
RalGDS を介する低分子量 G 蛋白質 Ras の
シグナル伝達機構による細胞機能制御

(研究課題番号 11470042)

平成 11 年度～平成 12 年度科学研究費補助金
(基盤研究 (B) (2))
研究成果報告書

平成 13 年 3 月

研究代表者 菊池 章

(広島大学医学部教授)

はしがき

低分子量 G 蛋白質 Ras は細胞の増殖や分化など種々の細胞機能を制御する。また、Ras はがん遺伝子産物の一種でもあることから、Ras の作用機構を分子レベルで解明することが現代の医学生理学の重要な課題の一つになっている。この数年間 Ras が直接結合してそのシグナルを伝達する標的蛋白質を見出すことに焦点が絞られていた。その結果、Ras の標的蛋白質として蛋白質リン酸化酵素 Raf が確定した。さらに、MEK キナーゼや PI-3 キナーゼ、Jun キナーゼ、AF6 等も Ras の標的蛋白質であることが示唆され、Ras には複数の標的蛋白質が存在することが決定的になった。しかし、Raf 以外の標的蛋白質を介するシグナル伝達機構の生理機能には不明な点が多く、これらを明らかにすることが、これからの本研究領域の急務となっている。このような状況下において、私共は RalGDS が Ras の新しい標的蛋白質であることを世界に先駆けて見出し、1994 年（平成 6 年度）に報告している。RalGDS は別種の低分子量 G 蛋白質である Ral の活性制御蛋白質であることから、私共は RalGDS を介して Ras から Ral へ伝達される新しい細胞内シグナル伝達機構が存在することを提唱してきた。今後の私共の研究は、これまでの知見を基にして、RalGDS を介する Ras のシグナル伝達機構により制御される細胞機能を明らかにすることが必要であると考えている。

これまで Ral の機能は不明であったが、Ral の標的蛋白質として Ral binding protein 1 (RalBP1)が他のグループにより発見された。しかし、RalBP1 の機能が明らかにならなかったので、私共は RalBP1 と結合する新規蛋白質 POB1 を単離した。さらに、POB1 に結合する新規蛋白質 Epsin も単離した。POB1 と Epsin はその構造上の特徴からクラスリン依存性のエンドサイトーシスに関与する可能性が高い。そこで、本研究ではまず Ral の下流で機能すると考えられる RalBP1、POB1 および Epsin の機能を明らかにすることを第一の目的としている。Ral は 1984 年に発見された低分子量 G 蛋白質で、私共は Ral が遺伝子発現を促進することを明らかにしているが、未だにその機能は判然としない。一方、Ral は種々の細胞で細胞内小胞に局在していることから、エンドサイトーシスやエクソサイトー

シスに参与していることが示唆されている。そこで、本研究では Ral の機能、特にエンドサイトーシスにおける役割を解明することを第二の目的にしている。さらに、RalGDS を介するシグナル伝達経路が Ras の他の標的蛋白質を介するシグナル伝達経路と相乗的に作用してどのような細胞機能を制御するかを解明することを第三の目的としている。最終的には Ras により制御されるシグナル伝達機構と細胞機能の全貌を解明したい。

研究組織

研究代表者 : 菊池 章 (広島大学医学部教授)
研究分担者 : 岸田昭世 (広島大学医学部助手)
 安東知子 (広島大学医学部助手)
 岸田想子 (広島大学医学部教務員)

