



広大紀要

低分子量 G 蛋白質 Ral の下流に存在する
蛋白質 P0B1 による接着と小胞輸送の制御

(研究課題番号 13670123)

平成 13 年度～平成 14 年度科学研究費補助金
(基盤研究 (C) (2)) 研究成果報告書

平成 15 年 3 月

研究代表者 コヤマ シンヤ 小山眞也



学院医歯薬学総合研究科助教授)

広島大学図書

0130484590



はしがき

生体内には、細胞が個々の役割を果たすために細胞外からのシグナルを受け取って細胞内に伝達し、これを的確に処理する細胞内シグナル伝達機構が存在する。現在では、この細胞内シグナル伝達機構の異常が原因で、がんや高血圧、糖尿病などの多くの疾患が起こることが明らかになっている。細胞内シグナル伝達機構においては、Rasをはじめとする構造が類似した極めて多種の低分子量G蛋白質がスーパーファミリーを形成し、さまざまな細胞機能の制御においてシグナルを伝達するトランスデューサーとして機能していることが明らかとなってきた。もっとも古くから知られているRasはPDGFやEGF、トロンビン、アセチルコリンなどさまざまな細胞外シグナルによって活性化されて遺伝子の発現を制御し、細胞の増殖や分化を制御していることが明らかとなっている。現在、この領域の研究は低分子量G蛋白質の活性化機構と作用機構を分子レベルで解析する段階に入っている。

低分子量G蛋白質の中でも特にRasは多彩な機能を発揮し、ヒトがんと関連も高いことからRasを介するシグナル伝達機構の全貌を明らかにすることは医学、生物学上の重要な課題となっている。Rasは様々な標的蛋白質にシグナルを伝達して機能を発揮する。最も良く研究されているRasの標的蛋白質である蛋白質リン酸化酵素Rafは、シグナルをMAPKカスケードに伝達し、細胞増殖を引き起こす。また、Rasから標的蛋白質ホスファチジル

イノシトール 3-キナーゼに伝えられたシグナルは Rho サブファミリーに属する G 蛋白質である Rac や CDC42 を介して細胞の運動を制御し、また、PKB や GSK-3 β を介してアポトーシスを制御するとされている。RalGDS は、Ras サブファミリーに属する G 蛋白質である Ral を活性化する蛋白として見いだされ、その後 Ras の標的蛋白質である事が明らかとなり、Ras の機能の一部は Ral を通じて発揮されていると推測されている。

一方、Ral の機能はこれまで、細胞内の局在や、結合蛋白質の機能から推測されてきた。まず、細胞内で Ral は細胞膜だけでなくシナプス小胞や血小板のデングラニュールに濃縮されて存在することから、小胞輸送やエクソサイトーシスに関与すると推測されている。また、Ral の結合タンパク質としてはフィラミン、ホスホリパーゼ D、RalBP1 が知られている。フィラミンはアクチンファイバーを架橋する蛋白であり、Ral はフィラミンを介して細胞の運動を制御する可能性がある。ホスホリパーゼ D は、ホスファチジン酸を生成し、小胞輸送に関与するとされている低分子量 G 蛋白質 Arf と機能的に関連している。さらに、RalBP1 は、低分子量 G タンパク質 Rac と Cdc42 の GTP アーゼ活性を促進する活性 (GAP 活性) を持ち、Rac と Cdc42 はフィロポディアやラメロポディアなどの細胞の運動を制御することが知られているので、Ral は RalBP1 を介しても細胞の運動に関与している可能性がある。しかしこれまでのところ細胞内では RalBP1 によって Rac や Cdc42 が制御されている証拠は得られていない。私共は RalBP1 に結合する蛋白質を検索して POB1 を見出し、さらに POB1 は Eps15 と Epsin とに結合することを明らかにした。Eps15 と Epsin は相互に結合するほか、直接あるいはアダプタ

一蛋白質複合体 AP-2 を介して、エンドサイトーシスにおける被覆小窩や被服小胞の裏打ち蛋白質であるクラスリンと結合しエンドサイトーシスに関与している。私は Ral と RalBP1、POB1、Eps15、Epsin の変異体を細胞に発現させ、これらの蛋白質が EGF やインスリンのレセプターのエンドサイトーシスに関与することを明らかにした。

POB1 は C 末端側で RalBP1 と結合し、N 末端側に存在する Eps15 ホモロジー (EH) ドメインを介して、Eps15 と Epsin とに結合する。私は POB1 の C 末端側に結合する RalBP1 以外の蛋白質を検索し、様々な細胞内小胞輸送に関与する蛋白質とともに ASAP1/PAG2 を同定した。ASAP1/PAG2 はアダプター蛋白質パキシリンに結合し、また、Arf に対する GTPase Activating Protein (ArfGAP) の活性を有する。前述したように低分子量 G 蛋白質 Arf は細胞内小胞輸送に関与することが知られているので、パキシリンは Arf を介して細胞内小胞輸送に関与する可能性がある。一方、パキシリンは、細胞外マトリックスに対するレセプターであるインテグリンと、細胞内骨格であるアクチンファイバーとを結び付けるアダプター蛋白質であり、接着班と呼ばれる複合体に局在している。パキシリンはインテグリンを介するシグナル伝達に関与して細胞の細胞外マトリックスに対する結合やマトリックス上の細胞移動を制御しているとされるが、その機能の詳細はあきらかではない。

POB1 は、Ral-RalBP1-POB-Eps15-Epsin 経路の中でレセプターの (クラスリン依存性) エンドサイトーシスを制御するほかに、パキシリンと結合して細胞内小胞輸送や細胞の細胞外マトリックスに対する接着、マトリックス上

