

# Rasファミリー活性化因子の多様性からのゲノム進化の検討

●望月 直樹<sup>1)2)</sup> ◆松田 道行<sup>2)3)</sup> ◆増田 道隆<sup>1)</sup> ◆福原 茂明<sup>1)</sup>

1) 国立循環器病センター研究所循環器形態部 2) 国立国際医療センター研究所 3) 大阪大学微生物病研究所腫瘍ウイルス分野

## ＜研究の目的と進め方＞

Rasスーパーファミリー制御蛋白質の進化を調べてゲノムの進化の過程を明らかにすることを目的とする。

(1) ヒト低分子量GTP結合蛋白質特にRasファミリー分子のGDP/GTP交換因子(GEF)とGTPase 活性化因子(GAP)のすべてを明らかにして細胞内情報伝達系における機能をまとめる。

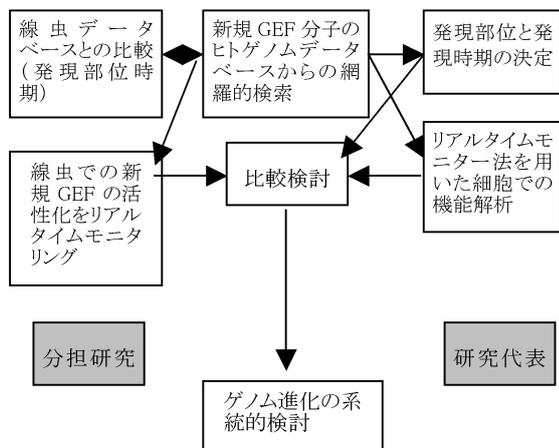
(2) GEF活性化の触媒ドメインは、進化によっても保存されていることを明らかにしてきた。GEFの制御ドメインが特に進化の過程で変化してきていることが予想された。

(3) この制御ドメインの進化における各種族での発現時期を調べることで高次機能の獲得を明らかにする。

(4) 今後も明らかになるgenome情報をもとに新規GEFとGTPase活性化因子の基質特異性を明らかにしていく。

以上の研究目的を遂行することにより、最終的にはいつ、どこでどのような機能獲得を行うためにゲノムが進化してきたのか、すなわち生物が進化してきたのかを明らかにする研究とする。

線虫ゲノムの同遺伝子群との比較により高等生物での高次機能の獲得とゲノム進化とを系統的に解析する。ヒトゲノムが明らかにされ蛋白質の一次構造が明らかにされてもその生物学的機能の解析は実際に細胞・生物を利用して機能解析を行わなければ確実な情報は得られないと考える。したがって、生きた線虫・細胞での低分子量GTP結合蛋白質のリアルタイムモニター法を開発することでRas-GEF蛋白質の網羅的且つ系統的な機能解析が可能となるような、アッセイ法を開発していく。



## ＜研究開始時の研究計画＞

(1) ヒトゲノム配列の完了に伴って RasファミリーGTP結合蛋白質のGEFとGAPについて網羅的検索を行うとともに、全てのGEF・GAPの発現ベクターを準備し、基質特異性をRasファミリー分子について決定する。

(2) ヒトゲノム配列からの情報とともに、線虫、ショウ

ジョウバエなどのゲノムから得られるRasファミリー分子のGEF・GAPについてまとめ、ヒトGEF・GAPとの比較を行う。

(3) RasファミリーGEFのGEFドメインではなく調節ドメインが重要であり、進化と調節ドメインの発現について検討する。RasファミリーGEFと同様に調節ドメインにホモロジーを有し、GEFが基質特異性が変わるGEFが存在しており、この多様性がゲノム進化を決定していると考えている。この判断により、調節ドメインの進化を線虫・ショウジョウバエ・哺乳類で比較検討する。

(4) Rasファミリー分子の活性化の可視化を動物個体で行う。Rasファミリー活性化プローブ発現マウスの作製を行う。Rasファミリーに制限せずRhoファミリー分子のモニタリングマウスも作製する。

