

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 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：2014～2015

課題番号：26860181

研究課題名(和文) Ralシグナリングの異常による癌化・癌悪性化の解析

研究課題名(英文) Analysis of Tumorigenesis and Malignant Transformation Induced by Aberrant Ral Signaling

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Ralタンパク質はRasスーパーファミリー低分子量GTP結合タンパク質のメンバーであり、増殖、生存、膜輸送、細胞骨格の再構成など多くの細胞機能を制御している。これまでの多くの知見はRalがヒトの癌化や癌進展に必須であることを示唆しているが、その分子機構は多くが未知である。本研究では新規のRalエフェクタータンパク質を精製、同定した。これらはRalによる癌化、浸潤・転移の制御に関わっている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Ral proteins are members of the Ras superfamily of small GTP-binding proteins that regulate many cellular processes including proliferation, survival, membrane traffic, and cytoskeletal reorganization. Accumulating evidence suggests that Ral is essential for human tumorigenesis and tumor progression. However, its molecular mechanism is largely unknown. In this study we purified and identified novel effector proteins of Ral that may regulate tumorigenesis, invasion, and metastasis.

研究分野：生化学

キーワード：Ral 低分子量GTP結合蛋白質 Ras RalGAP 癌

1. 研究開始当初の背景

Ras に代表される低分子量 GTP 結合タンパク質はヒトでは約 150 種存在し Ras スーパーファミリーを形成している。これらのうち、Ral (Ras-like) は Ras に最も高い類似性を有し、哺乳類では約 80% の相同性をもつ RalA と RalB が存在する。Ral は細胞の増殖、生存、細胞内膜輸送や細胞骨格の制御など様々な細胞機能を担っている (Shirakawa et al, J Biochem, 2015)。Ral も他の低分子量 G タンパク質と同様に GDP が結合した不活性化型と GTP が結合した活性化型の 2 つのコンフォメーションをとり、その活性化は Ral guanine nucleotide exchange factor (RalGEF) により、不活性化は Ral GTPase-activating protein (RalGAP) により制御される。

現在 RalGDS をはじめ、6 種の RalGEF が知られているが、これらのうち 4 種は RalGEF ドメインに加え Ras 結合ドメインをもち、Ras の直接結合により活性化される。したがって、Ral は Ras の下流において活性化される。発癌性 Ras の下流経路としては、MAPK 経路や PI3K 経路が詳細に解析されているが、これまでの多くの知見により Ras 下流での Ral の活性化がヒト細胞の癌化に必須であることを示されている。Ral は発癌性 Ras 依存性の転移にも関わっており、前立腺癌細胞の骨転移に重要であることなどが報告されている。また、膵臓癌組織では Ral の恒常的な活性化が見られることなどが知られている。このように癌化、癌悪性化における Ral の関与を示す知見は蓄積しており、Ral の阻害剤が開発されるなど (Chao Yan et al, Nature, 2014)、癌分野において Ral は非常に注目されているといえる。

Ral の不活性化因子 RalGAP の分子実体については長いあいだ未知であった。研究代表者らは恒常的な活性化型 Ral アフィニティークラムを用いた脳細胞質より RalGAP を精製、分子同定することに成功した (Shirakawa et al, JBC, 2009)。RalGAP は GAP ドメインを有するサブユニットと、サブユニットからなるヘテロ複合体である。サブユニットには約 50% の相同性をもつ 2 つのアイソフォーム (1 および 2) が存在し、それぞれがサブユニットと複合体を形成する (すなわち 1- 複合体および 2- 複合体)。前者を RalGAP1、後者を RalGAP2 と呼ぶ。RalGAP 複合体は低分子量 G タンパク質 Rheb の GAP であり結節性硬化症の原因遺伝子産物である tuberous sclerosis complex に構造上の類似性をもつ。RalGAP サブユニットはユビキタスに発現しているが、サブユニットはアイソフォームにより組織ごとに発現が異なる。

