

新奇Gサイクルの起動制御と新たな存在様式・ 作動原理の統合的解析

Analysis of the regulation and mode of action
of atypical G-protein cycles

堅田 利明 (KATADA TOSHIAKI)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授



研究の概要

本研究では、GTP結合型とマルチ・ドメイン型という、新奇G蛋白質の時空的起動制御と新たな存在様式・作動原理の解明に向けて、分子、細胞から個体レベルの系で解析を進めている。本研究からGサイクルの統合的理解が深まり、諸種の生理機能の発揮において固有のGサイクルが配置される合目的性が検証され、Gサイクルを標的とした創薬展開が期待できる。

研究分野：生物系薬学、機能生物科学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：生化学、細胞情報伝達機構、G蛋白質

1. 研究開始当初の背景

細胞の広範なシグナル伝達経路において、G蛋白質は分子スイッチとして機能しており、その活性はGDP結合型からGTP結合型へのコンホメーション転換(Gサイクル)によって調節される。これまでにG蛋白質は、1) 蛋白質合成過程に介在する翻訳因子群、2) 受容体刺激のシグナルを伝達する $\alpha\beta\gamma$ ヘテロ三量体、3) 遺伝子発現を介して細胞の増殖・分化を制御するRasや細胞の運動や輸送・分泌に介在するRho、Rab、Arfなどの低分子量G蛋白質ファミリーに分類されてきた。しかし、RasファミリーがRhoあるいはRab様機能である細胞接着や小胞輸送系にも介在する例が多数見出され、さらに本グループは、既存のG蛋白質ファミリーがもつ生化学的性状や構造とは異なる新奇のG蛋白質を多数同定しており、G蛋白質の新しい調節機構と機能は引き続き広がりを見せている。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに解析の進んだ既知タイプとは異なるG蛋白質、1) 従来の刺激依存性GDP-GTP交換によるコンホメーション転換とは異なるGTP結合待機型G蛋白質(Arf、Rasファミリーに属するAr18、Di-Ras)、2) 既知のGドメインに加えて別の機能領域も有するユニークなマルチ・ドメイン型G蛋白質(Arfファミリーに属するAr113b、栄養感知からmTORへのシグナル伝達に介在するヘテロ二量体のG蛋白質Rag)を対象とした。新奇

Gサイクルの起動制御と新たな存在様式・作動原理を解析し、G蛋白質分類の再評価を含めたGサイクルの統合的理解を目指す。

3. 研究の方法

本研究では、GTP結合待機型とマルチ・ドメイン型という、新奇Gサイクルの時空的起動制御と新たな存在様式・作動原理の解明に向けて、精製蛋白質標品を用いた生化学的解析、遺伝子導入やノックダウンによる細胞レベルでの分子生物学・細胞生物学的解析、さらにモデル生物(線虫・マウス)の遺伝子破壊による個体レベルでの分子遺伝学的解析等により、統合的に諸種の階層で研究を進める。特に、Gサイクルの存在様式、G蛋白質相互作用因子群の探索・同定に向けては、組織・細胞内でのインタクナ存在状態が反映されるよう、生体試料からの精製・生化学的バイオアッセイ法を進め、さらに個体レベルでの解析では、Gファミリーメンバーの数が比較的少ない線虫の遺伝学的スクリーニングを利用する。

4. これまでの成果

先に、ARL8がリソソームと後期エンドソーム、ファゴソームとの融合に介在することを見出してきた。本研究では、これらの融合過程におけるARL8の機能的役割を解析する目的で、ARL8と相互作用する因子群の探索を行い、HOPS複合体の構成因子であるVPS41がARL8と物理的に相互作用する知見を得た(論文#3)。さらに、線虫VPS41の欠失変異体や、

HOPS複合体の他の構成因子であるVPS39の欠失変異体では、ar1-8変異体と同様に、アポトーシス細胞を含むファゴソームが多数蓄積した。したがって、ARL8とHOPS複合体が協調的したリソソームとファゴソームや後期エンドソームの融合機構の存在が解明された。

Di-Ras2は神経組織に発現するが、細胞質中でSmgGDSと結合してグアニンヌクレオチド低親和性の状態で存在し、何からの制御機構によりSmgGDSが解離することによってGTPの結合した活性型となり、細胞膜で機能するという知見を得た。これまで単純化して考えられてきたRasファミリーのGサイクルを再考する上で、意義深い研究成果が得られた。