研究経費

平成 11 年度	10,700 千円
平成 12 年度	3,800 千円
計	14,500 千円

研究発表

(1) 学会誌

I 原著

1. Nakashima, S., Morinaka, K., Koyama, S., Ikeda, M., Kishida, M., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kishida, S., and Kikuchi, A.: Small G protein Ral and its downstream molecules regulate endocytosis of EGF and insulin receptors. *EMBO J.*, 18, 3629-3642, 1999
2. Kitagawa, M., Hatakeyama, S., Matsumoto, M., Ishida, N., Shirane, M., Kikuchi, A., Nakayama, K-Z., and Nakayama, K.: An F-box protein FWD1 promotes degradation of β -catenin as a component of SCF ubiquitin ligase. *EMBO J.*, 18, 2401-2410, 1999
3. Sawamoto, K., Winge, P., Koyama, S., Hirota, Y., Yamada, C., Miyao, S., Yoshikawa, S., Jin, M-h., Kikuchi, A., and Okano, H.: The Drosophila Ral GTPase regulates developmental cell shape changes through the Jun NH2-terminal kinase pathway. *J. Cell Biol.*, 146, 361-372, 1999
4. Kishida, S., Yamamoto, H., Hino, S., Ikeda, S., Kishida, M., and Kikuchi, A.: DIX domains of Dvl and Axin are necessary for protein interactions and their ability to regulate β -catenin stability. *Mol. Cell. Biol.*, 19, 4414-4422, 1999
5. Yamamoto, H., Kishida, S., Kishida, M., Ikeda, S., Takada, S., and Kikuchi, A.: Phosphorylation of Axin, a Wnt signal negative regulator, by glycogen synthase kinase-3 β regulates its stability. *J. Biol. Chem.*, 274, 10681-10684, 1999

6. Fukata, M., Kuroda, S., Nakagawa, M., Kawajiri, A., Itoh, N., Shoji, I., Matsuura, Y., Yonehara, S., Fujisawa, H., Kikuchi, A., and Kaibuchi, K.: Cdc42 and Rac1 Regulate the Interaction of IQGAP1 with β -catenin. *J. Biol. Chem.*, 274, 26044–26050, 1999
7. Kodama, S., Ikeda, S., Asahara, T., Kishida, M., and Kikuchi, A.: Axin directly interacts with plakoglobin and regulates its stability. *J. Biol. Chem.*, 274, 27682–27688, 1999
8. Moriguchi, T., Kawachi, K., Kamakura, S., Masuyama, N., Yamanaka, K., Matsumoto, K., Kikuchi, A., and Nishida, E.: Distinct domains of mouse dishevelled are responsible for the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activation and the axis formation in vertebrates. *J. Biol. Chem.*, 274, 30957–30962, 1999
9. Kishida, M., Koyama, S., Kishida, S., Matsubara, K., Nakashima, S., Higano, K., Takada, R., Takada, S., and Kikuchi, A.: Axin prevents Wnt-3a-induced accumulation of β -catenin. *Oncogene*, 18, 979–985, 1999
10. Matsubara, K., Kishida, S., Matsuura, Y., Kitayama, H., Noda, M., and Kikuchi, A.: Plasma membrane recruitment of RalGDS is critical for Ras-dependent Ral Activation. *Oncogene*, 18, 1303–1312, 1999
11. Sawamoto, K., Yamada, C., Kishida, S., Hirota, Y., Taguchi, A., Kikuchi, A., and Okano, H.: Ectopic expression of mutationally-activated RalGTPase inhibits cell shape changes during *Drosophila* eye development. *Oncogene*, 18, 1967–1974, 1999

12. Morinaka, K., Koyama, S., Nakashima, S., Hinoi, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Kikuchi, A.: Epsin binds to the EH domain of POB1 and regulates receptor-mediated endocytosis. *Oncogene*, 18, 5915–5922, 1999
13. Shirouzu, M., Hashimoto, K., Kikuchi, A., and Yokoyama, S.: Double-mutant analysis of the interaction of Ras with the Ras-binding domain of RGL. *Biochemistry*, 38, 5103–5110, 1999
14. Koshihara, S., Kigawa, T., Iwahara, J., Kikuchi, A., and Yokoyama, S.: Solution structure of the Eps15 homology domain of a human POB1 (partner of RalBP1). *FEBS Lett.*, 442, 138–142, 1999
15. Andoh, T., Hirata, Y., and Kikuchi, A.: Yeast glycogen synthase kinase 3 is involved in the protein degradation in cooperation with Bul1, Bul2 and Rsp5. *Mol. Cell. Biol.*, 20, 6712–6720, 2000
16. Kariya, K., Koyama, S., Nakashima, S., Oshiro, T., Morinaka, K., and Kikuchi A.: Regulation of complex formation of POB1/Epsin/adaptor protein complex 2 by mitotic phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 275, 18399–18406, 2000
17. Sakamoto, I., Kishida, S., Fukui, A., Kishida, M., Yamamoto, H., Hino, S., Michiue, T., Takada, S., Asashima, M., and Kikuchi A.: A novel β -catenin binding protein inhibits β -catenin-dependent Tcf activation and axis formation. *J. Biol. Chem.*, 275, 32871–32878, 2000

