

---

低分子量 G 蛋白質 Ral による  
エンドサイトーシスの制御機構の解析

---

(研究課題番号 11670124)

平成 11 年～平成 12 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 13 年 3 月

研究代表者 小山眞也

(広島大学医学部助教授)

## 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三量体型 G 蛋白質以外に、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、トロンピン、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、ヒトがんとの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 $\beta$  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出され、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 の機能を明らかにするために RalBP1 に結合する蛋白質を検索して POB1 を見出した。さらに 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ー蛋白質複合体 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。したがって、Ral と RalBP1、POB1 は、Eps15 と Epsin を介して、これまで予期されていなかったエンドサイトーシスに関与することが

つよく推測された。

EGF やインスリンなどのリガンドが細胞表面の受容体に結合すると、Ras は活性化してシグナルを伝達するが、その際、RalGDS が Ras の標的蛋白質のひとつであるため、細胞膜上の Ral も活性化される。同時にリガンドが結合した受容体は急速にエンドサイトーシスされる。受容体にリガンドが結合したという情報とエンドサイトーシスの制御との間のリンク機構として Ras-RalGDS-Ral と Ral の下流に存在する RalBP1-POB-Esp15-Epsin が機能している可能性が高く、本研究はこの点を実証し受容体のエンドサイトーシス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 (広島大学医学部助教授)

## 研究経費

平成 11 年度	2,200 千円
平成 12 年度	1,400 千円
計	3,600 千円

## 研究発表

### (1)学会誌等

#### I 原著

1. Sawamoto, K., Winge, P., **Koyama, S.**, Hirota, Y., Yamada, C., Miyao, S., Yoshikawa, S., Jin, M-h., Kikuchi, A., and Okano, H. (1999)  
The Drosophila Ral GTPase regulates developmental cell shape changes through the JNK pathway.  
*J. Cell Biol.*, 146(2), 361-372
2. Nakashima, S., Morinaka, K., **Koyama, S.**, Kishida, M., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kishida, S., and Kikuchi, A. (1999)  
Small G protein Ral and its downstream molecules regulate endocytosis of EGF and insulin receptors.  
*EMBO J.*, 18(13), 3629-3642
3. Morinaka, K., **Koyama, S.**, Nakashima, S., Hinoi, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Kikuchi, A. (1999)  
Epsin binds to the EH domain of POB1 and regulates receptor-mediated endocytosis.  
*Oncogene*, 18(43), 5915-5922
4. **Koyama, S.**, Kishida, M., Kishida, S., Matsubara, K., Nakashima, S., Higano, K., Takada, R., Takada, S., and Kikuchi, A. (1999)  
Axin prevents Wnt-3a-induced accumulation of  $\beta$ -catenin.  
*Oncogene*, 18(4), 979-985
5. Kariya, K., **Koyama, S.**, Nakashima, S., Oshiro, T., Morinaka, K., and Kikuchi, A. (2000)  
Regulation of complex formation of POB1/epsin/adaptor protein complex 2 by mitotic phosphorylation.  
*J. Biol. Chem.*, 275(24), 18399-18406

## (2)口頭発表

### I. 国際学会

1. Akira Kikuchi, **Shinya Koyama**, Shosei Kishida  
Regulation of  $\beta$ -catenin signalling in Wnt pathway.  
18th International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Birmingham,  
July 19, 2000

### II. 国内学会

1. 菊池 章、小山眞也、岸田昭世  
Axin を介する $\beta$ -カテニンの分解機構  
日本癌学会第 58 回総会 シンポジウム 蛋白質分解の分子機構と癌、  
(平成 11 年 9 月 29 日)
2. 刈屋憲次、森中賢二、中島真太郎、小山眞也、菊池 章  
低分子量 G 蛋白質 Ral の下流分子の M 期におけるリン酸化と機能変化  
日本癌学会第 58 回総会、(平成 11 年 9 月 29 日)
3. 岸田昭世、山本英樹、岸田想子、池田 聡、小山眞也、菊池 章  
Wnt シグナル伝達系における Axin のリン酸化の役割  
日本癌学会第 58 回総会、(平成 11 年 9 月 29 日)
4. 菊池 章、小山眞也、岸田昭世  
Wnt シグナル伝達系による Myc 遺伝子発現調節機構  
第 72 回日本生化学会大会 シンポジウム Myc の多様性ネットワークの再構成、  
(平成 11 年 10 月 7 日)
5. 菊池 章、小山眞也、岸田昭世  
 $\beta$ -カテニンを介するシグナル伝達と腫瘍形成  
第 22 回日本分子生物学会年会 シンポジウム 腫瘍形成・悪性化の分子メカニズム、  
(平成 11 年 12 月 9 日)

