

平成 13 年度科学研究費補助金「特別推進研究」

「低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho とその標的蛋白質の細胞内機能の研究」

(平成 8 ~ 12 年度)

平成 13 年 10 月

京都大学・医学研究科・教授・成宮 周

- 研究課題名：低分子量GTP結合蛋白質Rhoとその標的蛋白質の細胞内機能の研究
- 研究期間：平成8年度から平成12年度
- 研究代表者：成宮 周（京都大学医学研究科・教授）

4. 研究の目的・意義及び計画の概要

細胞は様々な刺激を受けて、増殖、接着、遊走、分泌などの反応をおこす。これらの細胞反応は多段階の情報伝達により引き起こされる。このうち、刺激がどのようにして細胞内シグナルに変換されるかの仕組みはかなり解明されたが、細胞内シグナルがいかにして個々の細胞反応に変換されるかは不明な点が未だ多い。低分子量G蛋白質Rhoは、不活性体のGDP結合型と活性化体のGTP結合型の間を往復して、刺激に伴う細胞基質間接着、細胞移動、細胞周期のG1→S期進行、平滑筋収縮、神経突起退縮、細胞質分裂などで分子スイッチとして働く。我々を含むこれまで研究で、これらのRho作用の本質は、細胞基質間接着に見られる細胞接着斑とストレスファイバーの形成や細胞質分裂時の収縮環の誘導など、細胞周期と刺激に応じて細胞内に特異的なアクチン細胞骨格を形成することにあることが明らかであったが、その機構は全く不明であった。本研究の目的は我々が単離した活性化Rhoに選択的に結合するRho標的蛋白質群の機能解析を通じて細胞外・細胞内シグナルがRhoを介してどのようにして上述の細胞反応を発揮するかを明らかにすることであった。

5. 研究成果の概要

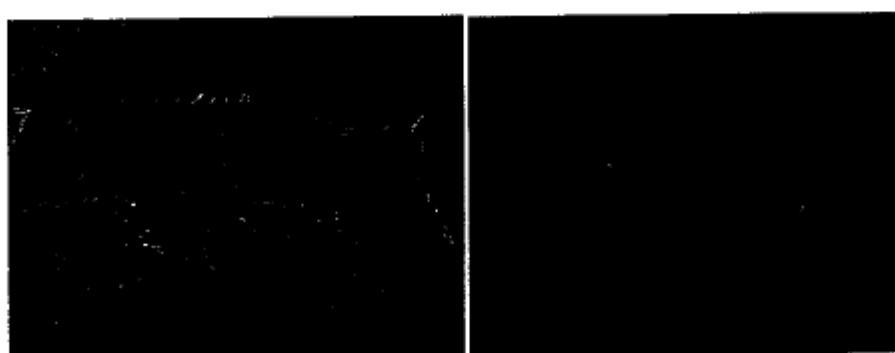
Rho標的蛋白質候補分子としてリン酸化酵素PKN、ROCK、Citron-kinase、アダプター分子mDia、rhophilin、rhotekinを単離し、これらの蛋白質の機能解析を行った。その結果、ROCKが、ミオシン脱リン酸化酵素の不活性を介してアクトミオシンの収縮力を亢進すること、またLIMキナーゼの活性化を介してアクトミオシンの脱重合を抑制すること、さらに、NaH交換体をリン酸化しこれとアクトミオシン結合蛋白質ERMへの結合を促進することなど、ROCKを介してアクトミオシンの収縮力を亢進すること、また、FH2ドメインを介して微小管とアクトミオシンを統合的に制御することを示した。これにより、Rhoからストレスファイバー形成、突起退縮などに至る経路の概要が明らかにされた。更に、ROCK、mDia、Citron kinaseが、細胞質分裂時に分裂溝等に局在しRho標的蛋白質として働くことを示した。また、ROCKの特異的阻害薬Y-27632を発見し、これを用いて、Rho-ROCK経路が高血圧の発現や細胞の悪性化、がんの転移浸潤に関与することを明らかにし、細胞生物学的に明らかにしたRhoの情報伝達経路が病気・病態の発現に重要であり、薬物制御の標的となりうることを示した。これらの成果は、*Nature*, *Science*, *Nature Cell Biology* 各2報、*Nature Medicine* 1報を含む合計50編の論文として公表した。