18. Hinoi, T., Yamamoto, H., Kishida, M., Takada, S., Kishida, S., and Kikuchi A.: Complex formation of adenomatous polyposis coli gene product and Axin facilitates glycogen synthase kinase-3 β -dependent phosphorylation of β -catenin and downregulates β -catenin. *J. Biol. Chem.*, 275, 34399–34406, 2000
19. Kadoya, T., Kishida, S., Fukui, A., Hinoi, T., Michiue, T., Asashima, M., and Kikuchi, A. : Inhibition of Wnt signaling pathway by a novel Axin-binding protein. *J. Biol. Chem.*, 275, 37030–37037, 2000
20. Ikeda, S., Kishida, M., Matsuura, Y., Usui, H., and Kikuchi, A.: GSK-3 β -dependent phosphorylation of adenomatous polyposis coli gene product can be modulated by β -catenin and protein phosphatase 2A complexed with Axin. *Oncogene*, 19, 537–545, 2000
21. Hanada, N., Makino, K., Koga, H., Morisaki, T., Kuwahara, H., Masuko, N., Tabira, Y., Hiraoka, T., Kitamura, N., Kikuchi, A., Saya, H.: NE-dlg, a mammalian homolog of *Drosophila* DLG tumor suppressor, induces growth suppression and impairment of cell adhesion: Possible involvement of down-regulation of β -catenin by NE-dlg expression. *Int. J. Cancer*, 86, 480–488, 2000
22. Fukui, A., Kishida, S., Kikuchi, A., and Asashima, M.: Effects of rat Axin domains on axis formation in *Xenopus* embryos. *Develop. Growth Differ.*, 42, 489–498, 2000

23. Hino, S., Kishida, S., Michiue, T., Fukui, A., Sakamoto, I., Takada, S., Asashima, M., Kikuchi, A.: Inhibition of Wnt signaling pathway by Idax, a novel Dvl-binding protein. *Mol. Cell. Biol.* 21, 330–342, 2000
24. Itoh T., Koshiha S., Kigawa T., Kikuchi A., Yokoyama S., Takenawa T.: Role of the ENTH domain in phosphatidylinositol -4,5- bisphosphate binding and endocytosis. *Science*, 291(5506), 1047–1051, 2001
25. Koshiha, S., Kigawa, T., Kikuchi, A., and Yokoyama, S.: Solution structure of the epsin N-terminal homology (ENTH) domain of human epsin. *J. Struct. Funct. Genomics*, in press
26. Yamamoto, H., Hinoi, T., Fukui, A., Michiue, T., Usui, H., Janssens, V., Van Hoof, C., Goris, J., Asashima, M., and Kikuchi, A.: Inhibition of the Wnt Signaling Pathway by the PR61 subunit of protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.*, in press

II 総説

1. Kikuchi, A.: Roles of Axin in the Wnt signaling pathway. *Cellular Signaling*, 11, 777–788, 1999
2. Kikuchi, A.: Modulation of Wnt signaling by Axin and Axil. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 10, 255–265, 1999
3. Kikuchi, A.: Regulation of β -catenin signaling in the Wnt pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 268, 243–248, 2000

