

令和 7 年 6 月 7 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2024

課題番号：21K15365

研究課題名（和文）癌細胞遊走におけるRif低分子量Gタンパク質の活性制御機構と機能の解明

研究課題名（英文）Regulatory mechanism and function of Rif small GTPase in cancer cell migration

研究代表者

星 京香（Hoshi, Kyoka）

福島県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：00726995

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、がん細胞の移動を制御するタンパク質Rifの活性や細胞内での働き方を解明した。Rifは糸状突起の形成を通じて細胞の遊走に関与し、SmgGDSというタンパク質との結合によって膜局在が制御されることが明らかとなった。一方で、Rifの活性は常に高い状態で保たれているが、SmgGDSは細胞内での活性調節には関与しないと考えられた。また、Rifは核にも局在し核膜構造にも影響を与えること、さらに肺腺がんではRifとRor1の高発現が病期進行や転移と関連することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、がん細胞の移動や転移に関わるタンパク質Rifの細胞内での働きや制御機構を明らかにした。特に、Rifが細胞膜や核にどのように局在し、細胞の動きを制御しているか、またその調節因子としてSmgGDSがどのように関与しているかを詳細に解析した。その結果、Rifはがん細胞の膜や核膜の構造や機能に影響を与えること、さらにRifおよびSmgGDSの発現が肺がんの進行や転移と関連することが判明した。これらの知見は、がんの新たな診断マーカーや治療標的の開発に貢献する学術的・社会的意義を持つものである。

研究成果の概要（英文）：In this study, we elucidated the activity and intracellular function of Rif, a protein that regulates cancer cell migration, and found that Rif is involved in cell migration through the formation of filopodia and that its membrane localization is regulated by its binding to a protein called SmgGDS. On the other hand, although the activity of Rif remained constantly high, SmgGDS is not involved in regulating its activity in the cell. Our results also showed that Rif also localizes to the nucleus and affects nuclear membrane structure, and that high expression of Rif and Ror1 is associated with progression and metastasis in lung adenocarcinoma.

研究分野：細胞生物学

キーワード：低分子量Gタンパク質 がん細胞浸潤 がん転移

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

受容体型チロシンキナーゼ Ror1 は多くのがんで高発現しており、がん細胞の増殖や遊走に関与することが報告されている。我々はこれまでに、Ror1 が胃癌細胞において細胞増殖や遊走を促進すること (Ikeda, Hoshi et al., Cancer Sci 2020)、さらに Rho ファミリー G タンパク質 Rif (RhoF) を介して糸状突起の形成を誘導することを明らかにした。糸状突起は、細胞外情報を感知しながら細胞遊走を支える構造であり、特に集団遊走においては、先導するリーダー細胞が突起を伸ばして進行方向を定め、後続の細胞を牽引する。我々は、三次元ゲル中で遊走するがん細胞集団において、Rif がリーダー細胞では細胞膜に、フォロワー細胞では細胞質に局在することを見出し、Rif がリーダー細胞特異的に活性化されている可能性を示唆した。Rif は低分子量 G タンパク質でありながら、通常とは異なり GDP との解離が速く、細胞内では常に GTP 結合型 (活性型) として存在すると考えられている。しかし、GDP/GTP 結合に関わる配列や GTPase 活性は他の G タンパク質と共通しており、細胞内で Rif の活性や機能がどのように制御されているかは依然として不明である。