1 は脳や胸腺で、2 は肺や大腸、膀胱で発現が強い。RalGAP の活性制御機構、またその生体における役割については多くが未知である。

2. 研究の目的

これまでの多くの知見が、Ral の異常な活性化が細胞癌化、浸潤・転移に重要であることを示唆している。しかしながら、生体において Ral の関与を示した知見は少なく、また、癌化、浸潤・転移を担う Ral 下流の分子メカニズムについては多くが不明である。本研究では研究代表者らが同定した RalGAP のノックアウトマウスを用い、Ral の異常な活性化が生体におよぼす影響を癌化、浸潤・転移を中心に明らかにすることを目的とした。

Ral のエフェクター分子としては Exocyst、RalBP1 など様々な因子が同定されているが、癌化・癌悪性化に直接関わるエフェクター分子は同定されていない。本研究では癌化、浸潤・転移を担う Ral エフェクターを同定し、Ral 下流シグナリングの分子機構を明らかにすることも目的とした。

3. 研究の方法

RalGAP の解析

本研究では RalGAP 各遺伝子 (RalGAP 1、2、) のノックアウトマウスを用い、過剰な Ral シグナリングが生体におよぼす影響、癌化、癌進展の観点から解析する。各マウスについて自然発癌、および化学発癌モデルを用いた解析を行う。さらに、RalGAP のコンディショナルノックアウトマウスを作製し、組織特異的に RalGAP を欠失させ、Ral の抑制機構の破綻が生体におよぼす影響を解析する。

RalGAP 2 は悪性度の高い浸潤性膀胱癌において発現が抑制されている。エピジェネティックな抑制機構の存在が予想されるため、RalGAP 遺伝子領域の DNA メチル化、ヒストンアセチル化等の修飾を ChIP 法、bisulfate シークエンス法により解析する。また、RalGAP の活性調節機構を明らかにするため、RalGAP 結合タンパク質の探索や、RalGAP のリン酸化等の修飾について解析する。

Ral エフェクターの解析

癌化、癌悪性化に関わる Ral の新規エフェクター分子を同定するために、非水解性 GTP アナログ結合型 Ral によるアフィニティークロマトグラフィーを行い、活性化型 Ral に特定の結合するタンパク質を質量分析法により同定する。同定された分子についてリコンビナントタンパク質を作製し、Ral との結合を確認し、RNA 干渉によるノックダウン法や CRISPR/Cas9 を用いたノックアウト法により増殖や浸潤などの細胞機能を評価する。

4. 研究成果

RalGAP の解析

RalGAP 2 は膀胱上皮で強く発現しているが、

RaIGAP 2 ノックアウトマウスの膀胱では GTP 型 RaI の量が約 2.5 倍に増加していた。研究代表者らは RaIGAP 2 ノックアウトマウスが、尿路上皮特異的な変異源である N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) の投与により、野生型マウスには見られない浸潤性の膀胱癌を多発することを明らかにした。

ヒト膀胱癌細胞では、非浸潤性膀胱癌由来の細胞では RaIGAP 2 が豊富に発現しているが、浸潤性膀胱癌由来の細胞ではその発現がほとんど消失しており、GTP 型 RaI の量が増加していた。レンチウイルスにより RaIGAP 2 遺伝子を導入すると GTP 型 RaI の量が減少することから、これらの細胞における RaI の恒常的活性化は RaIGAP 2 の発現低下によるものであることが示唆された。また、浸潤性膀胱癌細胞株 KU7 はヌードマウス尾静脈注射により肺転移を起こすが、RaIGAP 2 の導入により肺転移は著しく抑制された。GAP 活性を欠く変異体の導入では抑制効果がなかったことから、RaIGAP の発現による RaI の活性調節が転移に重要であることが示された。

