

平成22年 5月22日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008～2009
課題番号：20790225
研究課題名（和文）
細胞の遊走を制御する分子機構
研究課題名（英文）
Molecular mechanisms for cell migration
研究代表者
渡辺 崇（WATANABE TAKASHI）
名古屋大学・高等研究院・特任講師
研究者番号：10402562

研究成果の概要（和文）：

細胞の遊走は正常な個体発生、創傷治癒、血管新生などに必須の細胞機能であり、生体内で厳密に制御されている。遊走する細胞は進行方向に対して前後軸を形成し、極性を獲得している。本研究では、遊走細胞の極性形成に重要な役割を果たす Rho ファミリーに焦点を絞り、Rho ファミリーの活性制御機構と Rho ファミリーによる細胞骨格制御機構を解析することで、細胞遊走を制御する分子機構の解明を目指した。

研究成果の概要（英文）：

Directional cell migration is orchestrated cellular process that is required for a variety of physiological processes such as embryogenesis, wound healing, angiogenesis, as well as carcinogenesis. Migrating cells show a distinct polarity with forming front-rear axis toward the direction. In this study, focusing on Rho family GTPases that is critical regulator in polarized migration, we aimed to elucidate the molecular mechanisms governing migratory behavior and cell polarity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,700,000	510,000	2,210,000
21年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学

キーワード：細胞生物学、生化学、細胞医化学

1. 研究開始当初の背景

生体を構成する種々の細胞は、それぞれ特徴的な極性を獲得し、固有の生理機能を担っている。遊走する細胞がその顕著な例である。炎症細胞や線維芽細胞、内皮細胞などは細胞外マトリクスやケモカインなどの細胞外シグナルに応答して遊走する。この過程で、細胞は外界シグナルの濃度勾配に対して細胞内に前後軸を決定し、極性を獲得している。前方ではアクチン細胞骨格を再構築してリーディングエッジを形成する。また、微小管はリーディングエッジ側で捕捉され、その方向に向かって再配向される。再配向された微小管を介して種々の蛋白質や小胞が前方もしくは後方に向かって選択的に輸送される。その結果、細胞内に非対称性が生じ、細胞の極性が形成される。この形成された極性を維持することで、細胞は特定の方向に遊走することができる。

1986年KirschnerとMitchison(Cell)は生細胞における微小管の挙動を観察し、伸長と退縮を繰り返して細胞内を“search”する微小管が、確率的に細胞内の特定の部位に“capture”(捕捉)されることで微小管が非対称に配向するという“search-and-capture”モデルを提唱した。その一方、低分子量GTP結合蛋白質Rhoファミリーが様々な細胞外シグナルの下流で細胞骨格や接着、細胞運動、蛋白質および小胞輸送を制御し、細胞の極性や遊走を調節していると考えられていた。また、Rhoファミリーとその標的蛋白質によるアクチン細胞骨格の制御機構の全貌は明らかになりつつあったものの、Rhoファミリーが微小管の配向を制御する分子機構は不明であった。研究開始当初までに、申請者らは微小管の伸長するプラス端のみに濃縮するplus-ends-tracking proteins (+TIPs)のCLIP-170やAPC(adenomatous polyposis coli)をRac1/Cdc42標的蛋白質IQGAP1の新規結合蛋白質として同定し、遊走する細胞のリーディングエッジで活性化されたRac1やCdc42が、IQGAP1とCLIP-170/APCを介して微小管を捕捉することを明らかにしていた(深田ら Cell 2002、渡辺ら Dev Cell 2004)。その後も、我々を含む国内外の研究者により、Rhoファミリーの標的蛋白質と+TIPsとの相互作用が報告されたが、遊走時におけるリーディングエッジでの微小管の捕捉機構は判然としていなかった。

微小管の配向制御を含め、Rhoファミリーは細胞極性や遊走全般における主要な制御因子である。Rhoファミリーの活性が細胞内で部位特異的に制御されることで、遊走する細胞は一度獲得した極性を維持している。すなわち、細胞が遊走する際には、ポジティブもしくはネガティブフィードバックにより、局所的にRhoファミリーの活性が維持されて

