

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08636

研究課題名(和文) 集団的細胞運動を制御するJRABの構造変化の階層的解析-情報から生体に至るまで-

研究課題名(英文) Analysis for conformational change of JRAB regulating collective cell migration; from molecular information to physiological role in mouse

研究代表者

坂根 亜由子 (SAKANE, Ayuko)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・准教授

研究者番号：60509777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：JRABのLIMドメインは、2つのzinc fingerドメイン(ZF)から構成されるが、本研究では、1つ目のZF(ZF1)が、JRABのC末端との結合に関与することを見出した。さらに、JRABは、ZF1とZF2の両者を介してF-actinと結合し、F-actinとの結合に関与するZF1のアミノ酸残基の一部がC末端との結合に必要なアミノ酸と共通であることを示した。また、ZF1の欠損は細胞辺縁部でのラッフル形成を抑制することが明らかになった。以上より、JRABのLIMドメインが示すアクチン細胞骨格の再編成には、ZF1ドメインとC末端との相互作用によって調節されていることが本研究で新たに示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

集団的細胞運動は、胎生期の組織・器官形成や創傷治癒の過程だけでなく、がん転移の際にも広く認められる現象である。したがって、その制御機構を理解することは、生物学および生理学的に重要であるだけでなく、発生異常の病態解明およびがん転移機構の解明につながる可能性が高く、医学への貢献が多いに期待される。また、本研究で得られた個体レベルでの成果を基に1分子の構造変化を標的にしたがん転移の抑制や再生医療への応用にに向けた新たな技術開発の創出が実現する可能性があり、その社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：JRAB/MICAL-L2 engages in intramolecular interaction between the N-terminal LIM domain and the C-terminal coiled-coil domain. The conformational change of JRAB/MICAL-L2 participates in multiple rearrangements of the actin cytoskeleton involved in various biological processes. In this work, we found that both the first and second zinc finger domains within the LIM domain bind to the first and second actin monomers, respectively, at minus end of the F-actin, resulting in the inhibition of F-actin depolymerization. The most important finding was that some amino acid residues of first zinc finger domain are involved in both its association with F-actin and the intramolecular interaction. Taken together, the actin cytoskeletal rearrangement via JRAB-LIM, such as the enhancement of ruffling, are fine-tuned by the intramolecular interaction between the first zinc finger domain and C-terminal domain.

研究分野：生化学、細胞生物学、分子生物学

キーワード：JRAB 1分子構造変化 蛋白質間相互作用 集団的細胞運動 階層的解析

## 1. 研究開始当初の背景

組織・器官において上皮細胞は、隣接する細胞と強固に結合することによって内腔と外界の境界の維持に働いているが、組織修復・再生、あるいはがん転移の際などには、上皮細胞から間葉系細胞へと変化して (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT) ばらばらになった個々の細胞が単独で運動したり、あるいは複数の細胞が1つの集団を形成してまとまって動く現象 (集団的細胞運動) が認められる。EMT と比較して集団的細胞運動については、細胞間での接着を維持したまま集団で運動するという複雑さから、その分子基盤の解明は立ち後れている。集団的細胞運動では、細胞集団の先頭の一部の細胞において集団を一方に牽引するのに必要な強い力が生み出され、その一方で、後方の大多数の細胞において隣の細胞と離れないようにしっかりと接着を維持しながら細胞間でのコミュニケーションが執り行われており、それらによって集団としての振る舞いが可能となっている。集団的細胞運動の制御系として、これまでに Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質をはじめとする多彩な機能分子が数多く見出されてきたことから、複数のシグナル伝達経路が複雑に絡み合った制御機構の存在が予想されていた。それに反して、研究代表者は、集団的細胞運動を一元的に説明することが可能な制御系の候補として Rab13 低分子量 G 蛋白質の標的蛋白質 JRAB を見出した。研究代表者の所属するグループは、これまでに上皮細胞において細胞間接着分子の輸送を介して細胞間接着形成を制御する系として Rab13-JRAB 系を同定していたが、さらに、研究代表者は、JRAB の Rab13 依存的な構造変化が集団的細胞運動の基盤となるアクチン細胞骨格の再編成の時空間制御に関与していることを証明しつつあった。研究代表者は、バイオインフォマティクス的手法により JRAB N 末端-JRAB C 末端および Rab13-JRAB C 末端の複合体の構造モデリングを行い、得られたモデルの生化学的解析による検証・修正を繰り返すことで JRAB の構造変化モデルを完成させることに成功していた。本モデルから JRAB は N 末端側と C 末端側の分子内結合により closed form をとるが、Rab13 との結合により open form をとると予測された。さらに、このモデルを基に、常に open form あるいは closed form をとる 2 種の JRAB の構造変異体 (JRAB<sup>CC</sup>、JRAB<sup>CT</sup>) を創出し、野生型とそれらの変異体を発現した上皮細胞株を作製して wound healing アッセイを行い、得られたタイムラプスイメージング像のコンピュータサイエンス的手法 (volume rendering や optical flow 等) を用いた定性的・定量的解析を行うことによって、closed form の JRAB は、先頭部分の全体で力を生み出し、細胞集団の直線的な移動を可能にし、一方で open form の JRAB は、細胞集団の進行方向を種々の方向に分散させることを明らかにした。さらに、野生型の JRAB では closed form と open form の中間の運動形態をとり、最も効率の良い細胞集団の動きを示すことを見出した。つまり、効率の良いバランスのとれた細胞集団の動きの実現には JRAB の時空間構造変化が必要であることを証明した。しかし、JRAB が時空間的に構造を変化させて異なる機能を示す仕組み、生体内での JRAB の構造変化の生理的意義や JRAB の構造変化の破綻と疾患発症の関連性は未だ明らかにはなっていない。

