

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06969

研究課題名(和文)細胞内小胞輸送による新しいがん幹細胞の維持機構

研究課題名(英文)A novel intracellular membrane traffic-dependent regulation of cancer stem cell properties

研究代表者

梶保 博昭(KAJIHO, HIROAKI)

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号：70401221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：がん幹細胞は、アポトーシス抵抗性を有する。がん幹細胞を標的とした治療薬の開発のためには、アポトーシス抵抗性のメカニズムの解明が不可欠である。本研究では、細胞内小胞輸送に関わる低分子量Gタンパク質RAB/ARFファミリーに属するがん抑制遺伝子ARL11のアポトーシス抵抗性における機能を解析した。活性化型ARL11はアクチン結合タンパク質と結合して、アポトーシスに特有の細胞膜のブレbbingを形成した。不活性化型ARL11はアポトーシスを制御する核内構造体に局在した。ARL11の相互作用因子との結合や細胞内局在がアポトーシス抵抗性に関与する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Cancer stem cells possess anti-apoptotic property. In order to develop effective drugs targeting cancer stem cells, it is important to elucidate the mechanism of anti-apoptotic property. We investigated the function of ARL11, a tumor-suppressor gene belonging to RAB/ARF GTPase family involved in intracellular membrane traffic. We found that the active form of ARL11 interacts with an actin-binding protein and induces apoptotic membrane blebbing. The inactive form of ARL11 localizes to a nuclear body involved in apoptosis. Our studies implicate that the interaction between ARL11 and the actin-binding protein and the intracellular localization of ARL11 are involved in anti-apoptotic property.

研究分野：生化学

キーワード：低分子量Gタンパク質 ARFファミリー がん幹細胞

## 1. 研究開始当初の背景

がん幹細胞は非常に数が少なくそれ自体はほとんど増殖しないが低酸素環境下でも生存が可能である。しかしがん幹細胞から分化したがん細胞は急速に増殖や浸潤をきたし、生物を死に至らす。がん幹細胞はアポトーシス抵抗性を持っているため、従来の化学療法や放射線療法はがん幹細胞には殆ど効果がない。したがって残存したがん幹細胞から生じたがん細胞が再発や転移を引き起こすと考えられるため、がんの根本的な治療にはなっていない。がん幹細胞への効果的な治療薬の開発のためには、がん幹細胞がアポトーシス抵抗性をどのようにして有しているのか、そのメカニズムの理解が不可欠であるが未だ十分解明されていない。

## 2. 研究の目的

アポトーシスを起こす細胞では細胞膜上にプレビングと呼ばれるこぶ状の形態が観察される。この際、膜成分を細胞膜へと輸送することが重要である。細胞膜への膜の輸送は、小胞輸送によって行われている。低分子量Gタンパク質RAB/ARFファミリーが小胞輸送を制御していることが知られている。そこで、RAB/ARFファミリーによる小胞輸送の制御がアポトーシス抵抗性に関与すると考えた。

ARL11はARFファミリーに属し、近年ARL11はがん抑制遺伝子として報告されたがその機能はまだ解明されていない。ARL11の機能低下がアポトーシス抵抗性に関与することが考えられた。そこで、ARL11のアポトーシス抵抗性を有する機能を明らかとすることを本研究課題の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)ARL11点変異体の作成

活性化型変異体 ARL11/Q65L および不活性化型変異体 ARL11/T24N を作成した。目的のアミノ酸に変異が入るように該当部位の塩基を置換したプライマーを設計し、ラット ARL11 を鋳型として QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit を用いて PCR を行った。反応物を制限酵素 Dpn I の処理により鋳型を切断後、大腸菌へ形質転換した。形質転換した大腸菌からプラスミドを回収後、塩基配列を解析し、目的の変異が導入さ

れたことを確認した。

### (2)ARL11の細胞内局在

ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549 細胞に C 末に FLAG タグを付与した ARL11 野生型-FLAG、ARL11/Q65L-FLAG または ARL11/T24N-FLAG を発現させた。PFA による固定後に抗 FLAG 抗体による免疫染色、および phalloidin-rhodamine によるアクチン細胞骨格の染色を行った。