いることが推測されていたものの、遊走細胞におけるRhoファミリーのクロストークは未だ不明な点が多かった。

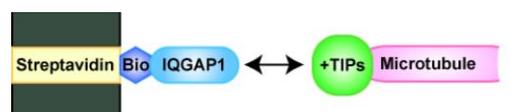
2. 研究の目的

本研究では線維芽細胞および上皮細胞の極性形成と遊走を制御するシグナル伝達機構を明らかにすることを目的とした。RhoファミリーとIQGAPを手がかりにし、遊走細胞前方における微小管の捕捉機構を明らかにする。一方で、Rhoファミリー間のクロストークにおいて中心的な役割を担う可能性が高いPAR複合体に着目し、細胞極性形成、遊走におけるRhoファミリーの活性制御機構を明らかにする。これらの解析により、遊走細胞が前後軸を決定・維持する分子機構を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 細胞レベルでの微小管の捕捉機構の解析: 微小管の非対称性に重要な役割を担っていると考えられるCLASP2のアフィニティーカラムクロマトグラフィーを行い、新規結合蛋白質を同定した。特に、Rhoファミリー関連分子に着目し、CLASPとの性状解析を行った。一方、細胞極性形成に重要な役割を担っているGSK-3がCLASPをリン酸化して不活性化すると推定されていたため、そのCLASPリン酸化に着目した。具体的にはCLASPのリン酸化抗体を作製し、時空間的なCLASP活性制御機構と、細胞膜近傍における微小管、+TIPs、Rhoファミリーの相互関係の解析を行った。

(2) 微小管捕捉機構のin vitroでの再構築: 精製蛋白質を用いて+TIPsの挙動をin vitroで再構築することを試み、+TIPs微小管のプラス端に濃縮する分子機構やその活性制御機構を解析した。さらに、細胞膜近傍における微小管の挙動を+TIPsとIQGAP1を用いてin vitroで再構成することを試みた。具体的には、側壁にストレプトアビジンを固相化したチャンバーを用い、ビオチン化したIQGAP1を側壁に塗布する(仮想リーディングエッジ)。さらに、チャンバー内で蛍光ラベルした精製CLIP-170やCLASPと微小管を加えて重合させる。側壁まで重合した微小管はIQGAP1と相互作用すると考えられる(下図参照)。側壁に衝突した微小管のダイナミクスを測定することで、微小管の捕捉機構をin vitroで検証した。



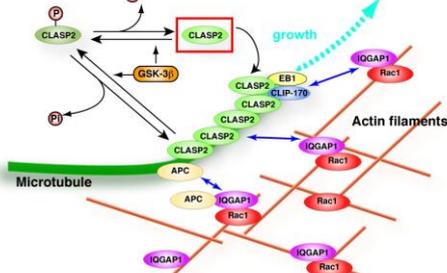
(3) Rhoファミリーのクロストークによる前後軸の決定機構：Rhoファミリーのクロストークに重要な役割を担っているグアニンヌクレオチド交換因子 Tiam1 に着目し、その結合蛋白質を同定し、結合蛋白質との複合体の性状解析を行った。

(4) Par 複合体による細胞遊走の制御機構：

Par-3の活性制御機構と作用機構を明らかにするために、アフィニティーカラムクロマトグラフィーと質量分析(LC-MS/MS)を組み合わせることで、Par-3の結合蛋白質を網羅的に同定し、その生理的意義を検討した。

4. 研究成果

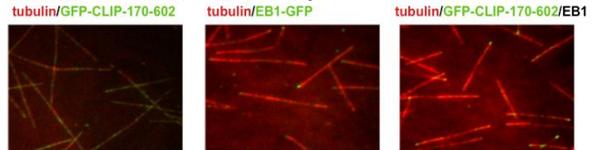
(1) +TIPsの一つである CLASP は遊走する細胞内で非対称に微小管先端に濃縮し、細胞の極性を制御すると考えられている。我々は CLASP2 の新規結合蛋白質として Rhoファミリー Rac1・Cdc42 の標的蛋白質 IQGAP1 を同定した。IQGAP1 の C 末端が CLASP2 の結合活性を有すること、CLASP2 のセリン・アルギニン残基に富む領域が IQGAP1 との結合を担っていることを見出した。さらに、他の極性制御因子である GSK-3 が CLASP2 の IQGAP1 結合領域を直接リン酸化し、IQGAP1 との結合を負に制御することも見出した。GSK-3 によるリン酸化サイト特異的な抗 CLASP2 抗体を作製し、細胞内での局在を検討したところ、リン酸化型 CLASP2 はゴルジ体に濃縮するのみで、微小管先端にそのシグナルは認められなかった。また、GSK-3 による CLASP2 のリン酸化は、CLASP2 と EB1 との結合も負に制御し、CLASP2 の微小管への局在も抑制することを見出した。IQGAP1 がアクチンフィラメントに結合し、遊走する細胞のリーディングエッジに濃縮すること、IQGAP1 が CLIP-170 や APC など他の +TIPs と結合することを考え合わせると、本研究結果は IQGAP1 がアクチンフィラメントと微小管を繋ぐリンカーとして中心的な機能機能を担っていることを示唆している(下図参照)。