Ras分子の活性化の可視化を行うためにFRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)の原理を基にしたプローブを作製する。このプローブは生きた細胞・生物での観察が可能にするためにYellow Fluorescence Protein (YFP), Cyan Fluorescence Protein (CFP)の間のFRETを検出することでRasの活性化を可視化できるようにする。YFP-Ras-Raf(Ras binding domain)-CFPからなるキメラ分子を作製して、GTP結合型の時のみにキメラ分子内のFRETが観察されるように設計していく。可視化マウスはこのキメラ分子をトランスジーンとして発現させるようにする。

(5) RasスーパーファミリーのRhoファミリーのGEFに関しては手付かずのGEF分子が大多数である。このため、RhoファミリーGEFについてのデータベースからの情報検索を行っていく。Rhoファミリー分子もGEFドメイン、GAPドメインは保存されているが、調節ドメインが進化によって変化している可能性もあり、詳細に検討していく。

## ＜研究期間の成果＞

### Rasファミリー分子Rap1の新規GEFの同定

新規Rap-GEFとしてGEFドメインのホモロジーサーチでCal-DAG-GEF-IIIを同定して低分子量GTP結合蛋白質Rasファミリー分子に対する基質特異性を決定した。

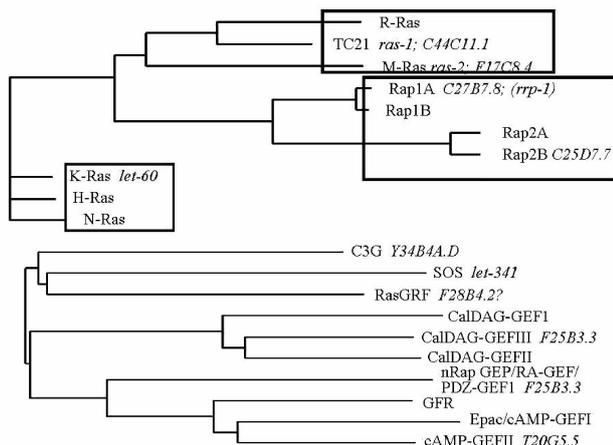
CalDAG-GEFはその名前の由来のようにCa<sup>2+</sup>とDAG (ジアシルグリセロール) による制御を受ける部位 (図A中 EF, C1) を有しておりCalDAG-GEF-IIIもこれまでのI,IIと同様にCa<sup>2+</sup>/DAGの制御をうけることが判った。

CalDAG-GEF-IはRap1, R-Ras群のGEFであり、CalDAG-GEF-IIはH-Ras, R-Ras群のGEFであるが今回新たにCalDAG-GEF-IIIが全てRasファミリーのH-Ras, Rap1, R-Rasに対してGEFとして働くことが判明した。

CalDAG-GEFの局在を調べるためにin situ hybridizationを行ったところ脳ではCalDAG-GEF-Iは基底核、CalDAG-GEF-IIは小脳、CalDAG-GEF-IIIはoligodendrogliaに存在した。また腎臓ではIは間質、IIは集合管、IIIは糸球体mesenchymal細胞に発現を認めた。

これまでにわれわれがゲノム情報から得た、Rasファ

ミラー分子の系統樹とRasファミリー分子のGEFについてのまとめを図に示す。



Rap1活性化因子Epacが細胞-細胞接着を増強させる

Rap1は酵母・線虫・Drosophilaから哺乳類まで保存された低分子量GTP結合蛋白質である。Rap1はRasに拮抗することでその機能を果たすと考えられてきたが、Rap1が細胞-基質間接着だけではなく、細胞-細胞接着の増強を起こすことを明らかにした。cAMPはこれまでプロテインキナーゼA (PKA)を介して生物学的作用を起こすと考えられてきたが、Rap1のGEFであるEpacの活性化を誘導し、引き続いてRap1の活性化により細胞間接着を強めた。

