

RalGAP の同定とその発現低下による膀胱がんの悪性化

白川 龍太郎, 堀内 久徳

1. はじめに

Ras に代表される低分子量 GTP 結合タンパク質はヒトでは約 150 種存在し, Ras スーパーファミリーを形成している。Ral は一次構造上 Ras に最も近縁な G タンパク質であり, Ras, Rap, Rheb とともに Ras サブファミリーを構成する。哺乳類では互いに約 80% の相同性を持つ RalA と RalB が存在する。Ral の機能は細胞増殖, 生存, 小胞輸送や細胞骨格の制御など多岐にわたるが, 近年の多くの知見は Ral の異常な活性化と発がん・がん悪性化との関連を強く示唆している。本稿では我々が同定した Ral の抑制性制御因子 RalGAP と膀胱がんの浸潤・転移についての知見を概説する。

2. Ral について

ほかの G タンパク質と同様に Ral も GTP 結合型と GDP 結合型の二つのコンホメーションをとり, GTP 結合型でエフェクター分子に結合し機能する。Ral の活性化はグアニンヌクレオチド交換因子 (guanine nucleotide exchange factor: GEF), 不活性化は GTPase 活性化タンパク質 (GTPase-activating protein: GAP) により制御される。Ral の GEF には RalGDS, RGL1, RGL2, RGL3 と RalGPS1, RalGPS2 の 6 分子が存在する。このうち RalGDS と RGL1~3 は Ras 結合ドメインを有し, Ras の直接結合により活性化される。したがって Ral は Ras の下流で活性化される。一方, RalGPS は Ras 結合ドメインの代わりに pleckstrin homology (PH) ドメインを有し, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂) の結合により活性化される。また, メカニズムは明らかでないが, Ral は細胞内 Ca²⁺濃度の上昇によっても活性化される。

東北大学加齢医学研究所基礎加齢研究分野 (〒980-8575 宮城県仙台市青葉区星陵町 4-1)

Identification of RalGAPs and their downregulation in invasive bladder cancer

Ryutaro Shirakawa and Hisanori Horiuchi (Department of Molecular and Cellular Biology, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Seiryomachi 4-1, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8575, Japan)

Ral のエフェクター分子は数多く報告されており, その機能は多岐にわたる。最も解析されているエフェクターは Exocyst である。Exocyst は八つのサブユニットからなる複合体であり, 小胞と形質膜を物理的に繋留し, エキソサイトーシスを促進する役割を持つ。Ral は Exocyst 複合体のサブユニットのうち Sec5 と Exo84 に GTP 型特異的に結合する。Ral は Exocyst を介して脂肪細胞における glucose transporter4 (GLUT4) の細胞表面への輸送や¹⁾, 血小板濃染顆粒の分泌²⁾などさまざまなエキソサイトーシス経路を制御している。また, Exocyst は遊走先端での形質膜のリモデリングやアクチン細胞骨格の再構成を介して, 細胞の遊走にも関与している。

もう一つの主要な Ral エフェクターは RalBP1 である。RalBP1 は AP2 アダプター複合体を介して成長因子受容体³⁾や AMPA 受容体⁴⁾のエンドサイトーシスを制御している。RalBP1 は Rho ファミリーの G タンパク質 Cdc42 と Rac の GAP でもある。Exocyst や RalBP1 のほかにも, phospholipase D, filamin, ZONAB など Ral のエフェクターとして報告されている。また, 直接のエフェクターではないものの, 栄養飢餓時に RalB が ULK1 を活性化しオートファジーを誘導すること⁵⁾, 有糸分裂時に RalA がミトコンドリア外膜上で DRP1 を活性化しミトコンドリア分裂を制御すること⁶⁾など, 多様な細胞機能が提唱されている。

Ral は Ras の下流で活性化されることから, がん化の観点からも Ral の研究は行われている。発がん性 Ras の下流経路としては MAPK (mitogen-activated protein kinase) 経路や PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) 経路が詳細に解析されており, そのがん化における重要性が明らかにされてきたが, Robert Weinberg らは第三の Ras 下流経路である RalGEF/Ral 経路が, ヒト正常細胞のがん化に必須であることを報告している⁷⁾。このことは MAPK や PI3K に加えて Ral の活性化が Ras 誘導性のがん化に重要な役割を持つことを示している。Ral によるがん化の分子メカニズムについては不明な点が多く, がん化を担う直接のエフェクターはいまだ明らかでない。しかしながら, RalB が IκB キナーゼファミリーの TBK1 を活性化し, がん細胞のアポトーシス回避に寄与していること⁸⁾, 腫瘍抑制因子 PP2A (protein phosphatase 2A) が RalA 自身を標的としているこ