2. 研究の目的

Rif の細胞内での活性制御機構を明らかにするため、我々は Rif の結合タンパク質を LC-MS/MS 解析により探索した。その結果、低分子量 G タンパク質の活性調節に関与する SmgGDS (Small G protein GDP dissociation stimulator) を同定した (未発表)。SmgGDS は複数の Ras および Rho ファミリーに対する GEF (GDP/GTP 交換因子) 活性を持つことが報告されているが、その生理的・病理的機能については未解明な点が多い。また、SmgGDS は標的となる低分子量 G タンパク質の C 末端に存在する CAAX モチーフのプレニル化を促進し、膜局在を制御する役割も報告されている (Hodge et al., 2016)。実際、我々は Rif の CAAX モチーフを変異させた Rif-SAAX 変異体が細胞膜に局在せず、糸状突起形成を誘導しないことを確認しており (未発表)、Rif の機能に CAAX 依存的な膜局在が不可欠であることが示唆された。以上の知見から、SmgGDS は Rif に対して GEF 活性あるいはプレニル化 (またはその両方) を介して機能を制御している可能性が考えられる。そこで本研究では、SmgGDS による Rif の活性および局在の制御機構を明らかにし、さらにその制御ががん細胞の遊走において果たす役割を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、SmgGDS と Rif の相互作用および Rif の細胞内局在と機能に関する解析を行った。SmgGDS-558 および SmgGDS-607 の精製タンパク質と Rif との *in vitro* 結合アッセイおよび GEF 活性アッセイを実施した。細胞内での相互作用の確認には免疫沈降法を用いた。Rif の活性状態の解析には GST-mDia1RBD を用いた pull-down アッセイを用い、SmgGDS ノックダウンや Rif 変異体の発現を組み合わせた。

Rif の細胞内局在を解析するため、細胞質・核画分に分画した溶解液を Western blot で解析した。Rif の核局在機構解明のため、CAAX モチーフおよび PBR 領域に変異を導入した YFP 融合タンパク質を作製し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。さらに、核局在シグナル (NLS) や核外移行シグナル (NES) を付加した Rif 変異体の局在と活性を同様に評価した。

Rif の内在性局在を可視化するため、自作および市販の抗 Rif 抗体を用いた免疫蛍光染色を行い、Rif ノックアウト細胞を用いて特異性を確認した。また、ヒト肺腺がん組織マイクロアレイ

を用いた免疫組織化学染色により、Rif および Ror1 の発現と病理学的特徴との関連を解析した。統計解析は、発現レベルと臨床病理学的因子（病期、リンパ節転移、腫瘍グレードなど）との関係を評価するために行った。

4 . 研究成果

SmgGDS には、全長型である SmgGDS-607 に加えてスプライシングバリエーションの SmgGDS-558 が発現しており、これらと Rif との相互作用を検討した。精製タンパク質を用いた *in vitro* 結合実験では、SmgGDS-558 および SmgGDS-607 のいずれも Rif と同程度に結合することが明らかとなった。また、*in vitro* GEF アッセイにおいても両者は Rif に対して同等の GEF 活性を示した。一方で、RhoA に対しては SmgGDS-607 が SmgGDS-558 よりも高い GEF 活性を示し、基質特異性に差があることが示唆された。

次に、細胞内での SmgGDS と Rif の結合を調べたところ、Rif は SmgGDS-607 と結合したが、SmgGDS-558 とは結合しなかった。また、Rif の膜局在に必要な CAAX モチーフのシステイン残基をセリンに置換した SAAX 変異体は、SmgGDS-607 と結合しなかった。これらの結果から、細胞膜に局在する Rif が SmgGDS-607 と結合することが示唆された。

さらに、癌細胞における内在性 Rif の活性を GST-mDia1RBD タンパク質を用いた pull-down アッセイで解析した。全ての癌細胞株において内在性 Rif が GST-mDia1RBD と共沈したが、SmgGDS をノックダウンしてもこの結合量に変化は見られなかった。また、細胞内に発現させた野生型 Rif と GTP 結合型変異体は同等に mDia1RBD と結合した。これらの結果から、Rif は細胞内で常に GTP 結合型として存在し、SmgGDS は細胞内では Rif の GEF として機能していないことが示唆された。

次に、内在性 Rif の細胞内分布を調べるため、細胞質画分と核画分に分けた各種細胞株の溶解液を western blot で解析したところ、Rif は両画分に存在していた。これまで Rif の核局在は報告されていなかったため、核局在の機構をさらに検討した。C 末端の CAAX モチーフおよび塩基性アミノ酸領域 (PBR) に着目し、それぞれを変異させた SAAX および 5Q 変異体を作成し、YFP 融合タンパク質として 293T 細胞に発現させた。共焦点レーザー顕微鏡による解析では、YFP-Rif (WT) は細胞膜、核膜、および核内に局在した。一方、YFP-Rif (5Q) は細胞質全体に、YFP-Rif (SAAX) は核内に局在し、いずれも膜局在は認められなかった。加えて、YFP-Rif (WT) 発現細胞では核膜のチューブ状変形が観察されたが、変異体ではこの変形は見られなかった。また、核局在シグナル (NLS) 付加型 YFP-Rif (WT) は核膜変形を強く誘導し、核外移行シグナル (NES) 付加型では変形は生じなかった。これらの結果から、Rif は PBR と CAAX モチーフを介して核膜に局在し、核膜の構造制御に関与していると考えられる。