4. 山本英樹、岸田昭世、菊池 章
Wnt シグナル伝達抑制因子 Axin による β カテニンの分解制御機構
G. I. Research、7 巻 6 号, 512-517, 1999
5. 岸田昭世、菊池 章
 β カテニンの分解制御機構と癌
Molecular Medicine、37 巻 2 号, 166-175, 2000
6. 角舎学行、岸田昭世、菊池章
Axin
分子細胞治療、1 巻 4 号, 90-92, 2000
7. 岸田想子、岸田昭世、菊池章
Wnt シグナル伝達経路における分子間相互作用とその制御機構
シグナル伝達ネットワーク 現代化学増刊 37 巻, 115-122, 2000
8. 日野真一郎、岸田昭世、菊池章
Wnt シグナル伝達経路による体軸形成制御
細胞工学、19 巻 11 号, 1606-1615, 2000
9. 刈屋憲次、菊池章
EH ドメインを有する蛋白質によるエンドサイトーシスの制御機構
実験医学増刊 18 巻 18 号プロテオーム研究とシグナル蛋白ドメイン,
2546-2552, 2000

(2) 口頭発表

I. 国際学会

1. Akira Kikuchi

Roles of Axin, a Wnt signal negative regulator, in cell proliferation and axis formation.

7th Japanese-German Workshop on “Molecular and Cellular Aspects of Carcinogenesis”, Essen, July 29, 1999

2. Akira Kikuchi

Regulation of β -catenin signaling 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 β -catenin の分解機構

第 58 回日本癌学会総会シンポジウム、(平成 11 年 9 月 29 日)

2. 北川雅敏、畠山鎮次、菊池 章、中山啓子、中山敬一

β -catenin のユビキチン化に関わる分子 FWD1 の同定と機能解析

第 58 回日本癌学会総会ワークショップ、(平成 11 年 10 月 1 日)

3. 刈屋憲次、森中賢二、中島眞太郎、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

第 58 回日本癌学会総会、(平成 11 年 9 月 29 日)

4. 中島真太郎、森中賢二、池田昌博、岸田想子、大川克也、岩松明彦、岸田昭世、菊池章
低分子量 G 蛋白質 Ral の下流分子による受容体依存性エンドサイトーシスの制御
第 58 回日本癌学会総会、(平成 11 年 9 月 29 日)
5. 池田 聡、松浦善治、菊池 章
 β -catenin と PP2A による GSK-3 β 依存性の Axin および APC のリン酸化の制御
第 58 回日本癌学会総会、(平成 11 年 9 月 29 日)
6. 日野真一郎、岸田昭世、山本英樹、池田 聡、岸田想子、菊池 章
ヒト Dishevelled ホモログ Dvl-1 の DIX ドメインに結合する蛋白質の同定
第 58 回日本癌学会総会、(平成 11 年 9 月 29 日)
7. 山本英樹、岸田昭世、日野真一郎、池田 聡、岸田想子、菊池 章
Dvl による GSK-3 β 依存性 β -catenin、APC のリン酸化の抑制
第 58 回日本癌学会総会、(平成 11 年 9 月 29 日)
8. 岸田昭世、山本英樹、岸田想子、池田 聡、小山真也、菊池 章
Wnt シグナル伝達系における Axin のリン酸化の役割
第 58 回日本癌学会総会、(平成 11 年 9 月 29 日)
9. 徳王 宏、湯之上俊二、菊池 章、西 徹、木本真順美、辻 英明、小野友道、佐谷秀行、荒木令江
神経線維腫症 1 型 (NF1) 遺伝子産物の腫瘍抑制機構の解析
第 58 回日本癌学会総会、(平成 11 年 9 月 30 日)
10. 角舎学行、岸田昭世、檜井孝夫、菊池 章
Axin に結合する新規蛋白質の同定
第 58 回日本癌学会総会、(平成 11 年 10 月 1 日)