### (3)ARL11 エフェクター分子の探索

Yeast-two hybrid 法により ARL11 のエフェクター分子を探索した。yeast に ARL11/Q65L およびマウス胎児 cDNA ライブラリーを導入し、ヒスチジンを含まない培地に塗布した。生育したコロニーをアデニンを含まない培地に塗布した。生育したコロニーが持つライブラリー由来のプラスミドの塩基配列を解析した。

### (4)ARL11/Q65L と ARL11 エフェクター分子の共局在、ARL11/T24N が局在する核内構造体の同定

ARL11/Q65L-FLAG と N 末に HA タグを付与した ARL11 エフェクター分子(未発表データのため HA-protein X と以降表記)を HeLa 細胞に発現させ、PFA による固定後に抗 FLAG 抗体と抗 HA 抗体による免疫染色、および phalloidin-rhodamine によるアクチン細胞骨格の染色を行った。

ARL11/T24N-FLAG を HeLa 細胞に発現させ、PFA による固定後に核内構造体に局在することが知られている分子に対する抗体と抗 FLAG 抗体による二重免疫染色を行った。

## 4. 研究成果

### (1) ARL11 点変異体の作成

ARL11 と他の RAB/ARF ファミリーのアミノ酸配列の相同性を解析し、ARL11 が GDP/GTP との結合や GDP 結合型/GTP 結合型による構造の変化、GTP の水解など G タンパク質として重要なアミノ酸を保存していることがわかった。そこで他の RAB/ARF ファミリーに倣い点変異を導入し、活性化型変異体 ARL11/Q65L および不活性化型変異体 ARL11/T24N を作成した。

(2) 活性化型 ARL11 は細胞膜でプレビングを起こす

ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞 A549 細胞における ARL11 の細胞内局在を検討した。A549 細胞に FLAG タグを C 末に付与した ARL11 野生型 (ARL11/WT-FLAG) または ARL11/Q65L (ARL11/Q65L-FLAG) を発現させた。PFA 固定後、抗 FLAG 抗体による免疫染色し、アクチン細胞骨格を phalloidin-rhodamine で染色した。その結果、ARL11/WT-FLAG は核および細胞質全般に広く分布した。一方、ARL11/Q65L-FLAG は主に細胞膜直下のアクチン細胞骨格上に局在した。さらに ARL11/Q65L-FLAG を発現した細胞では細胞膜直下のアクチン細胞骨格が大きく変形し、細胞膜がプレビングを起こしていた。細胞膜のプレビングはアポトーシスを起こしている細胞に特有の現象である。以上の結果より、活性化型 ARL11 が細胞膜直下のアクチン細胞骨格に局在すること、細胞膜のプレビングを起こすことがわかった。

(3) ARL11 エフェクター分子の同定

活性化型 ARL11 が細胞膜直下のアクチン細胞骨格に局在して細胞膜のプレビングを起こす分子メカニズムを調べるため、ARL11 のエフェクター分子の探索を行った。Yeast-two hybrid 法を用いて ARL11/Q65L と相互作用する因子のスクリーニングを行った。その結果、コロニーを 8 つ得た。コロニーからプラスミドを回収し、相互作用タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列を解析した結果、5 種類の相互作用因子を同定した。相互作用因子の 1 つはアクチン結合タンパク質 (protein X) の部分配列であった。

(4) ARL11/Q65L はエフェクター分子とアクチン細胞骨格で共局在して細胞膜のプレビングを起こす

A549 細胞に ARL11/Q65L-FLAG と HA-protein X の全長を共発現させて、抗 FLAG 抗体、抗 HA 抗体で免疫染色し、phalloidin-rhodamine でアクチン細胞骨格を染色した。その結果、ARL11/Q65L-FLAG と HA-protein X はプレビングを起こした細胞膜直下のアクチン細胞骨格上で共局在した。活性化型 ARL11 は protein-X と細胞膜直下のアクチン細胞骨格で共局在して細胞膜のプレビングを起こすことがわかった。