線虫のRagをコードする*raga-1*及び*ragc-1*両遺伝子の欠失変異体を用いた解析から、Ragは食餌中の必須アミノ酸に応答した神経前駆細胞の活性化に介在することを見出した。GTP結合型RAGA-1の過剰発現がアミノ酸非存在下でも神経前駆細胞を活性化し得る点に着目し、同様の表現型を示す変異体をスクリーニングし、これまでに数遺伝子を同定することができた。その中の一つであるmiR-235は、哺乳動物のマイクロRNA miR-92オルソログであり、神経前駆細胞の活性化を負に制御することを見出した。さらに、miR-235の発現は飢餓時に亢進し、摂食によりインスリン経路依存的に抑制されることを解明した(論文#2, 5)。

低分子量G蛋白質Sar1はArfファミリーに属し、小胞体からゴルジ体に向けた細胞内小胞輸送系において機能することが知られている。先に本グループは、VII型コラーゲンを小胞体から分泌経路へと送り込む積み荷受容体として機能するcTAGE5/TANGO1複合体を単離・同定していたが(論文#7)、この複合体がSar1の活性化因子Sec12と相互作用し、VII型コラーゲンの分泌に関与することを見出した。コラーゲンに代表される巨大な分子の分泌には、低分子量G蛋白質Sar1のER exit siteにおける局所的かつ効率の高い活性化が必要であるというGサイクルの新しい作動様式の存在が提起された。

また、共同研究から、Rac1の遺伝子変異がメラノーマの原因となり、その遺伝子変異によってRac1蛋白質のグアニンヌクレオチド交換反応が促進され、活性化型Rac1の量が増加することがメラノーマ発症の原因であることを解明した(論文#4)。このRac1変異は、Rasでよく見られる(G12V)GTP加水分解速度の遅延とは全く異なり、本研究で解析対象としたGTP結合待機型の様相を呈する新奇低分子量G蛋白質とも考えられる。この研究成果は、変異型Rac1の特異的阻害がメラノーマ治療に向けた新たな創薬標的となる可能性を提示しており、低分子化合物ライブラリーを用いた解析を進めている。

5. 今後の計画

引き続き、精製蛋白質標品を用いた生化学的解析、遺伝子導入やノックダウンによる細胞レベルでの解析、さらに線虫・マウスの遺伝子破壊による個体レベルでの解析等を進め、新奇Gサイクルの作動原理と生理機能を解明する。これらの研究成果から、Gサイクルの統合的理解を深め、諸種の生理機能の発現において固有のGサイクルが配置される合目的性の検証、さらにはGサイクルを標的とした創薬へと研究を展開する。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

1. Su S, Phua SC, Derosé R, Chiba S, Narita K, Kalugin PN, Katada T, Kontani K, Takeda S, Inoue T*. Genetically encoded calcium indicator illuminates calcium dynamics in primary cilia. *Nat. Methods* **10** (11): 1105–1107 (2013)
2. Kasuga H, Fukuyama M*, Kitazawa A, Kontani K, Katada T. The microRNA miR-235 couples blast-cell quiescence to the nutritional state. *Nature* **497** (7450): 503–506 (2013)
3. Sasaki A, Nakae I, Nagasawa M, Hashimoto K, Abe F, Saito K, Fukuyama M, Gengyo-Ando K, Mitani S, Katada T, Kontani K*. Arl8/ARL-8 functions in apoptotic cell removal by mediating phagolysosome formation in *C. elegans*. *Mol Biol Cell*. **24** (10): 1584–1592 (2013)
4. Kawazu M, Ueno T, Kontani K, Ogita Y, Ando M, Fukumura K, Yamato A, Soda M, Takeuchi K, Miki Y, Yamaguchi H, Yasuda T, Naoe T, Yamashita Y, Katada T, Choi YL, Mano H*. Transforming mutations of RAC guanosine triphosphatases in human cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110** (8): 3029–3034 (2013)
5. Fukuyama M*, Sakuma K, Park R, Kasuga H, Nagaya R, Atsumi Y, Shimomura Y, Takahashi S, Kajiho H, Rougvié A, Kontani K, Katada T. *C. elegans* AMPKs promote survival and arrest germline development during nutrient stress. *Bio. Open* **1** (1): 929–936 (2012)
6. Tada M, Gengyo-Ando K, Kobayashi T, Fukuyama M, Mitani S, Kontani K*, Katada T. The neuronally expressed Ras-family GTPase Di-Ras modulates synaptic activity in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Cells* **17** (9): 778–789 (2012)
7. Saito K, Yamashiro K, Ichikawa Y, Erlmann P, Kontani K, Malhotra V, Katada T*. cTAGE5 mediates collagen secretion through interaction with TANGO1 at endoplasmic reticulum exit sites. *Mol. Biol. Cell* **22** (13): 2301–2308 (2011)

ホームページ等

URL: <http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~seiri>