Rasファミリー分子はH-Ras, R-Ras, Rap1ファミリーに大まかに分類でき、GEFが下段に示すようなGEFとなっていた。一部GEFの基質特異性がオーバーラップするものがあつた。特徴的なことは、Rasファミリー分子のH-ras, R-Ras, Rap1がすでに線虫(斜字)にも存在していたことである。加えて、それに対応するように全てのGEFも線虫で保存されていた。GEFは①チロシンキナーゼ受容体分子を介してGEF活性を示すもの②カルシウム、ジアシルグリセロールにより活性化されるもの③cAMPにより活性化されるもの④PDZドメインを有して、特定の部位に局在することによりその活性が制御されるものに大別できた。注目すべき点として、Rap1-GEFのみこの多様性を要求していることであつた。

GEF, GAP活性の基質特異性決定のための新規アッセイ法の確立

ゲノム上で発見した新規GEF, GAPについて基質特異性を明らかにしていく過程で、本研究グループはアイソトープを用いずに基質特異性を検討できる方法を確立した。Rasファミリー分子(H-Ras, Rap1, R-Ras)のGEF, GAP活性をアイソトープを用いずに測定可能なアッセイ方法を確立した。これは二つの改変GFP蛋白質(CFP, YFP)間に起こるFRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) を利用してRasファミリーの活性化を調べるものである。我々はこれをプローブ (Raichuと命名)として新たなGEF, GAPの基質特異性を決定した。KIAA0051はRasGAPドメインを持つがRasに対するGAP活性がないことが明らかになった。

Rhoファミリー分子のGEF, GAPのゲノム情報からの同定

RasスーパーファミリーのGEFの基質特異性について、Rhoファミリーについても拡大して検討した。RhoファミリーGEFはDbl (Dbl Homology), PH (Pleckstrin

Homology) ドメインを有することからData baseの検索は比較的容易であるが、Rhoファミリー間(Rho, Rac, Cdc42)に対するその基質特異性は詳細に調べなければならない。アイソトープを使わずに、RasファミリーGEF, GAPの基質特異性を決定するアッセイ方法とともにRhoファミリー分子, Rho, Rac, CdcのGEF, GAP活性を調べるFRET-based probeを開発した。data baseから得られたDH-PHを有する新規分子についてRhoへのGEF活性を調べた。

(i) Kazusa Human cDNA projectから得たDH-PHを持つDNA (KIAA 0362, 0389, 0793, 1256, 0915)をexpression vectorに組み込みFRET-based Rho, Rac, Cdc42 probeとの共発現により基質特異性を決定した。

(ii) KIAA0380, 0915がRhoGEFとして機能することを明らかにした。0915は血管特異的に発現しRhoGEFとして作用することでRho-Rho kinaseを活性化し、血管の収縮を調節することが予想された。この分子をVsm-RhoGEF (Vascular Smooth Muscle-RhoGEF)と命名してそのGEF活性化の制御機構について検討した。

(iii) Vsm-RhoGEFに対する抗体を作製してその分布局在を検討したところVsm-RhoGEFは全身血管の平滑筋に特異的に発現しており、さらに興味深いことにVsm-RhoGEFはチロシンキナーゼ受容体のEphA4受容体と直接結合していることがわかつた。基質特異性はRhoに特異的であつた。

(iv) Vsm-RhoGEFは本研究で同定した分子として現在もそのノックアウトマウスを作製するなどして、分子の機能を個体で解明中である。相同分子としてEphexinというやはりRhoGEF分子が神経系で発現することがわかつたが、この分子とのredundancyも考えて、ダブルノックアウトマウスも作製している。血管系で特異的に発現していることから、Rhoによる血管収縮に関与することが予想され、血行動態を注意深く観察中である。

Rasファミリー分子活性化の可視化プローブの作製

Ras分子の細胞内あるいは動物個体での活性化を時間的・空間的に解析するためのプローブを作製した。まず、FRET-Basedプローブであり、基本的にはYFP-Ras-Ras binding domain-CFPからなるキメラ分子を作つた。YFP, CFPにはさまれるRasとRasに結合する分子を入れ替えることでRap1, Rac, Rhoなどの活性化可視化プローブを作製することができた。このプローブ (Raichu)を用いて、細胞内でまず、FRETがどこで起きるのかを検証して、Rasの活性化部位を世界で始めて見る事ができた。上皮細胞増殖因子EGFでRaichuを発現するCos1細胞を刺激すると細胞周囲からRasの活性化がはじまり、引き続いて細胞内へと活性化が伝播していくことがわかつた。フォトブリーチングによりアクセプターであるYFPの蛍光消滅を行うとドナーのCFPの蛍光が増加することさらには、Rasの優勢劣性変異体を挿入したRaichu-RasN17ではFRETが減衰したことから、RasのGTP結合依存性にFRETがおきることを反映するプローブであることを確認した。