6. 小山眞也、安東知子、菊池 章  
出芽酵母の ENTH ドメイン蛋白質 Ydl161w の温度感受性変異の取得  
第 22 回日本分子生物学会年会、(平成 11 年 12 月 9 日)
7. 小山 眞也、菊池 章  
低分子量 G 蛋白質 Ral とその下流に存在する分子によるエンドサイトーシスの制御  
日本癌学会第 59 回総会 ミニシンポジウム G 蛋白質を介するシグナルネットワーク、(平成 12 年 10 月 5 日)
8. 大城望史、小山眞也、菊池 章  
低分子量 G 蛋白質 Ral の下流分子 POB1 と結合する蛋白質の同定  
第 73 回日本生化学会大会、(平成 12 年 10 月 13 日)

### (3)出版物

1. 小山眞也、岸田昭世、菊池 章  
シナプス小胞のエクソサイトーシスとエンドサイトーシス  
別冊・医学の歩み 神経疾患—state of arts Ver. 1 (中村重信 編) 医歯薬出版、第 1 章 神経疾患理科のための病態生理 pp41-45、1999、672 頁

## 研究成果

私共は RalGDS が Ras の標的蛋白質であり、RalGDS を介して Ras から Ral へ伝達されるシグナルが存在することを提唱してきた。本研究では、Ral ならびに Ral の標的蛋白質として同定された RalBP1 や RalBP1 結合蛋白質として同定された POB1 が、リガンド依存性の受容体のエンドサイトーシスを制御していることを明らかにした。

### (1) リガンド依存性受容体エンドサイトーシス

Ral は EGF とインスリンによって活性化されることから、EGF 受容体およびインスリン受容体のリガンド依存性の受容体エンドサイトーシスに Ral が関与するか否かを解析した。活性型の Ral (Ral<sup>G23V</sup>: 23 番目のグリシンをバリンに置換した Ral の変異体。以下同様に略記する。)、不活性型の Ral (Ral<sup>S28N</sup>)、膜に結合できない Ral (Ral<sup>G23V/C203S</sup>)、の三種類の変異体と野生型 Ral を各々 A431 細胞に発現させて、rhodamine 標識 EGF の細胞内への取り込みを蛍光顕微鏡を用いて観察した。三種類の変異体と野生型 Ral の発現は EGF の受容体への結合には影響しなかったが、Ral<sup>G23V</sup> と Ral<sup>S28N</sup> を発現させると EGF の細胞内への取り込みが抑制された。一方、野生型の Ral と Ral<sup>G23V/C203S</sup> は EGF の取り込みを抑制しなかった。三種類の変異体と野生型 Ral を恒常的に発現する CHO-IR 細胞株を樹立して [<sup>125</sup>I]インスリンの取り込みを生化学的に解析した。三種類の変異体と野生型 Ral の発現はインスリン受容体のインスリンへの結合活性と自己リン酸化活性に影響しなかった。Ral<sup>G23V</sup> と Ral<sup>S28N</sup> を発現させるとインスリンの取り込みが抑制されたが、野生型の Ral と Ral<sup>G23V/C203S</sup> を発現させてもインスリンの取り込みは抑制されなかった。これらの結果から、Ral は EGF 受容体およびインスリン受容体のエンドサイトーシスに関与しており、特に Ral の GDP 型から GTP 型への変換と、膜への結合がエンドサイトーシスの制御に重要であるこ



とが明らかになった。

RalBP1 が EGF 受容体およびインスリン受容体のエンドサイトーシスに関与するか否かを解析するために、RalBP1 の RhoGAP ドメインを含む N 末端側と、Ral および POB1 の結合領域を含む C 末端側の変異体を作成し、A431 細胞と CHO-IR 細胞に導入した。全長の RalBP1 は EGF 受容体の取り込みにもインスリン受容体の取り込みにも影響しなかったが、N 末端側と C 末端側の欠失変異体はこれらの取り込みを抑制した。

POB1 の EH ドメインを含む N 末端側と、RalBP1 結合領域を含む C 末端側の変異体を作成し、同様の解析を行ったところ、両変異体は EGF 受容体とインスリン受容体の取り込みを抑制した。したがって、Ral、RalBP1、POB1 はリガンド依存性の受容体のエンドサイトーシスを制御することが明らかになった。

## (2) 恒常的受容体エンドサイトーシス

受容体エンドサイトーシスは一般的にリガンド依存性のプロセスと恒常的なプロセスに分けることができる。EGF 受容体とインスリン受容体のエンドサイトーシスは両方のプロセスを含んでいる。これに対して、トランスフェリン受容体はリガンドの有無に関係なく恒常的にエンドサイトーシスされ、この受容体のエンドサイトーシスは恒常的なプロセスのみからなることが判っている。Ral、RalBP1、POB1 が恒常的なプロセスに関与するか否かを明らかにするために、これらの蛋白質のトランスフェリンの取り込みに対する影響を解析した。その結果、いずれの蛋白質もトランスフェリン受容体のエンドサイトーシスに影響しないことが明らかとなった。これに対して、Eps15 や Epsin がトランスフェリン受容体のエンドサイトーシスを制御することから、Ral/RalBP1/POB1 は受容体からのシグナルを Eps15 と Epsin に伝達することにより、リガンド依存性の受容体のエンドサイトーシスを制御すると考えられる。

### (3) 細胞分裂期における RalBP1、POB1、Eps15、Epsin のリン酸化

細胞分裂期 (M 期) において、エンドサイトーシスが停止し、その際に蛋白質のリン酸化反応が重要であることが知られているが、その分子機構は不明である。アフリカツメガエルの Epsin ホモログである MP90 は M 期にリン酸化されることが報告されている。そこで、Ral や RalBP1、POB1、Eps15、Epsin が M 期においてリン酸化されるか否かを解析した。Ral は M 期にリン酸化されなかったが、他の四種の蛋白質はリン酸化された。POB1 と Epsin は M 期に活性化される cdc2 キナーゼによりリン酸化され POB1 の 411 番目のセリンと Epsin の 357 番目のセリンがリン酸化された。Epsin は M 期にリン酸化されると、その AP-2 と POB1 への結合が減弱し、さらにインスリン受容体のエンドサイトーシスへの作用が抑制された。Eps15 も M 期にリン酸化されると、AP-2 との結合が抑制されることが報告されているので、これらの分子のリン酸化が M 期におけるエンドサイトーシスの停止に重要な働きをされると考えられる。RalBP1 と POB1 の M 期でのリン酸化の意義は不明である。最近、サイトセントリンと呼ばれる蛋白質が RalBP1 と同一であることが報告された。サイトセントリンは分裂間期 (I 期) には細胞質に瀰漫性に存在しているが、M 期になると中心体に局在する。したがって、RalBP1 と POB1 はリン酸化されると Epsin や Eps15 から乖離して別の蛋白質と結合し、M 期における微小管重合や染色体の分配等を制御する可能性がある。

### (4) 新たな POB1 結合蛋白質の検索

POB1 の M 期におけるリン酸化部位は、EH ドメインから離れた C 末寄りの RalBP1 結合部位の近傍に存在する。POB1 のリン酸化は RalBP1 との結合に影響しなかった。POB1 のリン酸化が何らかの生理的機能を持つと仮定すると、この領域に RalBP1 以外の蛋白質が結合して何らかの機能を営む可能性が推測

される。そこで酵母の two-hybrid 法により、POB1 の C 端側と結合する蛋白質を検索した。その結果、POB1 結合蛋白質の候補としてエンドサイトーシスに関与するとされるエンドフィリン、アンフィファイジン、Ese2/インターセクチンのほか、小胞輸送に関与するスナッピン、Hrs、TOM1L1、ならびに細胞接着と運動に関与する PAG/ASAP、ポンシンが見出された。POB1 はエンドサイトーシス以外に小胞輸送や細胞接着、運動に関与する可能性がある。

## おわりに

以上、本研究では Ral とその下流に存在する Ral の標的蛋白質 RalBP1、RalBP1 結合蛋白質 POB1 のエンドサイトーシス制御機構における役割を解析することを試みた。その結果、Ral ならび RalBP1、POB1 が、インスリンや EGF の受容体のエンドサイトーシスにおいてリガンド依存性プロセスを制御していることを明らかにした。Ral がリガンドの刺激によって Ras-RalGDS を介して活性化されることと、POB1 がリガンド非依存性のプロセスを制御する Eps15 や Epsin に結合することを考え合わせると、Ral-RalBP1-POB1 は受容体からのシグナルを Eps15 や Epsin に伝達する役割を担っていると考えられる。

また、RalBP1 と POB1、Eps15、Epsin のいずれもが M 期にリン酸化され、そのうち RalBP1 と POB1 のリン酸化はエンドサイトーシスを制御しておらず、Eps15 と Epsin のリン酸化が M 期にエンドサイトーシスが停止する機構に関与していると考えられる。RalBP1 と POB1 のリン酸化の機能は明らかではないが、エンドサイトーシスの制御以外の機能を担っている可能性がある。例えば RalBP1 がサイトセントリンと同一の蛋白質であることから、RalBP1 と POB1 が M 期に特徴的な現象である紡錘糸の形成や染色体の配分、細胞質分裂に関与する可能性がある。本研究の過程で、POB1 は、Eps15、Epsin 以外のエンドサ

イトーシスに関与する蛋白質のほか、小胞輸送や細胞の接着と運動に関与する蛋白質と結合し、これらの細胞機能を制御する可能性があることが示された。

最近、エンドサイトーシスの制御に関与する分子の同定は目覚しく、そのいくつかの遺伝子レベルでの異常が発ガンと関連することも報告されている。今後は、エンドサイトーシスに関与するシグナル伝達経路と他の細胞機能を制御するシグナル伝達経路との相互作用の解析が重要であると考えられ、本研究で行われた Ral 下流分子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。

(一六七〇二二四)  
基盤研究(C)(2)

低分子量G蛋白質Rα1による  
エンドサイトーシスの制御機構の解析

(広島大学医学部助教授)  
小山真也

平成一三年三月