Rif の細胞内局在と GTP 結合能の関係を解析するため、NLS および NES を付加した Rif を細胞に発現させ、mDia1RBD を用いたプルダウン解析を行った。その結果、いずれの Rif も野生型と同等の GTP 結合能を有しており、細胞内局在は GTP 結合状態に影響を与えないことが示された。

Rif の内在性局在を免疫蛍光染色により解析するため、自作および市販のウサギポリクローナル抗体を用いた。Rif ノックアウト PC9 細胞に YFP または YFP-Rif を導入し染色した結果、いずれの抗体も特異的に YFP-Rif を認識したが、市販抗体の方が高いシグナル：ノイズ比を示した。そこで、市販抗体を用いて野生型および Rif ノックアウト細胞の染色を行ったが、野生型細胞でも明確なシグナルは得られなかった。これに対し、ヒト肺腺がん組織マイクロアレイを用いた免疫組織染色では、42 検体中 37 検体でがん細胞に明瞭な染色が認められた。正常組織では染色されず、多くのがん細胞において Rif が細胞質および核に局在していた。これは培養細胞での細胞

質 核分画の結果と一致しており、肺腺がんにおける Rif の核局在を支持する結果であった。

さらに、肺腺がん 70 症例の組織アレイを用いて Ror1 および Rif の発現と臨床病理学的因子との関連を検討した。リンパ節転移の有無との関連では、Ror1 は $p < 0.0001$ 、Rif は $p = 0.007$ といずれも有意差があり、転移陽性例で高発現を示した。病期別解析では、Ror1 ($p = 0.006$) および Rif ($p = 0.046$) がともに進行期で高発現していた。一方、腫瘍グレードおよびサイズとの関連では有意差は認められなかった。代表症例の免疫染色像でも、進行例では両タンパク質の染色強度が高く観察され、Ror1 および Rif が肺腺がんの進行、とりわけリンパ節転移に関与している可能性が強く示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nishita Michiru, Kamizaki Koki, Hoshi Kyoka, Aruga Kana, Nishikaku Ikumi, Shibuya Hiroshi, Matsumoto Kunio, Minami Yasuhiro	4. 巻 299
2. 論文標題 Rho family small GTPase Rif regulates Wnt5a-Ror1-Dvl2 signaling and promotes lung adenocarcinoma progression	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 105248 ~ 105248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2023.105248	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iijima Junko, Hoshi Kyoka, Ito Hiromi, Kanno Mayumi, Murakami Yuta, Takahashi Koichi, Matsumoto Kana, Yamaguchi Yoshiki, Nakajima Madoka, Miyajima Masakazu, Arai Hajime, Kanai Mitsuyasu, Kitazume Shinobu, Honda Takashi, Hashimoto Yasuhiro	4. 巻 67
2. 論文標題 Total transferrin in cerebrospinal fluid is a novel biomarker for spontaneous intracranial hypotension	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FUKUSHIMA JOURNAL OF MEDICAL SCIENCE	6. 最初と最後の頁 64 ~ 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5387/fms.2020-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hoshi K, Ito H, Abe E, Fuwa TJ, Kanno M, Murakami Y, Abe M, Murakami T, Yoshihara A, Ugawa Y, Saito T, Saido TC, Matsumoto K, Yamaguchi Y, Furukawa K, Arai H, Kanai M, Miyajima M, Arai H, Ogawa N, Akatsu H, Hashizume Y, Tateno H, Honda T, Hashimoto Y.	4. 巻 11
2. 論文標題 Transferrin Biosynthesized in the Brain Is a Novel Biomarker for Alzheimer 's Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 616 ~ 616
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/metabo11090616	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡部祐亮、星京香、紙崎孝基、澁谷浩司、南康博、西田満
2. 発表標題 Rif低分子量Gタンパク質の細胞内局在と機能の制御機構
3. 学会等名 日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------