引き続いてRap1の活性化の可視化プローブを同様に作製した。Rasの代わりにRap1を挿入したものをを用いた (Raichu-Rap1)。このプローブを用いて同様にCos1細胞でRaichu-Rap1を発現するものをEGFで刺激したときには、細胞の内部からRap1が活性化するのを観察できた。これは非常に興味深い知見であつた。RasとRap1が対照的に、細胞外部から細胞内部へ、細胞内部から細胞の末梢にそれぞれ活性化が伝播することがわかつた。これまで、

Rap1がRasに対して拮抗的な、作用を示すのは効果器分子を共有するからであると考えられてきたが、そうではなく、活性化する部位が違うので違ったシグナル系を活性化しているのであろうことが予想された。

#### Ras分子活性化可視化マウスの作製

Raichu分子をマウスで発現させるためにトランスジェニックマウスを作製した。CAGプロモーターによってRaichuを発現するために筋肉や心筋でのRaichuの発現が胎生期から強く、蛍光実体顕微鏡下での観察が可能であったが、成長とともに体毛が増加して成体での観察は不可能であった。また、眼球の血管は成体でも可視化できるために、血管特異的にRaichuを発現するべく、Vascular endothelial cadherin (VE-cadherin)-Creマウスを作製して、CAG-LoxP-neo-LoxP-Raichuマウスと交配するように計画変更した。

#### Rhoファミリー分子の可視化プローブの作製

Rasスーパーファミリー分子であるRhoファミリー分子に対する基質特異性を調べるためにRacの活性化をRasと同様なプローブを用いて検討した。Rasの代わりにRacを挿入して、RBDのかわりにPAKのCRIBドメインで置換したものがRaichu-Racであり、Rhoの活性化も同様に、Rasの代わりにRho, RBDのかわりにRhotekinのRBDを用いたものをRaichu-Rhoがアッセイに有効なプローブとなった。RhoGAPドメインを持つ新規分子をdata baseから選択し、その部分配列ならびに全長配列を用いて基質特異性を調べた。KIAA0053はRhoファミリーのうちCdc42, Racに対してのGAP活性を有した。

#### Rhoの活性化の可視化

Rhoの活性化の可視化を行った。血管内皮細胞にRho活性化の可視化プローブを発現させ、単層培養し、流れ負荷を掛けたときの細胞の運動とRhoの活性化機構についてイメージングを試みた。Rhoが細胞の先端部と運動のretracting tailで活性化していることがわかった。さらにRaichu-Rhoに細胞接着斑の局在シグナルをカルボキシ末端に付加したもの(Raichu-Rho-FAT)を血管内皮細胞で発現させて、自動運動をしたときに細胞接着斑でのRhoの活性化を観察した。観察には細胞底面のみを観察することに適しているエパネッセント顕微鏡を用いた。

#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

Rasファミリーについては十分にGEFをゲノム情報から解明できた。GEFについての基質特異性は本研究グループが詳細に検討して報告してきたものであり、多数のreview誌にも引用されている。特にRap1に関するGEFについては、発現パターン(局在)も詳細に調べて、脳神経系での相補的な発現の違いなど興味深い知見を得た。Rasファミリー低分子量GTP結合蛋白質の殆どのGEFについての基質特異性の決定を行ったことさらには水解促進因子の同定も行ったことで、GEFの網羅的解析に貢献した。

FRETを用いた一波長励起二波長測光をおこなうプローブ(Raichu)を細胞に導入することで、Rasファミリー分子の活性化をアッセイできるシステム・可視化できるシステムを開発した。基質特異性の決定のアッセイ方法について、画期的な方法を開発したと考える。これまで多量のアイソトープを使用しないとGEF活性、GAP活性を検出できなかったが、スクリーニングに用いることができるようなアッセイ法を開発した。これは、FRETをも