と⁹⁾など, Ral とがん化との機能的関連を示す知見は蓄積している. さらに, 実際のヒト膵臓がん組織中で Ral が高度に活性化されていること¹⁰⁾, RalGDS のノックアウト (KO) マウスが Ras 依存性の化学皮膚発がんモデルに抵抗性を示すこと¹¹⁾など, がん化における Ral の重要性は *in vivo* でも明らかにされつつある.

3. RalGAP の同定

1991 年, Larry Feig らはウシ脳細胞質のゲル濾過画分に Ral 特異的な GAP 活性が存在することを報告したが¹²⁾, その分子実体は長らく未知であった. 我々は GTP 加水分解能を欠く恒常的活性化型の RalA 変異体 (RalA^{Q72L}) を用いたアフィニティーカラムにより, ブタ脳, ラット肺細胞質から RalGAP を精製, 分子同定することに成功した¹³⁾. RalGAP は約 2000 残基の触媒 α サブユニットと, 約 1500 残基の共通 β サブユニットからなる, ゲル濾過での分子量が 100 万を超える巨大な複合体であった. α サブユニットには全長で 54% の相同性を持つ二つのアイソフォーム ($\alpha 1$ および $\alpha 2$) が存在し, それぞれが β サブユニットと複合体を形成する (図 1A). $\alpha 1$ - β 複合体を RalGAP1, $\alpha 2$ - β 複合体を RalGAP2 と呼ぶ (ヒト各遺伝子のシンボルはそれぞれ RALGAP1, RALGAP2, RALGAPB である). β サブユニットはユビキタスに発現しているが, α サブユニットは組織発現パターンが異なり, 脳では $\alpha 1$ が, 肺や肝臓では $\alpha 2$ の発現が優位である (図 1B).

α サブユニットの C 末端には Ras ファミリーの G タンパク質 Rheb の GAP である TSC2 の GAP ドメインと約 30% の相同性を有する領域が存在する. β サブユニットは既知のドメイン構造を持たないが, 全長にわたり種を超えて高度に保存されている. α サブユニットの GAP 活性には β サブユニットとの複合体化が必要であることから, β サブユニットの結合が α サブユニットの GAP ドメインに何らかの構造変化をもたらすことが予想される. 興味深いことに RalGAP 複合体は, 結節性硬化症 (tuberous sclerosis) の原因遺伝子産物である TSC 複合体 (TSC2-TSC1 複合体) と構造上の類似性を有する (図 1A). TSC 複合体は Rheb の GAP としてはたらくが, その活性は Akt や AMPK によるリン酸化で調節されている. RalGAP 複合体についても Akt によるリン酸化を介した調節が報告されている¹⁴⁾.