の細胞移動を制御する可能性が高く、本研究はこの点を実証し、小胞輸送とマトリックス上の細胞接着や細胞移動の制御機構を分子レベルで明らかにすることを目的としている。

研究組織

研究代表者 : 小山真也 (広島大学大学院医歯薬学総合研究科助教授)

交付決定額 (配分額)

(金額単位: 千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 13 年度	26,000	0	26,000
平成 14 年度	17,000	0	17,000
総計	43,000	0	43,000

研究発表

(1) 学会誌

I. 原著

1. Oshiro, T., Koyama, S., Sugiyama, S., Kondo, A., Onodera, Y., Asahara, T., Sabe, H., and Kikuchi, A.: Interaction of POB1, a Downstream Molecule of Small G Protein Ral, with PAG2, a Paxillin Binding Protein, Regulates Cell Migration. *J. Biol. Chem.*, 277, 38618-38626, 2002

II. 総説

1. Koyama, S., and Kikuchi, A.: Functions of a small GTP binding protein Ral and its downstream molecules. *Recent Res. Dev. Mol. Cell. Biol.*, 2, 193-205, 2001

(2) 口頭発表

1. 大城望史、小山眞也、近藤明子、佐邊壽孝、菊池 章
Ral の下流分子である POB1 と ARF-GAP との結合による細胞運動の制御
第 74 回日本生化学会大会、(平成 13 年 10 月 25 日)
2. 小山眞也、杉山真一郎、大城望史、菊池 章
RalBP1 結合蛋白質 POB1 に結合する新たな蛋白質の検索
第 74 回日本生化学会大会、(平成 13 年 10 月 27 日)

研究成果

(1) POB1 は ASAP1/PAG2 と Ra1BP1 とを異なった部位で結合する。

POB1 の C 末端側を bait としてマウス脳 cDNA ライブラリーをスクリーニングして ASAP1 を単離した。ASAP1 のヒトオルトログである PAG2 と POB1 の deletion mutants を作製し、相互の結合部位を同定した。POB1 は 3 個のプロリンリッチモチーフ (アミノ酸番号 338-345, 374-383, 422-428) を持つ。このうち最も C 末端よりのプロリンリッチモチーフ 422-428 と ASAP1/PAG2 の C 末端に存在する SH3 ドメインとが結合した。プロリン 423/426 をアラニンに変異させた POB1P423/426A は Ra1BP1 とは結合し、PAG2 とは結合しなかった。POB1 の PAG2 結合部位は Ra1BP1 結合部位と異なっており、PAG2 と Ra1BP1 は POB1 を介して三者複合体を形成した。

(2) POB1 は PAG2 による細胞移動の抑制を解除する。 PAG2 は細胞の接着能には影響せず、パキシリンの接着班への集積とフィブロネクチン依存性の細胞移動を抑制した。PAG2 と結合する野生型 POB1 は、PAG2 によるパキシリンの接着班への集積抑制とフィブロネクチン依存性細胞移動の抑制を解除した。一方、Ra1BP1 とは結合し PAG2 とは結合しない POB1P423/426A は解除できなかった。Arf GAP 活性は保持しているが、POB1 との結合部位を欠く PAG2-(1-703) は細胞移動を抑制し、POB1 はこの抑制を解除できなかった。従って POB1 と PAG2 の結合により、PAG2 の生理作用が制御される可能性がしめされた。

おわりに

以上、本研究では Ral の下流に存在する蛋白質 POB1 の新しい生理的意義の確立を試みた。その結果、POB1 が、PAG2 と相互作用することにより細胞外マトリックス依存性の細胞移動にも関与する可能性が示された。

細胞がマトリックス上を移動するためには、1) レセプターであるインテグリンとマトリックスとの結合による細胞外環境のセンシング、2) 進行方向に対して後方での、接着班とストレスファイバーの解消、エンドサイトーシスによる細胞膜成分の回収、3) 小胞輸送による膜成分の移動、4) 移動の先端部でのエクソサイトーシスによる細胞膜成分の補充、5) 接着班とストレスファイバーの再構築という一連のプロセスが、円滑に制御される必要がある。本研究によって POB1 はパキシリン結合蛋白質 PAG2 と細胞内で相互作用することがあきらかとなった。したがって、POB1 はインテグリンに始まるシグナル伝達、接着班の形成・解消に関与する可能性がある。しかし、形態面から名づけられたこれらの細胞生物学的プロセスは、それぞれ、分子レベルでは極めて多くの素過程からなっており、分子的素過程の多くは明らかではない。POB1 は N 末端側でクラスリン依存性のエンドサイトーシスに関与する複数の蛋白質と結合し、C 末端側では Ras シグナル伝達経路の下流にある RalBP1、細胞内小胞輸送に関与する多くの SH3 蛋白質と同時に相互作用することができることから、POB1 が単一の細胞生物学的プロセスに収まらない多数の分子的素過程に関与することは確実である。

最近、特定の蛋白質の特定の機能に作用し、いわば病態の分子的素過程を

標的とした治療薬の実用化が目覚ましい。有効な治療法の確立のために、蛋白質の機能を分子レベルで明らかにすることが急務となっている。エンドサイトシスの制御に関与する分子の遺伝子レベルでの異常が発ガンと関連することが報告されており、また、細胞移動はガンの浸潤と密接に関連することから、POB1 の機能を解析してガン治療へ応用する可能性がある。一方、一般に蛋白質は複数の機能ドメインを持ち、複数の生物学的現象にまたがる多くの素過程に、同時に関与する可能性がある。今後は素過程間の相互作用の解析が重要であると考えられ、本研究で試みられた POB1 の機能解析はこの目標に達する戦略として応用できると考えられる。