【当初の研究目的・計画とその達成度】

本科学研究費補助金受領以前、我々は、1987年に発見した Rho を特異的に ADP-リボシル化し不活化するポツリヌス C3 酵素を用いて、Rho がインテグリンを介する細胞基質間接着の調節、細胞質分裂、細胞周期の G1->S 期進行、神経突起退縮に働いていることを明らかにしていた。また、同様の手法で他のグループから、上記の細胞基質間接着の調節は纖維芽細胞では細胞接着斑とアクチン・ストレスファイバーの形成として見られること、さらに、Rho が平滑筋のカルシウム感受性の収縮に働くことや細胞の悪性化に関与することも報告されていた。しかし、その作用発現のメカニズムは全く不明であった。我々は、recombinant Rho 蛋白質を用いた ligand overlay assay や酵母の two hybrid system を用いて GTP 型 Rho に選択的に結合する Rho 標的蛋白質（エフェクター）の検索を行っていたが、上記研究費の受領と前後して、Rho エフェクターの候補分子としてセリン・スレオニンキナーゼである PKN と ROCK (Rho-associated coiled-coil forming kinase)、アダプター分子である rhophilin、rhotekin、citron などを単離した。本特別推進研究では、これらの結果に基づき、これら単離分子の細胞内機能を解析することにより、Rho がどのようにして上述した様々な反応を発揮するかを解明することを目的とした。当初の研究計画は、①上記に加える新規 Rho 標的蛋白質のスクリーニング、②これら Rho 標的蛋白質の機能解析プローブ及び機能解析細胞系の作製、③これを用いた Rho 標的蛋白質の細胞内機能の解析と Rho 標的蛋白質の作用発現機構の解析、④Rho 標的蛋白質の Rho 結合モチーフと Rho の標的蛋白質結合モチーフの同定、⑤ Rho 標的蛋白質の個体内での働きの解析、である。以下に詳述する。これらの目標は、当初の目論見通りではないが、かなりの程度、達成できたと考えている（各項目に対する自己評価は【当該学問研究分野及び関連学問分野への影響】に記した）。

図 1

Rho の関与する
2つの細胞反応
ストレスファイバー
形成（左）と
細胞質分裂（右）

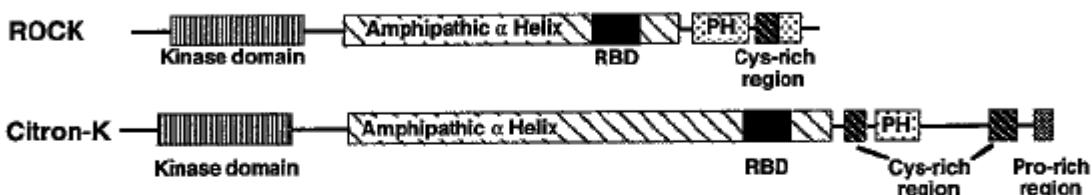


【主な研究成果】

a. 新規 Rho 標的蛋白質の単離（上記計画①に相当）

新規 Rho 標的蛋白質として mDia (mammalian homolog of *Drosophila diaphanous*) と citron のキナーゼアイソフォーム Citron Kinase を新規 Rho エフェクターとして単離 した (*EMBO J.*, 16, 3044-3056, 1997; *Nature*, 394, 491-494, 1998)。これにより計 6 種の Rho 標的蛋白質を得た（図 2）。

Class I: ROCK Family Kinases



Class II: mDia (mDia1, mDia2)