## 2. 研究の目的

これまで、研究代表者は、Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質の標的蛋白質として見出された JRAB という 1 分子の構造変化が時空間的なアクチン細胞骨格の制御を生み出しており、その結果として効率の良いバランスのとれた細胞集団の動き (集団的細胞運動) が可能になること証明してきた。集団的細胞運動は、組織・器官の形成や創傷治癒の過程において認められる現象であり、さらに、がんの転移の際にも用いられる運動様式であることから、その制御機構の解明は、生理的および病的に非常に重要な課題と考えられる。そこで、本研究では、その時、その場所で、JRAB が open form あるいは closed form にかんじて変化し、維持されているのか、さらには、どのような機序で JRAB が構造特異的な機能を発現しうるのかを生化学とバイオインフォマティクスを組み合わせた手法や NMR 解析などの構造生物学的手法を用いて分子レベルでの検証を行い、その結果を基に細胞生物学、ライブイメージングやバイオメカニクス等の異分野融合による学際的アプローチで明らかにすることを試みた。また、本研究中に、これまでの細胞レベルでの解析を個体レベルにまで発展させるために、ゲノム編集技術を用いて内在性の JRAB を JRAB の構造変異体 (JRAB<sup>CC</sup>: 常に open form, JRAB<sup>CT</sup>: 常に closed form) に置換したマウスを作製して解析することによって JRAB の構造変化の重要性を個体レベルでも証明することを試みた。

## 3. 研究の方法

本研究では、JRAB の構造変化とアクチン細胞骨格制御のいずれにも関与する LIM ドメインに特に注目し、JRAB の構造変化が如何にして多彩なアクチン細胞骨格の再編成を生み出しているのかを明らかにした。まず、LIM ドメインが、どのように C 末端と複合体を形成して JRAB の構造変化に寄与するのかを調べるため、蛋白質間の相互作用部位を蛋白質表面における水素と重水素の置換速度によって検出することができる水素・重水素交換質量分析 (HDX-MS) の手法を用いて open form および closed form の JRAB 変異体の解析を行って、C 末端側との分子内結合に必要な LIM ドメインの最小領域の同定を試みた。得られた結果の検証のため、種々の欠

損変異体を作製し、C末端との結合や全長JRABにおける構造を生化学的に解析した。次に、バイオインフォマティクス手法の一つである蛋白質間相互作用に關与するアミノ酸を予測するドッキングシミュレーションを用いて、LIMとC末端間の分子内結合に關わるアミノ酸を調べた。LIMとC末端領域のアミノ酸の電氣的性質は、それぞれ正電荷、負電荷となっているため、候補として得られたアミノ酸残基を負電荷(E)、正電荷(R)のものに変換した変異体を作製し、それらを用いてドッキングシミュレーションの結果を生化学実験で検証した。