11. 仲 一仁、国安弘基、田原栄俊、田原栄治、安井 弥、横崎 宏、井出利憲、菊池 章、田原榮一
胃癌細胞株における INF 誘導分子 6-16 の分子間相互作用の解析
第 58 回日本癌学会総会、(平成 11 年 10 月 1 日)
12. 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、(平成 11 年 10 月 7 日)
13. 徳王 宏、湯之上俊二、服部成介、木本真順美、辻 英明、菊池 章、小野友道、佐谷秀行、荒木令江
神経線維腫症 1 型 (NF1) 遺伝子産物の細胞内結合蛋白質を介した機能制御機構
第 72 回日本生化学会大会、(平成 11 年 10 月 9 日)
14. 菊池 章、小山眞也、岸田昭世
 β -catenin 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ワークショップ、(平成 11 年 12 月 9 日)
15. 安東知子、平田雄三、菊池 章
出芽酵母 GSK-3 および Rsp5 結合因子 Bul1,2 依存的に分解される新規蛋白質 Ygl144c
第 22 回日本分子生物学会年会、(平成 11 年 12 月 7 日)
16. 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)
17. 坂本郁男、岸田昭世、福井彰雅、岸田想子、山本英樹、道上達男、高田慎治、浅島誠、菊池 章
 β -catenin と結合する新規蛋白質 Duplin の同定と機能解析
第 22 回日本分子生物学会年会、(平成 11 年 12 月 9 日)

18. 菊池 章、岸田 昭世、岸田 想子、山本 英樹
Wnt 経路における β -カテニンのシグナル伝達とがん
第 59 回日本癌学会総会シンポジウム、(平成 12 年 10 月 6 日)
19. 桧井 俊英、山本 英樹、岸田 想子、岸田 昭世、菊池 章
Axin/APC 複合体による GSK-3 β 依存性の β -カテニンのリン酸化と
分解の促進
第 59 回日本癌学会総会ミニシンポジウム、(平成 12 年 10 月 5 日)
20. 日野 真一郎、岸田 昭世、菊池 章
Wnt シグナル伝達経路の構成分子 Dvl の PDZ 領域と結合する新規蛋
白質の同定と機能解析
第 59 回日本癌学会総会ミニシンポジウム、(平成 12 年 10 月 5 日)
21. 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
第 59 回日本癌学会総会ミニシンポジウム、(平成 12 年 10 月 5 日)
22. 角屋学行、岸田昭世、菊池 章
Wnt シグナル抑制因子 Axin に結合する新規蛋白質の同定とその機能解
析
第 59 回日本癌学会総会、(平成 12 年 10 月 5 日)
23. 菊池 章、岸田 昭世、岸田 想子、山本 英樹
Wnt シグナル伝達機構を構成する新規分子による体軸形成制御
第 73 回日本生化学会大会シンポジウム、(平成 12 年 10 月 12 日)
24. 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)

25. 川村勇樹、菊池 章、高田律子、高田慎治、芝本さゆみ、柳澤勝彦、駒野宏人
Wnt シグナル伝達系におけるプレセニン1 の役割
第 73 回日本生化学会大会、(平成 12 年 10 月 13 日)
26. 菊池 章、岸田 昭世、岸田 想子、山本 英樹
Wnt シグナル伝達における β -カテニンのリン酸化の制御機構
第 23 回日本分子生物学会年会ワークショップ、(平成 12 年 12 月 15 日)
27. 古橋正男、八木 健、島田眞路、山本英樹、菊池 章、加藤光保、宮園浩平
TGF- β シグナルと Wnt シグナルのクロストーク-TGF- β シグナルに対する Axin の作用について
第 23 回日本分子生物学会年会、(平成 12 年 12 月 13 日)
28. 山本英樹、檜井俊英、岸田昭世、菊池 章
Axil に結合する蛋白質の同定とその生理機能解析
第 23 回日本分子生物学会年会、(平成 12 年 12 月 13 日)
29. 小林雅史、岸田昭世、宮本洋一、米田悦啓、菊池 章
 β -カテニン結合蛋白質 Duplin の核輸送の分子機構
第 23 回日本分子生物学会年会、(平成 12 年 12 月 14 日)
30. 安東知子、平田雄三、八代田英樹、菊池 章
GSK-3 の解析から明らかになりつつある hect 型ユビキチンキナーゼ Rsp5 の機能制御機構
第 23 回日本分子生物学会年会、(平成 12 年 12 月 15 日)
31. 平田雄三、安東知子、菊池 章
出芽酵母を用いた GSK-3 により正に制御される分子の探索
第 23 回日本分子生物学会年会、(平成 12 年 12 月 15 日)