IQGAP1 のリーディングエッジにおける機能模式図

(2) これまでの研究成果を踏まえ、IQGAP1 による微小管捕捉機構を *in vitro* で再構築することを試みた。まず、+TIP の細胞内の挙動を再構成する目的で、代表的な +TIPs であ

る EB1 と CLIP-170 を大腸菌から精製した。必要に応じて蛍光蛋白質 GFP との融合蛋白質を用いた。ガラス表面にビオチン化チューブリンを含む微小管シードを固相化し、溶液に微小管重合に必要なチューブリン(赤色蛍光)、+TIPs(緑色蛍光)、GTPなどを加えて微小管を重合させた。蛍光を全反射顕微鏡で検出したところ、EB1は自立的に伸長する微小管先端に濃縮するのにに対し、CLIP-170はEB1の存在依存的に微小管先端に濃縮することを見出した(下図参照)。



in vitro での +TIPs の再構成

さらに、CLIP-170 結合領域を含む IQGAP1 フラグメントを大腸菌から精製し、微小チャンバー側壁に固相化した。チャンバー内に微小管形成中心を据え、+TIPs を入れた状態で微小管を重合させ、側壁に衝突した微小管(IQGAP1 と相互作用すると考えられる)の挙動を解析したところ、チャンバー側壁に沿って微小管が重合する様子を捉えた。この予備的な知見から、IQGAP1 は CLIP-170 を介して微小管をガイドすることが考えられる。

(3) Tiam1 の結合蛋白質としてインテグリンの活性化を担うタリンを同定し、両者が直接結合することを見いだした。遊走する細胞内で Tiam1 の局在を検討したところ、Tiam1 は遊走方向前方のフォーカルアドヒージョンにタリン依存的に局在した。さらに、Tiam1 やタリン、両者の結合が接着依存的な Rac の活性化に必要なこと、フォーカルアドヒージョンの正常な形成・脱形成にも両者は必要であった。また、aPKC の活性を抑制すると Tiam1 のフォーカルアドヒージョンへの濃縮が阻害されることを見出した。これらのことから、Tiam1 はタリンを介してフォーカルアドヒージョンに濃縮し、遊走細胞前方での Rac の活性を担っていることが考えられた。Par 複合体(特に、Par3 と Tiam1 の結合と aPKC による Tiam1 のリン酸化)が Tiam1 のフォーカルアドヒージョンへの濃縮を制御していることが予想された。

(4) Par3 のアフィニティーカラムクロマトグラフィーを行い、その結合蛋白質をショットガン法で網羅的に同定した。200以上の結合候補蛋白質が同定され、中でも極性を制御する PI-3K と FAK に着目した。Par3 と PI-3K、FAK は直接相互作用し、それらがフォーカルアドヒージョンに濃縮することを見出した。PAR3 の遺伝子発現を RNAi により抑制、ある

いはPI3-K結合領域やFAK結合領域を強制発現させると接着依存的なPI-3KとFAKの活性化が抑制されたことから、Par3とそれらの結合はインテグリン outside-in シグナルに関与することが考えられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

(1) Itoh, N., Nakayama, M., Nishimura, T., Fujisue, S., Nishioka, T., Watanabe, T., and Kaibuchi, K. Identification of focal adhesion kinase (FAK) and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) as Par3 partners by proteomic analysis. *Cytoskeleton* (Hoboken), 査読有, 67, 2010, 297-308.