4. 膀胱がん と Ral

膀胱がんは膀胱上皮より生じ, 浸潤性と表在性のものに分類される. 浸潤性膀胱がんは転移しやすく予後も悪いため, その発生および進展機構を明らかにすることは非常に

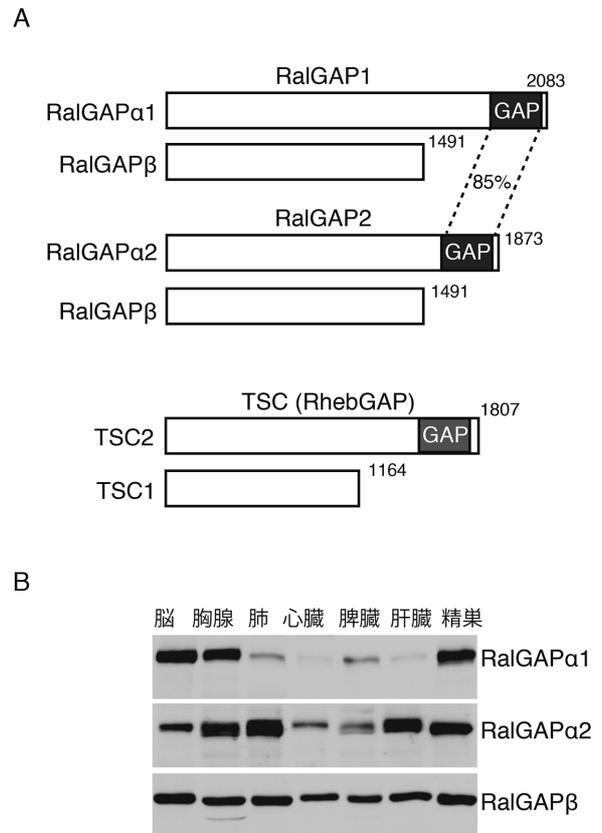


図 1 RalGAP 複合体のドメイン構造と組織分布 (A) RalGAP 複合体のドメイン構造. $\alpha 1$ と $\alpha 2$ の GAP ドメインは高い相同性 (85%) を示す. RalGAP 複合体は RhebGAP である結節性硬化症複合体 (TSC) に構造上の類似性を持つ. (B) ウェスタンブロット法によるラット組織における RalGAP 各サブユニットの発現分布解析 (文献 13 より改変).

重要である. Ral は膀胱がんにおいて高度に活性化していることが知られているが, Ras の変異が比較的少ない膀胱がんにおける Ral の活性化機構は不明であった. 我々は膀胱組織における RalGAP の発現を調べることから研究を始めた.

正常膀胱組織では RalGAP $\alpha 2$ が優位に発現している. ヒト膀胱がん細胞株を用いて RalGAP の発現をウェスタンブロット法で調べたところ, 表在性膀胱がんより樹立された細胞株では $\alpha 2$ が豊富に発現していたが, 浸潤性の膀胱がん細胞株では $\alpha 2$ の発現がほとんど消失していた (図 2A)¹⁵⁾. プルダウンアッセイによる GTP 型 Ral の定量では, 表在性細胞に比べ浸潤性細胞において Ral は高度に活性化していた (図 2B). 浸潤性細胞にレンチウイルスを用いて野生型 RalGAP $\alpha 2$ を導入すると Ral は不活性化され, 細胞の遊走能は抑制された. これらの結果から, 浸潤性膀胱がん細胞は RalGAP $\alpha 2$ の発現喪失により高い遊走能を獲得していることが示唆された. また, ノードマウスを用いた実験転移モデルでは, RalGAP $\alpha 2$ の発現を喪失した浸潤性膀胱

