパク質 Arf6 が PH ドメインに結合し FilGAP を活性化することが明らかになった。Arf6 は FilGAP を介して Rac に依存した細胞運動を制御していると考えられる。以上から、FilGAP は Rho と Arf6 の下流で Rac を制御していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：FilGAP is a newly-identified RhoGAP, which activity is specific for Rac. I have studied the mechanism of regulation of FilGAP activity in vivo. (1) I have identified protein factors, which binds specifically to de-phosphorylated FilGAP. (2) FilGAP is phosphorylated at 6 amino acid residues by ROCK. I have identified Serine 402 as a crucial phosphorylation site to activate FilGAP. (3) The PH domain of FilGAP binds phospholipid PIP3. However, I found that the activity of FilGAP is not dependent on PIP3. Activated small GTPase Arf6 binds the PH domain of FilGAP and stimulates its GAP activity. This suggests FilGAP is involved in the Arf6-dependent regulation of Rac. FilGAP therefore regulates Rac downstream of RhoA and Arf6.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	13,000,000	3,900,000	16,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞運動・細胞接着・細胞極性・低分子量 GTP 結合タンパク質・細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

(1) RhoGTPase は細胞の形態、運動を制御する因子で細胞内で分子スイッチとして働いている。RhoGTPase は運動する細胞の方向決定に関与していることが示唆されていたが分子レベルでのメカニズムは不明であった。

(2) FilGAP は本研究代表者が同定した因子で細胞内で Rac を特異的に不活化する GAP 活性を持っている。FilGAP は Rac の調節を介して葉状仮足の形成を制御しているので運動している細胞の方向決定に重要な働きをしていると考えられた。

2. 研究の目的

(1) FilGAP は ROCK でリン酸化される RacGAP 活性が細胞内で上昇するがそのメカニズムは不明である。FilGAP は非リン酸化状態では細胞接着斑に存在し、リン酸化されるとそこから解離し活性化されると考えられる。そこで本研究では非リン酸化型 FilGAP に特異的に結合し FilGAP の活性を制御する因子を同定する。また、ROCK でリン酸化される 6ヶ所のアミノ酸のうち活性化に重要なアミノ酸残基を同定し、リン酸化 FilGAP 特異的抗体を作成する。

(2) FilGAP を細胞内で過剰発現させると細胞膜に泡状構造体(Bleb)が形成されるが、この構造形成には FilGAP の PH ドメインが必要である。FilGAP の PH ドメインは一次構造上 PIP3 に特異的に結合すると考えられる。そこで、本研究では PH ドメインの細胞内結合部位(PIP3 あるいはタンパク質)を同定し、PH ドメインを介した FilGAP の活性制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 非リン酸化型 FilGAP に特異的に結合する分子の同定は、アフィニティー精製による特異的タンパク質の検索と質量分析による同定を用いた。

①アフィニティー精製は *in vitro* と *in vivo* の方法を用いた。リン酸化型及び非リン酸化型 FilGAP 変異体は 6ヶ所のリン酸化部位(セリンとトレオニン) をすべてアスパラギン酸(ST/D 変異体)とアラニン(ST/A 変異体)に置換した変異体を用いた。細胞は HEK 細胞を用いた。

②*In vitro* では、大腸菌で ST/A 変異体を GST 融合タンパク質として産生させ Glutathione ビーズで精製した。このビーズに HEK 細胞抽出液を添加し、ST/A タンパク質に特異的に結合する分子を単離した。

③*In vivo* では、ST/A 変異体にタグ(GST または Flag)を付けた分子を HEK 細胞で発現させ、細胞を可溶化後 Glutathione ビーズもしくは抗 Flag 抗体で ST/A 分子を単離し、それに結合する分子を検索した。

(2) FilGAP の機能制御に重要なリン酸化部位の同定とリン酸化特異的抗体の作製

①ST/A 変異体を発現させた HeLa 細胞を細胞外マトリックス・フィブロネクチン(FN)上に播くと細胞は多数の葉状仮足を進展させながら FN 上に接着する。この現象を利用してリン酸化部位を 1 つずつアラニンに置換した変異体を作成し HeLa 細胞で発現させ FN 上の接着を比較した。