(3) 出版物

小山真也、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」神経疾患—state of arts (Ver.1) 中村重信 編 医歯薬出版 41-45, 1999

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 に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 の標的蛋白質である RalBP1 とその結合蛋白質の機能を解析することにより RalGDS を介する Ras のシグナル伝達機構の生理的意義を明らかにすることを試み、以下の結果を得た。

1 Ral の下流分子の同定

(1) POB1

低分子量 G 蛋白質の機能を明らかにするためにはその標的蛋白質を同定することが必要である。Ral の標的蛋白質として RalBP1 が報告された。RalBP1 はその C 末端側で活性型の Ral と結合し、N 末端側には低分子量 G 蛋白質 CDC42 と Rac に対する GAP 活性を有する領域が存在した。しかし、RalBP1 が CDC42 や Rac の機能を細胞レベルで制御することはこれまでに報告されず、RalBP1 の機能は不明であった。そこで、私共は RalBP1 と結合する新規蛋白質を同定し、POB1 (Partner of RalBP1) と名付けた。POB1 は RalBP1 上の Ral 結合部位とは異なる領域に結合し、Ral/RalBP1/POB1 の三量体が形成された。また、POB1 は RalBP1 ばかりでなく Grb2 とも結合し、EGF 刺激によりチロシンリン酸化され、EGF 受容体と複合体を形成した。したがって、POB1 は EGF のシグナル伝達に関与する可能性が示唆された。さらに、POB1 の N 末端側には、Eps15 の N 末端側に約 70 個のアミノ酸からなる 3 回の繰り返し構造として同定された EH ドメイン (Eps 15 Homology) が存在した。Eps15 は EGF 受容体によりチロシンリン酸化される基質として見出された分子量 15 万の蛋白質である。酵母の Pan1 や End3、YBL0520、線虫の YNJ6 には Eps15 の EH ドメインとホモロジーのある構造が含まれる。End3 の EH ドメインに変異を加えるとエンドサイトーシスが障害されることや Pan1 の EH ドメインが End3 と結合することから、酵母では EH ドメインを介して蛋白質の相互作用が起こり、エンドサイトーシスが制御されると考えられている。哺乳動物細胞でも EH ドメインを有する蛋白質が複数存在する。

Eps15 はそのC末端側でクラスリン依存性のエンドサイトーシスに参与する AP2 と結合して、EGF や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。したがって、酵母から哺乳動物細胞に至るまで EH ドメインを有する蛋白質は受容体のエンドサイトーシスを制御する可能性が高く、POB1 もその機能を有すると考えられた。

(2) POB1 結合蛋白質 Epsin と Eps15

POB1 の機能を明らかにするために EH ドメインと結合する蛋白質を見出すことを試みた。牛大脳から分子量 13 万と 8,4 万の二種類の蛋白質 (p130 と p84) が POB1-EH ドメイン結合蛋白質として精製された。アミノ酸シーケンスの結果から p130 は Eps15 で、p84 は Epsin であることが明らかになった。Epsin は Eps15 結合蛋白質として同定された蛋白質で、AP2 やクラスリンと結合して、EGF や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。POB1 の EH ドメインは Epsin の C 末端側に存在する NPF (Asp-Pro-Phe) モチーフと直接結合した。この結果は EH ドメインの結合は NPF モチーフを介するという一般的な概念と一致している。さらに、POB1 の EH ドメインは Eps15 の C 末端側と直接結合したが、この領域には NPF モチーフが存在せず、EH ドメインは NPF モチーフ以外とも結合することが示唆された。前述した通り、Eps15 と Epsin はエンドサイトーシスを制御する重要な蛋白質であるので、POB1 はその EH ドメインを介して Eps15 や Epsin と結合することによりエンドサイトーシスを制御すると考えられる。