Class III: Molecules containing a PKN/Rhophilin motif

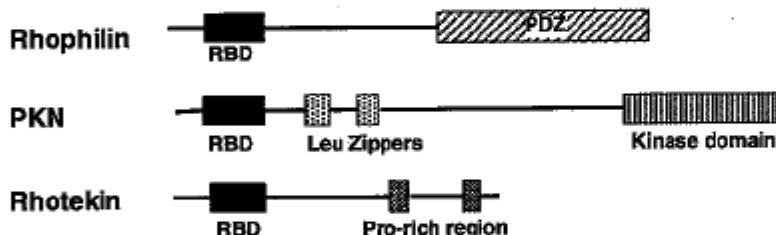


図 2. Rho エフェクター各分子のドメイン構造。この図では、Rho のエフェクターを三つのグループに分け示している。ROCK には、ROCK-1 と ROCK-2 の二つのアイソフォームがあるがドメイン構造は同じである。Citron には kinase domain をもつ Citron-K とこれをもない Citron-N の 2 つのアイソフォームがある。mDia にも、mDia-1 と mDia-2 の 2 種がある。RBD, Rho 結合ドメイン。FH, formin-homology。Rhophilin, PKN, Rhotekin は、ホモロジーの高い RBD を有するので、同一グループに分類してある。

2. Rho 標的蛋白質の細胞内機能の解析とその作用発現機構の解析（上記計画②と③）

A. ROCK キナーゼの機能とシグナル伝達に関する成果

a. ROCK キナーゼの細胞接着斑・ストレスファイバー誘導における役割

ROCK キナーゼの dominant active、dominant negative 体を作成しこれを用いてこの分子が Rho による細胞接着斑形成、ストレスファイバー誘導に関与していることを示した(図 3) (*EMBO J.*, 15, 1885-1893, 1996; *FEBS Lett.*, 404, 118-124, 1997)。



図3。ROCK の dominant negative 体の発現(左)と活性化 Rho の発現に対する dominant negative 体の効果を示す。

b. ROCK キナーゼの特異的阻害薬の発見と ROCK キナーゼのカルシウム感受性の亢進による平滑筋収縮における役割の解明

ROCK キナーゼの特異的阻害薬 Y-27632 を発見し、これを用いて①の所見を裏付けるとともに、この作用機構の解析から ROCK がカルシウム感受性の亢進による平滑筋収縮に関与していること、これがミオシン脱リン酸化酵素の不活化を介していること、を示した(*Nature* 389, 990-994, 1997)。

c. ROCK キナーゼによる $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ exchanger 活性化の解明

ついで、上記 ROCK キナーゼの dominant active、dominant negative 体を用いる分子生物学的実験と ROCK 特異的阻害薬 Y-27632 を用いる薬理学的実験を併用して、ROCK キナーゼがリゾホスファチジン酸(LPA)などの刺激下に Rho の下流で活性化され、1 型 $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ exchanger をリン酸化することにより活性化すること、これが細胞接着斑とストレスファイバー形成に至るシグナル経路の一つであることを示した(*EMBO J.*, 17, 4712-4722, 1998)。

d. 神経突起退縮における Rho-ROCK 経路の役割

同様の手法で、LPA 刺激に伴う神経芽腫細胞 N1E-115 の神経突起退縮反応を解析しここにも Rho-ROCK 経路が働いていること、そのメカニズムの一つはこの経路によるミオシンリン酸化の上昇による収縮性の発現であることを示した(*J. Cell Biol.*, 141, 1625-1636, 1998)。また、同様の機構が神経細胞の axon