②リン酸化セリンに特異的な抗体を家兎に免疫して作成した。抗原はリン酸化させたペプチドを用いた。

(3) FilGAP の PH ドメインの機能解析は薬理学的方法と分子生物学的手法を用いた。

①PH ドメインの機能が PI3 キナーゼ活性に依存しているか PI3 キナーゼ特異的阻害剤の効果を検討し、また PIP3 に結合しない変異体(R39C)を作成しこの変異体の細胞内活性を測定した。

②PH ドメインに特異的に結合する分子を検索した。Flag タグを付けた PH ドメインを HEK 細胞で過剰発現させ細胞を可溶化し Flag-PH を免疫沈降し、共沈降する分子を単離した。

③Arf6 と FilGAP-PH ドメインとの結合を解析した。Arf6 は活性型 Q67L と不活性型 T27N 変異 Arf6 を細胞内で過剰発現させ、FilGAP-PH が結合するか検討した。また、PH ドメインの活性に Arf6 が必要か、Arf6 の Rac 制御に FilGAP が関与しているか RNAi による分子の細胞内発現抑制を用いて検討した。

4. 研究成果

(1) FilGAP のリン酸化による活性制御機構の解析

①非リン酸化型 FilGAP (ST/A) に特異的に結合するタンパク質をアフィニティー精製した。実験では、ST/A 変異体分子を HEK 細胞内で GST 融合タンパク質として過剰発現させ、細胞を可溶化後、発現した GST 融合タンパク質を Glutathione-Sepharose で単離した。単離した ST/A 変異体分子を SDS-PAGE で分離したところ、複数の分子が ST/A 変異体と結合して回収された。この分子群はコントロールの GST のみ、あるいは疑似リン酸化型 FilGAP

変異体(ST/D)には結合しなかった。この分子群の同定を質量分析(LC-MS/MS)で行った。同定できたものとしては、G3BP (p120RasGAP-binding protein), Fusion, DEAD5 (p68 RNA helicase)などRNA結合タンパク質が多かった。今後、この中で非リン酸化型 FilGAP に直接結合し FilGAP の活性を制御している分子の同定、解析をすすめる予定である。

②野生型 FilGAP を過剰発現した HeLa 細胞を細胞外マトリックスフィブロネクチン(FN)上に播種すると細胞は FN 上で広がるができない。これは FN 上に細胞が広がる時 Rac の活性化が必要で、FilGAP が Rac の活性化を阻害するためであると考えられる。逆に6つのリン酸化部位をすべてアラニンに置換した非リン酸化型 FilGAP を発現させた細胞は FN 上に速やかに広がる。FilGAP のリン酸化部位である S391, S402, S413, S415, S437, T452 をそれぞれ単独にアラニンに置換した変異体を作成し、これらを HeLa 細胞に過剰発現させ FN 上に播種したときの細胞形態を観察した。結果は、S402 をアラニンに置換した変異体(S402A)を発現した細胞が ST/A と同程度に FN 上に広がった。これから S402 のリン酸化が FilGAP の活性制御に重要であることが明らかになった(図1)。

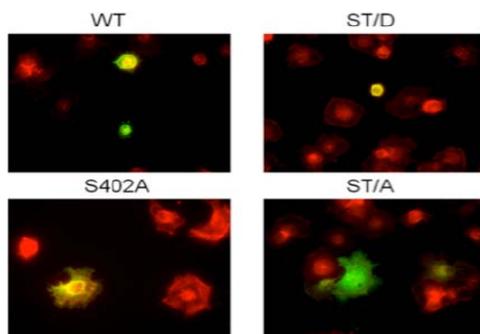


図1 HeLa細胞のFN上での伸展反応

③リン酸化された S402 を特異的に認識する抗体(ウサギポリクローナル抗体)を作成した。抗体はリン酸化ペプチドでアフィニティー精製した。今後、この抗体を利用して活性化(リン酸化した) FilGAP の細胞内局在などを解析して行く予定である。

(2) FILGAP の PH ドメインの機能解析

①最初に FilGAP の PH ドメインの活性が PI3 キナーゼに依存しているか検討した。FilGAP の PH ドメインの活性指標としては、PH ドメインの細胞膜局在と FilGAP の過剰発現による Bleb 形成を用いた。まず、PI3 キナーゼの特異的阻害剤 wortmannin と LY294002 の効果

を調べた。これらの PI3 キナーゼ存在下でも FilGAP を過剰発現させるとコントロールと同様細胞膜に Bleb を形成することがわかった。また PH ドメインの膜局在も PI3 キナーゼ阻害剤で影響を受けなかった。次に、PIP3 に結合しない変異 PH ドメイン R39C(39番目のアルギニンをシステインに置換したもの)を持った FilGAP を作成し、細胞内で過剰発現させた。この変異体も Bleb を細胞表面で形成することができた。以上から FilGAP の PH ドメインは PIP3 に依存しないで細胞膜に局在し、機能できることが明らかになった。FilGAP の PH ドメインがリン脂質 PIP3 非依存的であることから、PH ドメインと特異的に結合するタンパク質の同定を試みた。

②FilGAP の PH ドメインと特異的に結合するタンパク質の同定を試みた。Flag タグ付きの PH ドメインを HEK 細胞内で過剰発現させ、細胞可溶性後、抗 Flag 抗体(M2)で Flag-PH を免疫沈降させ共沈降する分子を SDS-PAGE で分離した。単離した分子を質量分析で解析したところ Rac の標的タンパク質の1つである WAVE3 が同定できた。そこで WAVE3 の全長 cDNA をクローニングし、動物細胞発現ベクターに組み込み、HEK 細胞中で FilGAP と共に過剰発現させると両者は共沈降することがわかった。また、細胞内でも共局在することが明らかになった。今後は、RNA 干渉などを用い WAVE3 の細胞内発現を抑制したときの FilGAP の過剰発現に対する効果を検討する予定である。

③FilGAP の PH ドメインは一次構造上 small GTPase Arf の活性化因子 ARNO の PH と相溶性が高い。最近の研究から ARNO はその PH ドメインを介して Arf6 と相互作用していることが報告された。そこで FilGAP の PH ドメインも Arf6 と結合するか検討した。Arf6 の野生型、恒常活性型変異体 Q67L、優性阻害型変異体 T27N を Flag-FilGAP (全長)と共に HEK 細胞で過剰発現させた。細胞抽出液を調整し、FilGAP を免疫沈降したところ野生型と恒常活性型 Q67L は共沈降したが優性阻害型 T27N は共沈降しなかった(図2)。FilGAP の PH ドメインを用いても同様の結果を得ることができた。さらに PH ドメインを大腸菌で GST 融合タンパク質として産生させ Glutathione-beads で精製し、Arf6 を発現させた HEK 細胞抽出液と混合したところ、in vitro でも FilGAP の PH ドメインは Arf6Q67L と結合することがわかった。また FilGAP の PH ドメインと Arf6Q67L を A7 メラノーマ細胞で発現させると、両者は運動している細胞の先端部(leading edge)で共局在した。以上の結果から FilGAP の PH ドメインは活性型(GTP 結合型)Arf6 と細胞内で相互作用できること

が明らかになった。

④FilGAP と Arf6 の相互作用の生理的意義を

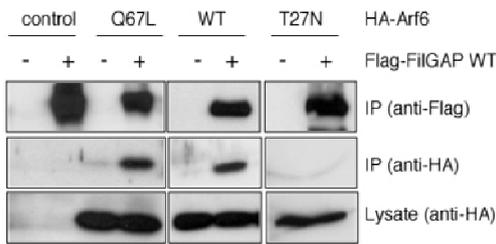


図2 FilGAPとArf6の相互作用

明らかにするために、Arf6 の細胞内発現を RNAi で抑制させたところ FilGAP を過剰発現させたときに見られる細胞膜上の Bleb が顕著に抑制された。また FilGAP の細胞内 RacGAP 活性が Arf6Q67L によって上昇することが GTP-Rac pull-down assay で明らかになった。以上から GTP 型 Arf6 は FilGAP を細胞内で活性化させることが明らかになった。