2 Ral を介するシグナル伝達機構の機能

(1) リガンド依存性受容体エンドサイトーシス

Ral の機能はこれまで判然としていないが、Ral が細胞膜ばかりでなく細胞内小胞にも存在することから、細胞内小胞輸送に参与する可能性が考えられていた。Ral は EGF とインスリンにより活性化されることから、Ral の EGF 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参与するか否かを解析した。活性型の Ral (RalG23V)、不活性型の Ral (RalS28N)、膜に結合できない Ral (RalG23V/C203S) の 3 種類の変異体と野生型の Ral を A431 細胞に発現させて、EGF の取り込みを顕微

鏡下で観察した。3種類の変異体と野生型の Ral の発現は EGF の結合に影響しなかったが、RalG23V と RalS28N を発現させると EGF の取り込みが抑制された。一方、野生型の Ral と RalG23V/C203S は EGF の取り込みを抑制しなかった。3種類の変異体と野生型の Ral を恒常的に発現する CHO-IR 細胞株を樹立して、インスリンの取り込みを生化学的に解析した。3種類の変異体と野生型の 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。RalG23V と RalS28N 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 RalG23V/C203S はインスリンの取り込みを抑制しなかった。これらの結果から、Ral は EGF 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 型と GTP 型の変換と、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 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製し、A431 細胞と CHO-IR 細胞に導入した。全長の RalBP1 は EGF の取り込みにもインスリン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 結合部位を含む C 末端側の 2 種類の欠失変異体を作製して、同様の解析を行ったところ、両変異体は EGF とインスリン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 とインスリンの受容体エンドサイトーシスは両方のプロセスを含んでいる。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になった。トランスフェリン受容体のエンドサイトーシスは恒常

的なプロセスであることおよび、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 のリン酸化とエンドサイトーシス

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った。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 4 種類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すると考えられる。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) には細胞質にびまん性に存在しているが、M 期になると中心対に局在する。したがって、RalBP1 と POB1 はリン酸化されると Epsin や Eps15 から解離して、別の蛋白質と結合して 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 の機能をさらに明らかにするために、酵母の two-hybrid 法を用いて、POB1 の C 端側に結合する蛋白質を検索した。その結果、ASAP が POB1 と結合することが明らかになった。ASAP は低分子量 G 蛋白質に対する ArfGAP の一種であり、Arf と共に細胞内の小胞輸送を制御する。また、

ASAP は PAG と呼ばれるパキシリン結合蛋白質と同一であり、細胞接着や運動の制御にも関与している。今後は POB1 の細胞接着や運動における役割を明らかにする必要がある。

おわりに

以上、本研究では RalGDS を介する Ras の新しいシグナル伝達機構とその生理的意義の確立を試みた。その結果、Ral と共にその下流に存在する分子である RalBP1 と POB1 が EGF やインスリン受容体のエンドサイトーシスに関与することが明らかになった。特に、POB1 がエンドサイトーシスにおいて極めて重要な働きをする Epsin や Eps15 と直接結合することは、Ras/RalGDS/Ral のシグナル伝達経路がエンドサイトーシスを制御する可能性を強く示唆している。エンドサイトーシスの制御に関与する分子の同定は最近目覚ましく、しかも、そのいくつかの遺伝子レベルでの異常が発がんに関連することも報告されている。Ras が重要な発がん遺伝子産物であることとあわせて、今後はがんにおける RalGDS/Ral のシグナル伝達の異常を解析する必要があると思われる。また、本研究により、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に関与しておらず、Eps15 と Epsin のリン酸化が M 期のエンドサイトーシスの停止機構に関与していると考えられた。RalBP1 と POB1 の M 期におけるリン酸化の意義は明らかではないが、これらの蛋白質のエンドサイトーシス以外の細胞機能制御に関与し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り、M 期でのリン酸化はこれらの機能を制御するかもしれない。Ras の標的蛋白質の機能と作用機構を明らかにすることが、他の低分子量 G 蛋白質のシグナル伝達機構のモデルにもなると考えられるので、今後さらに解析を続けていきたい。