とにしてアッセイプローブを作製したものであり、簡単に研究室で行えるアッセイ方法となっている。

また、低分子量GTP結合蛋白質の活性化の可視化プローブを作製して、ゲノム情報で得た分子の機能解析のあらたな手法を開発することができた。これまで網羅的な基質特異性決定を目標に本計画を遂行したが、分子の活性化する場所と時間的なつながりさらには、制御機構が非常に重要であることがわかってきた。前述したように、制御調節ドメインによってGEFの局在や、触媒の活性も制御されており、この時間的空間的広がりによって実際の情報伝達系が機能していることが予想された。FRET-basedプローブを開発し、幅広く生きた細胞で使用することによって、RasやRap1の活性化部位が異なり、さらにその制御に関わるGEFがどんな分子であるかを同定することができた。この仕事はNature誌のcoverページに使用された。

Rasスーパーファミリーのなかでも細胞骨格の制御にかかわるRhoファミリー分子の新たなGAPを同定しその機能を検討した。FRETを使った簡便なアッセイ方法は今後も世界的に広まるものと考えている。また、イメージングによる分子の機能の解析も個体(線虫)で行うためには必要な解析方法となる。イメージングの手法を研究の後半には取り入れることにより、細胞の形態変化とGEF, GAPの活性などを繋げる研究に発展できたものと考えている。特にRhoファミリーG蛋白質は細胞骨格制御を直接アクチンを調節することで担っているので、活性化可視化プローブと形態変化の観察は有意義な研究となった。

また、マウスに可視化プローブを部位特異的に発現する試みはこれまでin vivo イメージング技術を哺乳類に発展させていく一歩となった。本研究ではゲノム進化と機能獲得を解明していくことを目的にしており、どのような高次機能を獲得するためにどのようなゲノム変化がおきたかを詳しく調べるものであり、動物個体でなければ高次機能は解析できないために、不可欠な実験系であった。本来は線虫でこのような、FRET-basedプローブを発現させて、機能とRasファミリー分子の活性化をlinkさせる計画であった。このために、使い慣れたマウスでも生きた動物で活性化モニターリングプローブを発現する動物の作製に成功したことは意義のある結果となった。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

①data baseに登録されているcloneからcDNA全長を得ることにはかなりの時間を要した。depositされているものが全長であることが望ましい。GEF, GAPは概ねcatalytic domainとregulatory domainからなりcDNAが長いことが原因であろうと考える。Rasファミリー分子のGEFについては、全長のクローンをそろえることができたが、Rhoファミリー分子については70近くのGEFについて全ての全長cDNAをそろえることはできなかった。ただし、基質特異性は触媒ドメインだけでも、決定することができた。

②Rasファミリーに比較してRhoファミリー分子のGAPの数が多いため、GAPのすべての基質特異性を調べることができなかった。制御ドメインのなかでもRhoファミリー分子のGAPに認めるFCH (Fer, CIP4 homology)ドメインに着目してこの分子群がどの種から出現し、どこでRhoを制御しているかを明らかにすることができた。③ゲノム線虫から哺乳類までGEFが保存されており、とくに触媒ドメイン(cAMP, Ca, DAG, PDZドメイン)の出現

について進化による差異を見つけることができなかった。したがって、線虫から触媒ドメインを有しており高次機能獲得と進化についての一定の結論を導き出すことはできなかった。個体における分子の活性化には至らなかったが、細胞レベルでは分子の活性化を可視化できたので、ポストゲノムに通ずる実験手法の開発ができたと考える。④線虫でRasファミリー分子活性化プローブを発現させて、分子の機能を線虫個体で可視化することを計画したが、普段から慣れているマウスでの発現を優先させたことにより、線虫での解析にまで進むことができなかった。線虫のどんな機能に対して、Rasファミリー分子が不可欠であるか、またどこで機能することが重要であるかを解明できなかった。線虫を研究対象として、実験系を組むことの複雑さと線虫の分子生物学的手法に精通していないことが困難であった理由と考えられた。