(2) Terawaki, S., Kitano, K., Mori, T., Zhai, Y., Higuchi, Y., Itoh, N., Watanabe, T., Kaibuchi, K., and Hakoshima, T. The PHCCEX domain of Tiam1/2 is a novel protein- and membrane-binding module. *EMBO J*, 査読有, 29, 2010, 236-250.

(3) Watanabe, T., Noritake, J., Kakeno, M., Matsui, T., Harada, T., Wang, S., Itoh, N., Sato, K., Matsuzawa, K., Iwamatsu, A., *et al.* Phosphorylation of CLASP2 by GSK-3 β regulates its interaction with IQGAP1, EB1 and microtubules. *J Cell Sci*, 査読有, 122, 2009, 2969-2979.

(4) Iguchi, Y., Katsuno, M., Niwa, J., Yamada, S., Sone, J., Waza, M., Adachi, H., Tanaka, F., Nagata, K., Arimura, N., Watanabe, T., *et al.* TDP-43 depletion induces neuronal cell damage through dysregulation of Rho family GTPases. *J Biol Chem*, 査読有, 284, 2009, 22059-22066.

(5) Watanabe, T., Wang, S., Kakeno, M., Usukura, J., and Kaibuchi, K. Ultrastructural study of Rac1 and its effectors beneath the substratum-facing membrane. *Cell Struct Funct*, 査読有, 33, 2008, 101-107.

(6) Iwasaki, T., Katsumi, A., Kiyoi, H., Tanizaki, R., Ishikawa, Y., Ozeki, K., Kobayashi, M., Abe, A., Matsushita, T., Watanabe, T., *et al.* Prognostic implication and biological roles of RhoH in acute myeloid leukaemia. *Eur J Haematol*, 査読有, 81, 2008, 454-460.

(7) Tanizaki, R., Katsumi, A., Kiyoi, H., Kunishima, S., Iwasaki, T., Ishikawa, Y., Kobayashi, M., Abe, A., Matsushita, T., Watanabe, T., *et al.* Mutational analysis of SOS1 gene in acute myeloid leukemia. *Int*

J Hematol, 査読有, 88, 2008, 460-462.

[学会発表] (計12件)

(1) Watanabe, T., Wang, S., Matsuzawa, K., Sato, K., Kakeno, M., Kaibuchi K.: Role of Par and Tiam1 complex in polarized cell migration. The 32nd Annual meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Dec 12 2009, Yokohama

(2) Watanabe, T., Wang, S., Matsuzawa, K., Sato, K., Kakeno, M., Kaibuchi K.: Targeting of Tiam1 to focal adhesion through Talin for Rac1 activation and cell migration. 49th Annual Meeting for American Society for Cell Biology. Dec 7 2009, San Diego, CA

(3) Watanabe, T., Kakeno, M., Wang, S., Matsuzawa, K., Sato, K., Kaibuchi K.: In vitro reconstitution of microtubule dynamics in cell cortex. Gordon Research Conference. Aug 26-27 2009, Oxford, UK

(4) Watanabe, T., Kakeno, M., Wang, S., Matsuzawa, K., Sato, K., Kaibuchi K.: Role of IQGAP1 in regulation of microtubule dynamics in polarized cell migrating cells. The 61st Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology. Jun 3 2009, Nagoya

(5) Watanabe, T., Wang, S., Matsuzawa, K., Sato, K., Kakeno, M., Kaibuchi, K.: Asymmetric Targeting of Tiam1 to Focal Adhesion through Talin for Polarized Cell Migration. CDB symposium Shape and Polarity. Mar 24 2009, Kobe

(6) Watanabe, T., Kaibuchi, K.: Roles of the Rho family GTPases and IQGAP1 in Cell migration. BMB2008. Dec 10 2008, Kobe

[図書] (計1件)

(1) Watanabe, T., Sato, K., and Kaibuchi, K. Cadherin-mediated Intercellular Adhesion and Signaling Cascades Involving Small GTPases. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 1, 2009, a003020.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 崇 (名古屋大学・高等研究院・講師)
研究者番号: 10402562

(2) 研究分担者

該当なし ()
研究者番号:

(3) 連携研究者

該当なし ()
研究者番号: