

## 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 17 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657095

研究課題名（和文） 新たな迅速活性化手法を用いた低分子量Gタンパク質下流シグナルの解析

研究課題名（英文） Analyses of intracellular signals using a novel activation method for small GTPases

研究代表者

前濱 朝彦 (MAEHAMA TOMOHIKO)

国立感染症研究所・細胞化学部・室長

研究者番号：40322755

研究成果の概要（和文）：

低分子量G蛋白質は様々な細胞内シグナル伝達においてスイッチ分子として機能する重要な分子である。本研究ではRIRAG法と名付けた新たな手法を様々な低分子量G蛋白質に適用し、それぞれの下流シグナル経路の解析を行った。その結果、CDC42からERKへとつながるシグナル経路が存在することを新たに見いだすことに成功した。RIRAG法による解析が困難な例もいくつか見つけたが、CDC42-ERK経路の解析においては数分オーダーの分解能でのシグナル解析が可能であることなど、本法がシグナル解析において大きな可能性を持つことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Small GTPases play pivotal roles in diverse intracellular signal transduction pathways. In this study, we applied RIRAG method to several small GTPases and found novel signaling pathway that ERK activation was induced by CDC42. The RIRAG method, in the case of CDC42-ERK pathway, was able to dissect the signaling by minute-order. The method potentially becomes a novel tool for the analysis of small GTPase-mediated signaling pathways, although RIRAG method has difficulties in controlling some small GTPases.

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	3,000,000	0	3,000,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞情報伝達機構、G蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

**①シグナル伝達分子：G蛋白質**

G蛋白質は多彩な細胞内シグナルを制御するスイッチ分子であり、結合するグアニンヌクレオチド(GDPまたはGTP)によってその機能が制御されている。一般的にG蛋白質はGTPが結合することによって活性化型となり、下流エフェクター分子と相互作用してシグナルを伝達する。細胞内には多様なG蛋白質

が存在するが、それぞれが特異的なエフェクター分子を介してシグナルを伝達しており、そこには高いシグナル選択性が認められる。アゴニスト刺激などの生理的なインプットを細胞に与えた場合には複数の細胞内シグナル系が応答し、それに伴った複数のG蛋白質の活性化がほとんど同時に観察される。このような場合に、どのG蛋白質がどの細胞内シグナル系に責任を担っているかを検証す

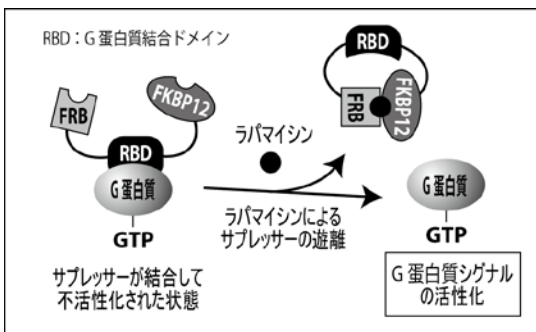
ることはシグナル解析の上で重要な課題となっている。

## ②細胞内シグナルへのG蛋白質の関与—従来の解析手法とその問題点

従来、G蛋白質の細胞内シグナルへの関与を検証するために様々な手法が開発されてきた。特に低分子量G蛋白質の場合、その活性化型変異体 (GTP 水解活性を失った変異体) やドミナントネガティブ変異体 (ヌクレオチド非結合型変異体) がよく利用されている。しかしながら、これらの手法では発現させた変異体が恒常的に細胞内シグナルに影響を与えるため、その影響を考慮しなくてはならない。特に対象としているG蛋白質やシグナル系がフィードバック制御を受ける場合には、これらの手法によるシグナル解析は困難を伴った。

## ③RIRAG 法—ラパマイシンを用いて迅速に低分子量G蛋白質シグナルを活性化する新たな手法

そこで我々は低分子量蛋白質を介した細胞内シグナルを解析するため RIRAG (Rapamycin-Induced Rapid Activation of small GTPase) 法と名付けた手法を新たに開発した。RIRAG 法は、mTOR-FRB ドメインがラパマイシンを介して FKBP12 と結合することを利用した、低分子量G蛋白質シグナルの新たな活性化手法である。この手法では、まず図に示すように「低分子量G蛋白質 (活性化型変異体)」と共に「サプレッサー」分子を細胞内に発現させて、G蛋白質からのシグナ



ルを抑制しておく。なお、ここで用いるサプレッサー分子は、標的とする低分子量G蛋白質に結合するドメインの両端にFRBドメインおよびFKBP12を繋げた融合蛋白質である。ラパマイシンの添加によってサプレッサー分子内のFRBドメインとFKBP12の会合を誘導して、サプレッサー分子の立体構造変化を惹起する。その結果G蛋白質からサプレッサー分子が遊離し、G蛋白質シグナルを活性化

させる。我々は、これまでに、NWASP-CRIBドメインを含むサプレッサー分子とCdc42を組み合わせた本手法が細胞内で機能することを見いだした。

## 2. 研究の目的

### ①Cdc42の活性化に伴う下流シグナル分子の動態解析

RIRAG法は細胞内シグナルの「スイッチ」分子である低分子量G蛋白質の「OFF→ON」を迅速に制御することが可能な手法である。低分子量G蛋白質の場合、迅速な活性化手法がこれまで存在していなかったため、その下流シグナルを高い時間分解能で解析することは困難だと考えられていた。ここではNWASP-CRIBドメインを利用したRIRAG法を、多様な細胞機能を制御するCdc42シグナルの解析に適用し、その下流シグナル分子群の動態を解析することで、RIRAG法がこれまでになかった新たな知見を引き出す手法となることを検証する。

### ②RIRAG法の適用範囲の拡大—システムの構築

RIRAG法を適用するためには、それぞれの低分子量G蛋白質に結合し、かつシグナルに対して阻害的に作用する蛋白質 (の一部ドメイン) が必要である。これまで、Cdc42に対するNWASP-CRIBドメインやRalAに対するSec5-RBDドメインが阻害的に働く蛋白質ドメインとして知られており、事実、前者の組み合わせはRIRAG法に適用できることは上記の通りである。このことは、低分子量G蛋白質に対する下流エフェクター分子のG蛋白質結合ドメインが、最も可能性が高い「サプレッサー」候補分子となることを示している。そこで、ここでは様々な低分子量G蛋白質に関して、その下流シグナルに対して阻害作用を示す (エフェクター分子の) 結合ドメインを探索し、それぞれの低分子量G蛋白質シグナルにRIRAG法を適用することを試みる。

## 3. 研究の方法

### ①RIRAG法を用いたCdc42下流シグナルの解析

我々は既にNWASP-CRIBドメインを用いた「サプレッサー」が細胞内でV12-Cdc42 (活性化型変異体) と結合してシグナルを抑制すること、またラパマイシンの添加に反応して「サプレッサー」とV12-Cdc42が解離するこ

とを見いだしている。

Cdc42 の主要な下流シグナル経路には、NWASP、Arp2/3 を介したアクチン細胞骨格再編成（フィロポディア形成）経路などが知られている。そこで、まずは Cdc42 シグナルをモデル実験系として、RIRAG 法の適用によってこれらの下流シグナル動態の経時変化を詳細に追跡できることを示すことを試みた。ここでは HeLa 細胞を用いて、NWASP など Cdc42 下流シグナルに関わる分子群の、RIRAG 法による Cdc42 活性化（ラパマイシンの添加）に伴う細胞内局在変化を蛍光抗体法等で、またリン酸化の変化をウェスタンブロット法で解析した。また数秒～数十秒のオーダーでの変化を捉える目的で、EGFP アクチンの挙動をライブイメージングの手法を用いて追跡した。

## ②様々な低分子量 G 蛋白質シグナルへの RIRAG 法の応用

ヒトゲノム上には 145 個の低分子量 G 蛋白質が存在し、それぞれが数個から十数個の下流エフェクター分子を持つ。ここでは、目的とした低分子量 G 蛋白質に対して阻害的に働く（エフェクター分子の）G 蛋白質結合ドメインを用いて RIRAG 法の構築を試みた。G 蛋白質結合ドメインの両端にそれぞれ FRB ドメインおよび FKBP12 を付加した「サプレッサー」コンストラクトを作製し、対応する低分子量 G 蛋白質（活性化型変異体）と共に細胞に発現させ、ラパマイシンに応答した低分子量 G 蛋白質シグナルの活性化が起こるか、すなわち RIRAG 法が機能するかを検討した。Rac1 に対しては PAK1-CRIB、H-Ras に対しては Raf1-RBD、Ra1A に対しては Ra1BP1-RBD および Sec5-RBD を用いて「サプレッサー」コンストラクトを作製した。リンカー部の最適化（長さ、配列の変更）やドメイントポロジーの最適化はそれぞれの組み合わせに対して行った。G 蛋白質下流シグナルの解析は下流エフェクター分子の細胞内局在やリン酸化の変化を前項と同様の手法で検出して行った。

## 4. 研究成果

### ①RIRAG 法を用いた Cdc42 下流シグナルの解析

既に最適化されたドメイントポロジーを持つ NWASP-CRIB サプレッサー（FRB-(Gly)<sub>5</sub>-CRIB-FKBP12）と V12-CDC42 を

HeLa細胞に共発現させ、ラパマイシンによる CDC42下流分子の動態を解析した。PAK1のリン酸化やNWASP等の細胞内局在には有意な変化が認められなかった。またEGFPアクチンを発現させた細胞において同様の処理を行ってもフィロポディア形成などのアクチン細胞骨格系の再構成は観察されなかった。この結果は CDC42経路以外のシグナル経路がアクチン細胞骨格制御系に必要とされている可能性を示している。その一方で、これまで CDC42下流に位置するとは考えられていなかった ERK のリン酸化誘導が CDC42シグナルの活性化に伴って惹起されることを見いだした。

CDC42活性化が誘導する ERKリン酸化はラパマイシン添加後3～5分で最大値に達し、その後徐々に減少していくことから、RIRAG法を CDC42シグナルに適用した場合には数分オーダーの時間分解能でシグナル解析が可能であると考えられた。

またサプレッサー分子として従来から用いている NWASP-CRIB 以外にも PAK1-CRIB などを検討したが、PAK1-CRIB では十分なサプレッサー作用が認められなかった。

### ②様々な低分子量 G 蛋白質シグナルへの RIRAG 法の応用

HeLa 細胞を用いて RIRAG 法による H-Ras、Rac1、Ra1A シグナル解析手法の構築を試みた。V12-H-Ras に対しては RAF1-RBD、V12-Rac1 に対しては PAK1-CRIB を用いて RIRAG 法の構築を試みたが、FRB および FKBP12 のドメイントポロジー、またリンカーの配列を変化させてもラパマイシンに応答したこれらの G 蛋白質下流シグナルの活性化を観察することはできなかった。なお H-Ras シグナルは ERK の活性化、Rac1 シグナルは PAK1 のリン酸化および EGFP アクチンの動態で解析した。

また HeLa 細胞に L72-Ra1A および RIRAG サプレッサーを発現させ、GST-Sec5-RBD を用いた Ra1A 活性化アッセイを行ったところ、ラパマイシンの添加に反応して L72-Ra1A の RIRAG サプレッサーからの解離が起こることが確認された。次に RIRAG 法による Ra1A 活性化が secretion の亢進を引き起こすかどうかを検討した。L72-Ra1A および RIRAG サプレッサーを発現させた HeLa 細胞を用いて、RBP4-EGFP をレポーターとする secretion アッセイを行ったところ、予想に反してラパマイシンに反応した RBP4-EGFP の secretion の亢進を認めることができなかった。Ra1BP1-RBD を Sec5-RBD に置

換したRIRAGサプレッサーを用いた場合にも同様の結果となった。一方、ER\*-L72-Ra1Aを発現した細胞を4-OHTで処理してRa1Aシグナルを活性化させる手法ではRBP4-EGFPのsecretionの亢進が認められた。なおER\*は点変異を導入したエストロゲン受容体のリガンド結合ドメインで、生体内のエストロゲンとは結合せずに人工リガンドである4-OHTとのみ結合する。

以上の結果から、①現在のRIRAG法では適用出来るG蛋白質シグナルに(阻害ドメインが存在した場合においても)制限があること、そしてサプレッサーから遊離した活性化型G蛋白質の細胞内局在が適切でないことがその原因の一つと考えられた。②RIRAG法が機能するG蛋白質-サプレッサーの組み合わせが見つかった場合には、これまでの解析手法では見いだせなかった新たな下流シグナル(CDC42下流のERK活性化)が見つかる可能性が示唆された。

本研究と同時期にラパマイシンによってGEFの局在を制御して下流の低分子量G蛋白質を活性化する手法が開発された。RIRAG法の改良によって適用範囲を広げるとともに、GEFを活性化する手法あるいは本研究でもRa1Aの解析に用いたER\*を用いた手法を使い分けながら応用していくことでG蛋白質シグナルのさらなる発展に繋がると考えている。

## 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3件)

①西尾美希、河原康一、佐々木雅人、前濱朝彦、佐々木雄彦、三森功士、森正樹、鈴木聡：核小体を起点としp53を制御する新規分子PICT1による細胞増殖制御機構、実験医学増刊、31、127-134、2013

②Suzuki A, Kogo R, Kawahara K, Sasaki M, Nishio M, Maehama T, Sasaki T, Mimori K, Mori M. A new PICTure of nucleolar stress. Cancer Sci. 2012 Apr;103(4):632-7. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02219.x. Epub 2012 Mar 8. Review. PubMed PMID: 22320853

③Sasaki M, Kawahara K, Nishio M, Mimori K, Kogo R, Hamada K, Itoh B, Wang J,

Komatsu Y, Yang YR, Hikasa H, Horie Y, Yamashita T, Kamijo T, Zhang Y, Zhu Y, Prives C, Nakano T, Mak TW, Sasaki T, Maehama T, Mori M, Suzuki A. Regulation of the MDM2-P53 pathway and tumor growth by PICT1 via nucleolar RPL11. Nat Med. 2011 Jul 31;17(8):944-51. doi: 10.1038/nm.2392. PubMed PMID: 21804542

[学会発表] (計2件)

①Maehama T, Kawahara, K., Nishio, M., Suzuki, A.: Nucleolar stress induces ubiquitin-independent proteasomal degradation of PICT1, 10th International Conference on Protein Phosphatase, 2013. 2. 7-9, Tokyo, Japan

②前濱朝彦:mTORC1制御に関するGタンパク質群の解析、第84回日本生化学会大会、2012. 12. 14-16、福岡

[その他]

ホームページ等

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/from-biochem/912-4th.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

前濱 朝彦 (MAEHAMA TOMOHIKO)

国立感染症研究所・細胞化学部・室長

研究者番号：40322755