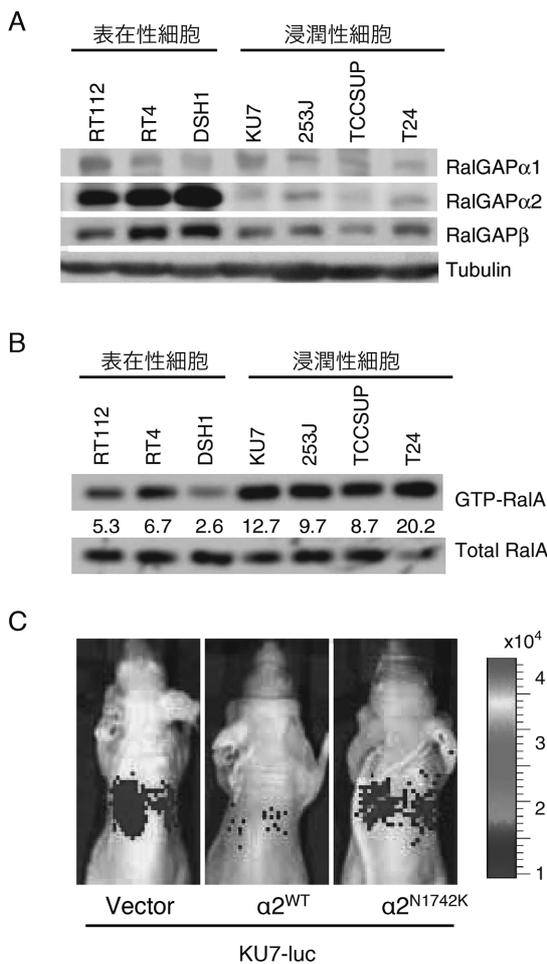


図2 浸潤性膀胱がん細胞における RalGAP $\alpha 2$ の発現喪失と Ral の活性化

(A) ヒト膀胱がん細胞を用いたウェスタンブロット法による RalGAP の発現解析. 浸潤性膀胱がん細胞では RalGAP $\alpha 2$ の発現がほとんど消失していた. (B) プルダウン法による GTP 型 RalA の定量. 表在性細胞に比べ浸潤性膀胱がん細胞では GTP 型 RalA の割合が増加していた. 数字は GTP 型 RalA の割合 (%). (C) ノドマウス尾静脈注射による実験肺転移モデル. ルシフェラーゼ発現 KU7 浸潤性膀胱がん細胞 (KU7-luc) にベクター, 野生型 RalGAP $\alpha 2$ ($\alpha 2^{WT}$), あるいは GAP 活性を欠く RalGAP $\alpha 2$ 変異体 ($\alpha 2^{N1742K}$) をレンチウイルスで導入し, 肺転移を *in vivo* イメージングにより解析した. 野生型 RalGAP $\alpha 2$ の発現を回復した細胞では肺転移が著しく抑制された (文献 15 より改変).

膀胱がん細胞は高確率で肺転移を起こしたが, レンチウイルスを用いた導入により RalGAP $\alpha 2$ の発現を回復した浸潤性細胞の転移能は顕著に抑制されていた (図 2C). GAP 活性を欠く $\alpha 2$ 変異体の導入では転移が抑制されないことから, RalGAP $\alpha 2$ の RalGAP 活性が転移抑制に重要であることが示唆された.

我々は RalGAP の機能を生体で明らかにするために, RalGAP の KO マウスを作製した. $\alpha 2$ KO マウスは正常に生育し, 外見上明らかな異常を呈さなかった. $\alpha 2$ KO マウ

スの膀胱では GTP 型の Ral が野生型に比べ 2.5 倍に増加しており, $\alpha 2$ が生体において Ral の抑制因子として機能していることが確認された. マウス化学膀胱がんモデルとして一般に尿路上皮特異的な変異源である *N*-butyl-*N*-(4-hydroxybutyl)nitrosamine (BBN) が用いられるが, $\alpha 2$ KO マウスは BBN 投与により野生型にはみられない筋層浸潤性の膀胱がんを多発した (図 3)¹⁵. このことから RalGAP $\alpha 2$ はマウス膀胱がんの発生と進展にきわめて重要な役割を持つことが示された.

次にヒト膀胱がん検体を用いた解析を行った. ヒト正常尿路上皮では $\alpha 2$ は豊富に発現している. ヒト膀胱がん 97 検体を用いた免疫染色による解析では, 表在性膀胱がん検体で約半数 (52%) が $\alpha 2$ 低染色性であったのに対し, 筋層浸潤性膀胱がんではほとんど (93%) の検体が $\alpha 2$ 低染色性であり, $\alpha 2$ の発現低下と膀胱がんの悪性度には相関がみられた. さらに, $\alpha 2$ の発現低下は生存率, 転移の有無にも強く相関した¹⁵. 以上の結果より, RalGAP $\alpha 2$ の発現低下が膀胱がんの進展に重要な役割を持つことが明らかとなった.

がん遺伝子発現データベース ONCOMINE は, RalGAP $\alpha 2$ の発現が膀胱がんのみならず, 大腸がんや膵臓がんでも低下していることを示している. また, RalGAP β の発現も肺がん, 大腸がん, 膵臓がんなど多くのがんで低下している. これらのことは RalGAP の発現低下が膀胱がん以外のがんにも一般にみられることを示唆している. 転移性前立腺がんでは RasGAP の一つ DAB2IP がヒストンメチル化酵素 EZH2 による発現抑制を受け, それが前立腺がん悪性化に寄与していることが知られている¹⁶. 膀胱がん細胞を用いた解析では $\alpha 2$ の発現は転写レベルで抑制されていることから¹⁵, RalGAP についても類似したエピジェネティック制御の可能性が示唆される.