形成に際しても働いていることを、マウス小脳 neuron の primary culture 系で示した(*Neuron*, 26, 431-441, 2000)。

e. ROCK キナーゼ→LIM キナーゼのキナーゼカスケードによるコフィリン不活性化経路の発見

上記の N1E-115 細胞の神経突起退縮反応での ROCK キナーゼのシグナル伝達経路を特異的阻害薬 Y-27632 を用いてさらに解析することにより、ROCK が LIM キナーゼをリン酸化することにより活性化し、活性化 LIM キナーゼがアクチン結合蛋白質の一つ cofilin をリン酸化し、その F-アクチン切断活性を抑制することを見出した。これにより、Rho からアクチン脱重合の抑制に至るシグナル経路が同定されたことになる(*Science*, 285, 895-898, 1999)。

f. Rho-ROCK 経路の細胞悪性化への関与と G1 → S 期進行での働き

ROCK 阻害薬と ROCK 変異体の細胞の悪性化に対する効果を foci formation, soft agar での colony 形成、細胞の飽和密度などで検定することにより、Rho-ROCK 経路が Ras や Dbl による細胞の悪性化に働いていることを明らかにした。一方、ROCK 阻害薬を用いた実験から、Rho-ROCK 経路は Rho による細胞周期の G1 → S 期進行には関与しないことも明らかにした(*Curr. Biol.*, 9, 136-145, 1999; *Mol. Pharmacol.*, 57, 976-983, 2000)。

B. p140mDia のアクチン細胞骨格形成における役割の解明

a. p140mDia の発見と構造解析

Rho エフェクターの一つとして mDia を単離、同定し、これが Formin ファミリーに属する蛋白質であること、分子内の FH (formin homology)-1 領域の poly-proline モチーフを通して、アクチン結合蛋白質の一つ profilin を結合し、これが F-アクチンの増加に結び付くことを示した(*EMBO J.*, 16, 3044-3056, 1997)。

b. mDia のストレスファイバー形成での働きの発見

また、mDia の N 端と C 端の分子内で結合することを示し。これをもとに Rho による mDia の活性化機構を明らかにした。ついで、これに基づき両端を欠失した活性化変異体を作製、これが細胞の伸長を誘導しその長軸に沿ったアクチン束の形成を起こすこと、また、この変異体と ROCK の活性化体の共発現により ROCK 単独による無秩序なアクチン束化が矯正されることを示し、整然たるストレスファイバー誘導には Rho の下流で ROCK と mDia が協調して働

くことが必要であることを明らかにした(*Nature Cell Biol.*, 1, 136-1439, 1999)。

c. mDia によるアクチン細胞骨格と微小管の統合制御の発見

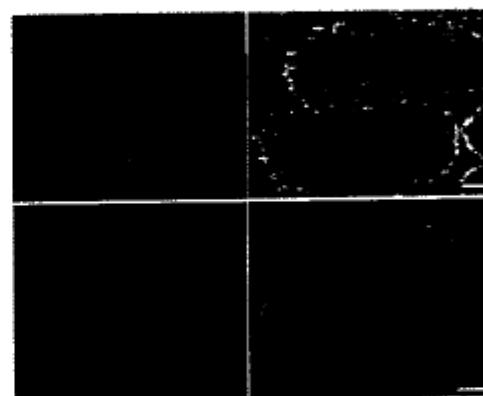
さらに、mDia によるアクチン束の alignment の機構を解析することにより、mDia がアクチンのみでなく微小管の配列も制御していること、配列された微小管が接着斑の形成を促しこれによりアクチンが配向されること、この働きの少なくとも一部は微小管を介するゴルジ装置からのシグナルによること、また、微小管の配列は mDia 分子の FH2 ドメインを介して起こることを明らかにした(図 4) (*Nature Cell Biol.*, 3, 8-14, 2001)。

図 4. 活性化 mDia による微小管の配列

対象 HeLa 細胞(左)と活性化 mDia 発現細胞

(右)のアクチン細胞骨格(上)と微小管(下)

の配列を示す。



以上の解析から明らかになった Rho による細胞接着斑・ストレスファイバー形成のシグナル伝達経路図 5(下図)に示す。

Singaling Pathways of Rho-mediated Cytoskeletal Change