最近、JRABのC末端の類似蛋白質であるMICAL-CLとRab13と類似するRab8との複合体の構造が結晶化解析によって解かれている。そこで、MICAL-CL-Rab8複合体の構造を基にホモロジーモデリングを行ってJRAB-C-Rab13複合体モデルを作成し、その結果をすでに研究代表者が発表しているJRAB-C-Rab13複合体モデルと今回のJRAB-LIMとJRAB-Cの相互作用に關する結果と照らし合わせるといくつかの矛盾が出てきた。これらの矛盾点を解決するため、Rab13と類似するRab10がJRABの類似蛋白質であるMICAL-1と2箇所で結合するという結晶化解析の結果に基づいた知見に注目し、JRABとMICAL-1のアミノ酸配列を比較してJRABと2分子のRab13の複合体モデルを作成した。さらに、LIMドメインを介したアクチン細胞骨格制御の分子基盤を明らかにするため、LIMドメインの一部を欠損させたJRAB変異体を用いてIn vitro F-アクチンペレットティングアッセイを行い、LIMドメインとアクチン線維がどのように相互作用しているのかを調べた。得られた結果とLIMドメインがアクチン線維の脱重合を抑制するという知見を基にLIMドメインとアクチン線維のドッキングシミュレーションを行った。得られた複合体モデルの内、アクチン線維の脱重合が起こるマイナス端の一つ目と二つ目のG-アクチンにそれぞれLIMドメインのZF1とZF2がまたがって結合している24個のモデルに注目して解析を行った。アクチン線維との結合への關与が予想されるLIMのアミノ酸残基については、負電荷に変換した変異体を作製し、In vitro F-アクチンペレットティングアッセイを行ってアクチン線維との結合への影響を調べた。最後に線維芽細胞のNIH3T3細胞にレトロウイルスを用いてJRABの各変異体を発現させてLIMドメインの細胞内でのアクチン細胞骨格への影響を調べた。

#### 4. 研究成果

これまでの研究代表者の解析結果から組織・器官の発生および再生過程、さらには、がん転移で認められる集团的細胞運動の基盤となるアクチン細胞骨格の時空間制御は、JRABのRab13との相互作用に依存した構造変化によってチューニングされていることが明らかになっている。本研究では、JRABが構造を変化させ維持する仕組みを明らかにすることによってJRABの時空間構造変化機構をさらに掘り下げて解析した。また、細胞レベルでの解析を個体レベルに発展させ、生体内でのJRABの構造変化の重要性を証明することを試みた。

JRABは、Rabファミリー低分子量G蛋白質のメンバーのひとつであるRab13の標的蛋白質として同定された。JRABは、N末端側にcalponin-homologyドメイン、LIMドメイン、C末端側にcoiled-coilドメインを持つマルチドメイン蛋白質である。これまで、JRABのLIMドメインとN末端とC末端に挟まれたディスオーダー領域の一部がF-actinと結合し、それぞれF-actinの脱重合の抑制、F-actinを太い束にするバンドリング活性を示す等のアクチン細胞骨格制御との関連も明らかになっている。また、JRABは、N末端側のLIMドメインとC末端側のcoiled-coilドメインで分子内結合することでclosed formをとり、Rab13との結合に依存して分子内結合が解除されてopen formへと構造を変化させる。さらに、線維芽細胞内においてJRABは構造を変化させることで異なるアクチン細胞骨格制御を示すこともわかっている。本研究では、JRABの構造変化とアクチン細胞骨格制御のいずれにも關与するLIMドメインが、どのようにC末端と複合体を形成してJRABの構造変化に寄与するのかを調べるため、水素・重水素交換質量分析(HDX-MS)の手法を用いてopen formおよびclosed formのJRAB変異体の解析を行ったところ、C末端側との分子内結合に必要なLIMドメインの最小領域(189-207アミノ酸)の同定に成功した。LIMドメインは、2つのジンクフィンガードメインから構成されており、見出した領域は、一つ目のジンクフィンガードメイン(ZF1)に含まれることからJRABのLIMドメインは、そのZF1を介してC末端側と分子内結合し、closed formをとることが予想された。実際にZF1、あるいは二つ目のジンクフィンガードメイン(ZF2)を欠損させたJRAB N末端変異体を作製し、C末端との結合を生化学的に調べた結果、ZF1がC末端との結合に關わっていることが示され、さらに、JRABの全長でZF1を欠損させた変異体はopen formとなることも明らかになった。次に、ドッキングシミュレーションと生化学的解析による結果の検証によって、ZF1とC末端間の分子内結合に關わるアミノ酸を調べた。C末端は、884M、887W、895Q、898LがZF1との結合に關与しており、一方、ZF1はC末端との結合に197L、198V、200Rが必要であることがわかった。これらの結果から、JRABC末端とLIMドメインの結合に關与するアミノ酸が具体的に明らかになり、C末端のどの側面にLIMドメインが結合するのかを決定することができた。