5. おわりに

RalGAP の発現低下に伴う Ral の恒常的な活性化は膀胱がんの浸潤・転移を促進するが, Ral 下流のどのようなシグナリングがそれに関与するのかについては明らかでない. Ral の主要なエフェクターである Exocyst は浸潤先端へのマトリックスメタロプロテアーゼ MT1-MMP の輸送を制御しており¹⁷, 基底膜の分解促進が Ral による浸潤のメカニズムの一つであるかもしれない. Ral シグナリングの詳細な解析により, がん浸潤・転移の分子機構についての理解が進むことが期待される. 現在, 発がん性 Ras の機能抑制には MAPK 経路や PI3K 経路の阻害が試みられているが, 第三の Ras 下流経路である RalGEF/Ral 経路ががん浸潤・転移の効果的な阻害標的となる可能性があると考えられる.

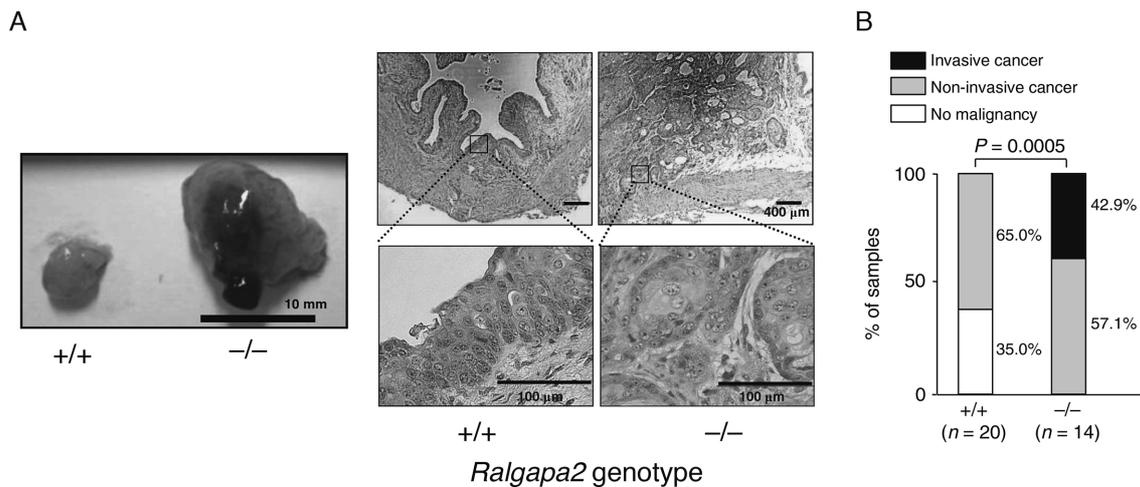


図3 尿路特異的変異源BBNの投与による膀胱発がんモデル

(A) BBN投与16週後のマウス膀胱マクロ像(左図)および組織像(右図)。(B) マウス膀胱がん組織病理の分布解析。RalGAP α 2 KOマウス(-/-)では野生型(+/+)にはみられない筋層浸潤性の膀胱がんが約半数にみられた(文献15より改変)。