膀胱癌検体を用いた免疫染色では、正常尿路上皮では RaIGAP 2 は強く発現していたが、非浸潤性膀胱癌の約半数 (52%)、筋層浸潤性膀胱癌のほぼ全て (93%) で RaIGAP 2 の発現低下を認めた。また、RaIGAP 2 の発現低下は転移と生命予後の低下に強く関連した。

浸潤性膀胱癌細胞株 T24 等では表在性細胞株 RT4 等に比べ RaIGAP 2 の発現が約 1/100 に低下していることを RT-PCR 法により明らかにした。この発現低下はメチル化阻害剤 5-aza やヒストン脱アセチル化阻害剤 TSA により部分的に回復することからエピジェネティックな制御の可能性が示唆された。Bisulfate シークエンス法により浸潤性の膀胱癌細胞株では RaIGAP 2 遺伝子プロモーター領域が高度にメチル化されていることを見いだした。

RaIGAP ノックアウトマウスは胎生期に致死であった。サブユニットの GAP 活性には サブユニットとの複合体化が必須であるため、本マウスでは RaIGAP の活性が完全に欠失していると考えられた。本研究では致死性を回避するために RaIGAP のコンディショナルノックアウトマウスを作製した。RaI の関与が示唆されている膵臓癌、前立腺癌等を解析するために組織特異的 cre トランスジェニックマウスとの交配を進めている。また、RaIGAP コンディショナルノックアウトマウスよりマウス胎児線維芽細胞を樹立し、培養細胞を用いた解析を進めた。

RaI エフェクターの解析

RaI 下流シグナリングの分子機構を明らかにするため、ラット脳細胞質より RaIA 結合キナーゼ複合体を精製し、質量分析法により分

子同定した。さらに、ブタ脳より新規 RaI 結合蛋白質 p140 を同定することに成功した。p140 cDNA をクローニングし、バキュロウイルス発現系を用いてリコンビナントタンパク質を作製した。また、CRISPR/Cas9 法により p140 のノックアウト細胞を作製した。これらの分子は RaI による癌化、癌悪性化の分子基盤の理解につながる可能性がある。

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 6 件)

Shishikura K, Horiuchi T, Sakata N, Trinh DA, Shirakawa R, Kimura T, Asada Y, Horiuchi H. Prostaglandin E2 inhibits neutrophil extracellular trap formation through production of cyclic AMP. *Br J Pharmacol*. 2016 Jan;173(2):319-31. 査読有

Shirakawa R, Horiuchi H. RaI GTPases: crucial mediators of exocytosis and tumorigenesis. *J Biochem*. 2015 May;157(5):285-99. 査読有

Shirakawa R, Horiuchi H. Identification of RaIGAPs and their downregulation in invasive bladder cancer. *Seikagaku*. 2014 Oct;86(5):671-5. 査読無

Yaoita N, Shirakawa R, Fukumoto Y, Sugimura K, Miyata S, Miura Y, Nochioka K, Miura M, Tatebe S, Aoki T, Yamamoto S, Satoh K, Kimura T, Shimokawa H, Horiuchi H. Platelets are highly activated in patients of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014 Nov;34(11):2486-94. 査読有

Kimura T, Shirakawa R, Yaoita N, Hayashi T, Nagano K, Horiuchi H. The antimalarial drugs chloroquine and primaquine inhibit pyridoxal kinase, an essential enzyme for vitamin B6 production. *FEBS Lett*. 2014 Oct 16;588(20):3673-6. 査読有

Chen Q, Quan C, Xie B, Chen L, Zhou S, Toth R, Campbell DG, Lu S, Shirakawa R, Horiuchi H, Li C, Yang Z, MacKintosh C, Wang HY, Chen S. GARNL1, a major RaIGAP subunit in skeletal muscle, regulates insulin-stimulated RaIA activation and GLUT4 trafficking via interaction with 14-3-3 proteins. *Cell Signal*. 2014 Aug;26(8):1636-48. 査読有

[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

東北大学加齢医学研究所基礎加齢研究分野

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

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：