#### 〈今後の課題〉

制御ドメインが種の違いにより①どの時点で出現してきたか②そのGEF, GAPは個体内でどこに出現しているのかを明らかにすることで、どの機能のためにそのGEF, GAPが必要になってきたのかを明らかにすることがゲノムの進化を解明することになると考える。このためには(1) Rasファミリー分子に特化して、Rasファミリー分子の抗体の作製と詳細な発現部位を明らかにすること(2) Rasファミリー分子のGEFに着目して哺乳類の発生段階で、どの部位に発現してくるか？また線虫やショウジョウバエでの様々なGEFの発現部位を同定することでRasファミリー分子の生体での機能が予測できるものとする(3) 上記と平行して、やはり生体での活性化部位をつきとめるためにもin vivoのRasファミリー分子の活性化を可視化できるシステムを構築することが重要と考える。以上GEFの制御ドメイン特異的な組織発現と活性化部位の一致が検討できれば、どのような機能獲得のためにゲノムが進化してきたのか、つまり触媒ドメインは共通していても、制御ドメインの違いによってゲノムが進化してきたことを裏付ける結果を得られるものと予想する。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) 論文  
1. 0303191828  
Akira Endo, Ken-Ichiro Nagashima, Hitoshi Kurose, Seibu Mochizuki, Michiyuki Matsuda, Naoki Mochizuki. Sphingosine1-phosphate induces membrane ruffling and increases motility of human umbilical vein endothelial cells via vascular endothelial growth factor receptor and CrkII. *J. Biol. Chem.*, 277, 23747-23754 (2003)
2. 0303191832  
Ken-Ichiro Nagashima, Akira Endo, Hisakazu Ogita, Akiko Kawana, Akiko Yamagishi, Akira Kitabatake, Michiyuki Matsuda, Naoki Mochizuki. Adaptor protein Crk is required for ephrin-B1-induced membrane ruffling and focal complex assembly of human aortic endothelial cells. *Mol. Biol. Cell*, 13, 4231-4242 (2003)
3. 0403261443  
Kogata, N., Masuda, M., Kamioka, Y., Yamagishi, A., Endo, A., Okada, M., Mochizuki, N. Identification of Fer tyrosine kinase localized on microtubules as a PECAM-1 phosphorylating kinase in vascular endothelial cells. *Mol.*

*Biol. Cell*, 14, 3553-3564 (2003).

4. 403261448

Ogita, H., Kunimoto, S., Kamioka, Y., Sawa, H., Masuda, M., Mochizuki, N. EphA4-mediated Rho activation via Vsm-RhoGEF expressed specifically in vasculature smooth muscle cells. *Circ. Res.* 93 (1), 23-31 (2003).

2) データベース

特記なし

3) 特許

特記なし

4) 他に特記すべき成果

Mochizuki N, Yamashita S, Kurokawa K, Ohba Y, Nagai T, Miyawaki A, and Matsuda M. Spatio-temporal images of growth factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature* 411: 1065-1068, 2001.

ゲノム生物学研究の成果に引き続いた論文

Fujita H, Fukuhara S, Sakurai A, Yamagishi A, Kamioka Y, Nakaoka Y, Masuda M, Mochizuki N. Local activation of Rap1 contributes to directional vascular endothelial cell migration accompanied by extension of microtubules on which RAP1, a Rap1-associating molecule, localizes. *J. Biol. Chem.* 280,5022-5031 (2005)

Fukuhara S, Sakurai A, Sano H, Yamagishi A, Somekawa S, Takakura N, Saito Y, Kangawa K, Mochizuki N. Cyclic AMP potentiates VE-cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through Epac-Rap1 signaling pathway. *Mol. Cell Biol.* 25, 136-146 (2005)

Sakurai A, Fukuhara S, Yamagishi A, Sako K, Kamioka Y, Masuda M, Nakaoka Y, Mochizuki N. MAGI-1 is required for Rap1 activation upon cell-cell contact and for enhancement of VE-cadherin-mediated cell adhesion. *Mol. Biol. Cell* (in press)