MICAL-CL-Rab8複合体の構造を基にしてホモロジーモデリングを行って作成したJRAB-C-Rab13複合体モデルでは、Rab13はLIMと逆の側面でJRABC末端と結合するという結果が得られた。また、我々は、生化学的解析結果からJRABのC末端は5個のヘリックス構造で構成されておりRab13は、2番目のヘリックスの一部をLIMと競合することでJRABの構造をclosedからopenに変化させるというモデルを提示していた。しかし、これまでのJRAB—C-Rab13複合体モデルでは、Rab13は、LIMと逆の側面でC末端と結合するだけでなく、2番目のヘリックス

すまで到達していなかった。これらの矛盾点を解決するため、Rab13 と類似する Rab10 は、JRAB の類似蛋白質である MICAL-1 と 2 箇所て結合するという結晶化解析結果に基づいた知見に注目した。まず、JRAB と MICAL-1 のアミノ酸配列を比較したところ、MICAL-1 の 2 分子の Rab10 との結合に必要とするアミノ酸残基が、JRAB にも保存されており、JRAB にも Rab13 との結合部位が 2 箇所存在する可能性が出てきた。実際に、我々が作成した JRAB と 2 分子の Rab13 の複合体モデルでは、2 つ目の Rab13 結合部位は、LIM と同じ側面で JRAB C 末端と結合し、2 番目のヘリックスまで到達していた。さらに、LIM ドメインを介したアクチン細胞骨格制御の分子基盤を明らかにするため、LIM ドメインとアクチン線維がどのように相互作用しているのかを調べた。JRAB の LIM ドメインは ZF1 と ZF2 の両者を介してアクチン線維と結合することがわかった。この結果と LIM ドメインがアクチン線維の脱重合を抑制するという知見を基に LIM ドメインとアクチン線維のドッキングシミュレーションで得られた複合体モデルの内、アクチン線維の脱重合が起こるマイナス端の一つ目と二つ目の G-アクチンにそれぞれ ZF1 と ZF2 がまたがって結合している 2 4 個のモデルに注目して解析を行った。アクチン線維との結合への関与が予想されるアミノ酸残基は、ZF1 で 7 個得られ、そのうち 3 個は、ZF1 が C 末端との結合に必要な 197L、198V、200R であった。ZF2 では 5 個の候補が得られた。この結果を検証するため、197L、198V、200R を負電荷に変換した ZF1 変異体と 224S、228R を負電荷に変換した ZF2 変異体を用いて *In vitro* F-アクチン ペレットリングアッセイを行ってアクチン線維との結合への影響を調べた。いずれの変異体もアクチン線維との結合が減弱していたことから、ZF1 の 3 個のアミノ酸 197L、198V、200R と ZF2 の 2 個のアミノ酸 224S、228R が LIM ドメインとアクチン線維との相互作用に関与していることが明らかになった。また、C 末端との結合が見られない ZF1 変異体に対して ZF2 変異体は C 末端との相互作用は認められた。つまり、JRAB の LIM ドメインとアクチン線維との相互作用には、LIM ドメインを構成する ZF1 と ZF2 がともに必要であり、さらに、ZF1 は、C 末端とアクチン線維との結合と同じアミノ酸残基を用いることで LIM ドメインのアクチン細胞骨格制御を精巧に調節していることが示唆された。最後に ZF1 ドメインの細胞内でのアクチン細胞骨格への影響を調べた。線維芽細胞の NIH3T3 細胞にレトロウイルスを用いて JRAB の各変異体を発現させた。これまで、すでに報告されているように open form の JRAB は、ストレスファイバーを解除して細胞辺縁でのラッフルを形成し、一方で、closed form の JRAB は、ストレスファイバーの形成を促進する。今回、新たに作製した open form であるが ZF1 を欠損した変異体では、ラッフルの形成が抑制された。それと比較して ZF2 を欠損した変異体では、closed form の JRAB と同様に顕著なストレスファイバーの形成が認められたが、これは、残存する ZF1 と C 末端との結合で closed form をとるためと考えられる。これまで、open form の JRAB が、ラッフルを形成するには、open form の JRAB とアクチン結合蛋白質として知られるフィラミンとの結合が必要であることが報告している。実際に、open form であるが、フィラミンと結合できない JRAB 変異体を細胞に発現させても、ラッフル形成は起こらない。そこで、ZF1 を欠損して open form になった JRAB 変異体とフィラミンとの結合を免疫沈降法を用いて調べたところ、LIM ドメイン全長を保持した open form の JRAB 変異体と同等のフィラミンとの結合が認められた。このことから、open form の JRAB が示すアクチン細胞骨格制御では、JRAB とフィラミンとの結合だけではなく、C 末端から自由になった LIM ドメインも重要な役割を担っていることが本研究で新たに示された。また、本研究中にこれまでのゲノム編集技術を用いて内在性の JRAB を JRAB の構造変異体 (JRAB<sup>CC</sup>: 常に open form、JRAB<sup>CT</sup>: 常に closed form) に置換したマウスを作製することに成功した。今後も引き続き、各種 JRAB 構造変異体ノックインマウスを解析することによって JRAB の構造変化の重要性を個体レベルでも証明することを目指す。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sakakibara S, Mizutani K, Sugiura A, Sakane A, Sasaki T, Yonemura S, Takai Y.	4. 巻 219