⑤FilGAP と Arf6 の相互作用が PIP3 に依存しているか検討した。まず PIP3 非結合型の FilGAP (R39C) は活性型 Arf6Q67L と細胞内できることが明らかになった。また FilGAP と Arf6Q67L は細胞内で共局在しているが、この局在は PI3 キナーゼの特異的阻害剤である wortmannin や LY294002 の影響を受けないことが明らかになった。以上から FilGAP は PIP3 非存在下で Arf6 と相互作用できることが明らかになった。

⑥Arf6 は Rac の調節を介して細胞形態や細胞運動を制御していることがわかっている。そこで FilGAP が ARF6 の下流で Rac を制御しているか検討した。ヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 で活性型 Arf6Q67L を発現させると細胞は運動能が亢進し、葉状仮足を進展させる。活性型 Arf6 は葉状仮足の先端部に局在するが内在性の FilGAP もそこで Arf6 と共局在することがわかった。それに対して優性阻害型 Arf6T27N は葉状仮足を形成せず、細胞内一面に局在した。内在性の FilGAP も Arf6T27N と

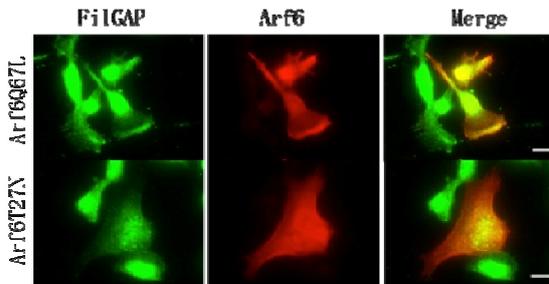


図3 Arf6と内在性FilGAPの細胞内局在の共局在は見られなかった (図3)。

MDA-MB-231 に Arf6Q67L を発現させると葉上仮足の形成と細胞の伸長が観察できる。この細胞での FilGAP の発現を RNAi で抑制すると Arf6-Rac 由来の細胞形態が増強された。これから FilGAP は Arf6 の下流で Rac の活性化を抑え細胞運動を制御していることが示唆された。

以上、本研究から FilGAP は RhoA と Arf6 の下流で Rac を制御する因子であることが明らかになった。細胞運動は様々な低分子量 GTP 結合タンパク質 (small GTPase) によって制御されており、異なる small GTPase の間の連絡 (cross-talk) がいかに調節されているかを明らかにすることが重要である。本研究から FilGAP は RhoA, Arf6, Rac の間を結ぶ重要な調節因子であることが明らかになった。また、RhoA, Rac, Arf6 経路のシグナル伝達の破綻はがん細胞の浸潤や転移に深く関わっていることがわかっている。FilGAP の機能や発現の増減が、がん細胞の悪性化 (浸潤・転移) に関わっている可能性がある。

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1件)

① Shifrin, Y., Arora, PD., Ohta, Y., Calderwood, DA., McCulloch, CA. The role of FilGAP-filamin A interactions in mechanoprotection. Mol. Biol. Cell 査読有 2009, vol 20, 1269-1279

[学会発表] (計4件)

①川口香織、FilGAP-PH ドメインの機能解析、第22回バイオサイエンスフォーラム、2009年8月3日、北里大学薬学部

②田中和正、FilGAP pleckstrin 相同ドメインの機能解析、第22回バイオサイエンスフォーラム、2009年8月3日、北里大学薬学部

③川崎直子、FilGAP の細胞運動における役割とその分子メカニズムの解明、第22回バイオサイエンスフォーラム、2009年8月3日、北里大学薬学部

④中澤友紀、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11日、東京大学

[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

<http://www.kitasato-u.ac.jp/sci/resea/seibutsu/kino/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田 安隆 (OHTA YASUTAKA)

北里大学・理学部・教授

研究者番号：90192517

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：