謝辞

膀胱がんにおけるRalGAPの解析は齊藤亮一博士、西山博之博士、小川修博士との共同研究によるものでありここに深く感謝いたします。

- Chen, X.W., Leto, D., Chiang, S.H., Wang, Q., & Saltiel, A.R. (2007) *Dev. Cell*, 13, 391-404.
- Kawato, M., Shirakawa, R., Kondo, H., Higashi, T., Ikeda, T., Okawa, K., Fukai, S., Nureki, O., Kita, T., & Horiuchi, H. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 166-174.
- Nakashima, S., Morinaka, K., Koyama, S., Ikeda, M., Kishida, M., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kishida, S., & Kikuchi, A. (1999) *EMBO J.*, 18, 3629-3642.
- Han, K., Kim, M.H., Seeburg, D., Seo, J., Verpelli, C., Han, S., Chung, H.S., Ko, J., Lee, H.W., Kim, K., Heo, W.D., Meyer, T., Kim, H., Sala, C., Choi, S.Y., Sheng, M., & Kim, E. (2009) *PLoS Biol.*, 7, e1000187.
- Bodemann, B.O., Orvedahl, A., Cheng, T., Ram, R.R., Ou, Y. H., Formstecher, E., Maiti, M., Hazelett, C.C., Wauson, E.M., Balakireva, M., Camonis, J.H., Yeaman, C., Levine, B., & White, M.A. (2011) *Cell*, 144, 253-267.
- Kashatus, D.F., Lim, K.H., Brady, D.C., Pershing, N.L., Cox, A.D., & Counter, C.M. (2011) *Nat. Cell Biol.*, 13, 1108-1115.
- Rangarajan, A., Hong, S.J., Gifford, A., & Weinberg, R.A. (2004) *Cancer Cell*, 6, 171-183.
- Chien, Y., Kim, S., Bumeister, R., Loo, Y.M., Kwon, S.W., Johnson, C.L., Balakireva, M.G., Romeo, Y., Kopelovich, L., Gale, M., Jr., Yeaman, C., Camonis, J.H., Zhao, Y., & White, M.A. (2006) *Cell*, 127, 157-170.
- Sablina, A.A., Chen, W., Arroyo, J.D., Corral, L., Hector, M., Bulmer, S.E., DeCaprio, J.A., & Hahn, W.C. (2007) *Cell*, 129, 969-982.
- Lim, K.H., O'Hayer, K., Adam, S.J., Kendall, S.D., Campbell, P.M., Der, C.J., & Counter, C.M. (2006) *Curr. Biol.*, 16, 2385-2394.
- Gonzalez-Garcia, A., Pritchard, C.A., Paterson, H.F., Mavria, G., Stamp, G., & Marshall, C.J. (2005) *Cancer Cell*, 7, 219-226.
- Emkey, R., Freedman, S., & Feig, L.A. (1991) *J. Biol. Chem.*, 266, 9703-9706.
- Shirakawa, R., Fukai, S., Kawato, M., Higashi, T., Kondo, H., Ikeda, T., Nakayama, E., Okawa, K., Nureki, O., Kimura, T., Kita, T., & Horiuchi, H. (2009) *J. Biol. Chem.*, 284, 21580-21588.
- Leto, D., Uhm, M., Williams, A., Chen, X.W., & Saltiel, A.R. (2013) *J. Biol. Chem.*, 288, 9272-9283.
- Saito, R., Shirakawa, R., Nishiyama, H., Kobayashi, T., Kawato, M., Kanno, T., Nishizawa, K., Matsui, Y., Ohbayashi, T., Horiguchi, M., Nakamura, T., Ikeda, T., Yamane, K., Nakayama, E., Nakamura, E., Toda, Y., Kimura, T., Kita, T., Ogawa, O., & Horiuchi, H. (2013) *Oncogene*, 32, 894-902.
- Min, J., Zaslavsky, A., Fedele, G., McLaughlin, S.K., Reczek, E.E., De Raedt, T., Guney, I., Strohlic, D.E., Macconail, L.E., Beroukhim, R., Bronson, R.T., Ryeom, S., Hahn, W.C., Loda, M., & Cichowski, K. (2010) *Nat. Med.*, 16, 286-294.
- Monteiro, P., Rosse, C., Castro-Castro, A., Irdelle, M., Lagoutte, E., Paul-Gilloteaux, P., Desnos, C., Formstecher, E., Darchen, F., Perrais, D., Gautreau, A., Hertzog, M., & Chavrier, P. (2013) *J. Biol. Chem.*, 203, 1063-1079.

著者寸描

●白川龍太郎（しらかわ りゅうたろう）



東北大学加齢医学研究所基礎加齢研究分野
助教。医学博士。

■略歴 1976年静岡県浜松市に生る。
2001年京都大学農学部卒業，03年同大学
院医学研究科医科学修士課程修了，07年
同博士課程修了，日本学術振興会特別研究
員PD（07～10年）を経て10年より現職。

■研究テーマと抱負 専門は低分子量Gタンパク質の生化学。
研究テーマは主に膜輸送，がん。

■ウェブサイト <http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/mcb/>

●堀内久徳（ほりうち ひさのり）



東北大学加齢医学研究所基礎加齢研究分野
教授。医学博士。

■略歴 1959年奈良県に生る。84年京都
大学医学部卒業。臨床研修のあと93年よ
り京都大学大学院生（老年科，北徹教授）。
2～4年次は神戸大学医学研究科生化学教
室（高井義美教授）に国内留学。93～96
年，EMBL（M. Zerial博士研究室）留学。96～2010年，京都大
学老年科および循環器内科で助手／講師。10年より現職。

■研究テーマ 細胞内情報伝達メカニズムの解明（特に細胞内
膜輸送，がん）。血栓・止血に関する基礎・臨床研究。

■ウェブサイト <http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/mcb/>