(5) ARL11/T24N はがん幹細胞特性の維持に関わる核内構造体に局在する

次に不活性化型 ARL11 の細胞内局在を検出した。A549 細胞に FLAG タグを C 末に付与した ARL11/T24N (ARL11/T24N-FLAG) を発現させた。固定後、抗 FLAG 抗体による免疫染色を行った。ARL11/WT-FLAG や ARL11/Q65L-FLAG と異なり、ARL11/T24N-FLAG は主に核内の一部に集積した。この結果から ARL11/T24N-FLAG は核内構造体に局在する可能性が示唆された。そこで核内構造体に局在することが知られている分子との免疫染色を行った。その結果、ARL11/T24N-FLAG は核内構造体に局在するタンパク質の一つと共局在した。また、ARL11/T24N-FLAG がこの核内構造体を集積し、そのサイズを大きくした。この構造体はアポトーシスにおいて重要な役割を担うことが知られている。不活性化型 ARL11 はアポトーシスに關与する核内構造体に局在することがわかった。

ARL11 は ARF ファミリーに属することから小胞輸送を制御すると考えられる。したがって、活性化型 ARL11 は小胞輸送を介して細胞膜に膜を供給する可能性が考えられる。以上のことから活性化型 ARL11 がアポトーシスを誘導する分子メカニズムとして、アクチン結合タンパク質 protein-X と結合して細胞膜直下のアクチン細胞骨格に局在するアクチン細胞骨格を変形する細胞膜に膜を過剰に供給する細胞膜のプレビングが起きてアポトーシスを誘導するというモデルを期待している (図 1)。

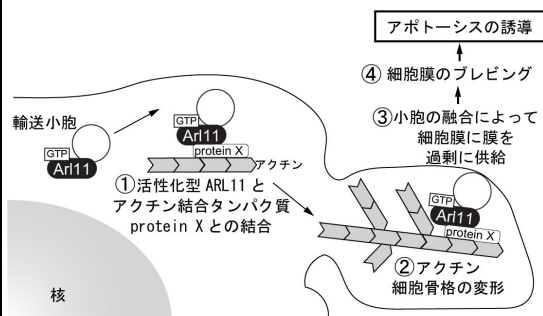


図 1 活性化型 ARL11 によるアポトーシスの制御機構

一方、不活性化型 ARL11 はアポトーシスの誘導に重要な核内構造体に局在し核内構造体を集積した。不活性化型 ARL11 によるこの核内構造体の集積がアポトーシスを誘導す

ると期待している(図2)。

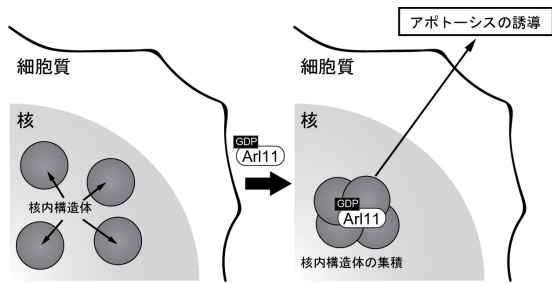


図2 不活性型 ARL11 によるアポトーシスの制御機構

本研究によって ARL11 の相互作用因子との結合や細胞内局在がアポトーシス抵抗性に関わる可能性を見出した。ARL11 が幹細胞のアポトーシス抵抗性に対する新たなターゲット分子となる可能性が考えられる。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 梶保博昭、姜山、山本泰憲、匂坂敏朗  
ユビキチンリガーゼによる小胞体の形態制御機構

(口頭発表、ポスター発表)

第 64 回 日本生化学会 近畿支部例会  
2017 年 5 月 26 日  
大阪大学 (大阪府・豊中市)

(2) 梶保博昭、山本泰憲、匂坂敏朗  
ユビキチンリガーゼ活性による小胞体の新しい形態調節機構

(口頭発表、ポスター発表)

2017 年度生命科学系学会合同年次大会  
2017 年 12 月 6 日-12 月 9 日  
神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/membrd/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶保 博昭 (KAJIHO, Hiroaki)

神戸大学大学院・医学研究科・講師

研究者番号：70401221