2. 論文標題 Afadin regulates actomyosin organization through E-catenin at adherens junctions.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.201907079	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 Miyake K, Sakane A, Tsuchiya Y, Sagawa I, Tomida Y, Kasahara J, Imoto I, Watanabe S, Higo D, Mizuguchi K, Sasaki T.	4. 巻 5
2. 論文標題 1 Actin Cytoskeletal Reorganization Function of JRAB/MICAL-L2 Is Fine-tuned by Intramolecular Interaction between First LIM Zinc Finger and C-terminal Coiled-coil Domains.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-49232-8	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 Nomiyama R, Emoto M, Fukuda N, Matsui K, Kondo M, Sakane A, Sasaki T, Tanizawa Y.	4. 巻 10
2. 論文標題 Protein kinase C iota facilitates insulin-induced glucose transport by phosphorylation of soluble nSF attachment protein receptor regulator (SNARE) double C2 domain protein b.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Diabetes Investig.	6. 最初と最後の頁 591-601
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.12965	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 Sakane A., Yoshizawa, S., Yokota, H. and Sasaki, T.	4. 巻 6
2. 論文標題 Dancing Styles of Collective Cell Migration: Image-Based Computational Analysis of JRAB/MICAL-L2.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front. Cell Dev. Biol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2018.00004	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5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 富田陽子、坂根亜由子、三宅一央、土屋裕子、佐川幾子、笠原二郎、水口賢司、佐々木卓也
2. 発表標題 分子内結合が調節するJRABのLIMドメインによるアクチン細胞骨格の再編成
3. 学会等名 第60回 日本生化学会 中国・四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂根 亜由子、土屋 裕子、水口 賢司、佐々木 卓也
2. 発表標題 多彩な細胞機能を構造生物学から解く - 前説も兼ねて
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会 合同年次大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 土屋裕子、坂根亜由子、佐々木卓也、水口賢司
2. 発表標題 異なるRabとエフェクター蛋白質JRABが導く多彩な細胞機能
3. 学会等名 第18回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂根亜由子、吉澤信、松井翼、土屋裕子、水口賢司、出口真次、横田秀夫、佐々木卓也
2. 発表標題 組織構築・修復過程において1分子構造変化が生み出す多彩な細胞移動とその意義
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坂根亜由子、吉澤信、土屋裕子、松井翼、出口真次、水口賢司、横田秀夫、佐々木卓也
2. 発表標題 集団的細胞運動において一分子構造変化が生み出す多様な運動様式とその役割
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2018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