

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08582

研究課題名(和文)細胞の増殖分裂制御に関わる新たなシグナル伝達機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of novel signaling mechanisms that regulates cell proliferation and division

研究代表者

足立 誠 (ADACHI, Makoto)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：30335244

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)：IQGAP3の細胞増殖制御機構について様々な解析を行なったが、その解明には至らなかった。しかしある種の細胞増殖因子受容体とIQGAP3が直接結合していること、受容体の機能阻害によってIQGAP3の発現が低下することなどから、両者の間に何らかの機能的関連がある可能性が示唆された。一方、IQGAP3と結合する新規因子である因子Aが肝細胞の増殖に対して特異的に重要な機能を持つことを明らかにした。因子Aのこの機能とIQGAP3との関連は明らかにできていないが、この機能がIQGAP3が関与しない全く新しい分子機構によって実現していることを示唆するデータが得られている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

残念ながら本研究課題についてこれまでに世に発表できる形での研究成果を得ることはできていない。しかしながら、研究の過程で様々な新たな知見を得ることができ、現在それらを元に解析を進めているところである。特に因子Aが肝細胞特異的に顕著な増殖制御能を持つことは申請者の予想になかった新たな発見であり、またその作用機序についてもこれまでに興味深い知見が得られていることから、解析が進むことで肝細胞増殖・肝癌の新たな分子機序の理解の一助となることが期待される。IQGAP3による細胞増殖制御の分子機構を含めその他の課題についても現在引き続き解析を進めており、近い将来その成果を発表し社会に還元したいと考えている。

研究成果の概要(英文)：Various analyses were conducted on the cell proliferation control mechanism of IQGAP3, but the elucidation was not achieved. However, the direct binding of IQGAP3 to certain cell growth factor receptors and the decreased expression of IQGAP3 due to functional inhibition of the receptors suggest that there may be some functional relationship between these two molecules. In the meantime, it was clarified that factor A, a novel binding partner of IQGAP3, had the function which is peculiarly important for the proliferation of the hepatocyte. Although the relationship between this function of factor A and IQGAP3 has not been clarified, data suggest that this function is achieved by a novel molecular mechanism that does not involve IQGAP3.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞内シグナル伝達機構

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

IQGAP ファミリーは進化的に保存されたシグナル伝達分子である。酵母・線虫などには IQGAP 分子は各々一つだけ存在し、特に細胞質分裂に重要な機能を持っていることが知られている。一方、哺乳類には3つの IQGAP ファミリー分子が存在する(IQGAP1, 2, 3)が、主に IQGAP1, 2 について研究が進んでおり、これらが細胞の運動や接着など多くの細胞内機能に重要な役割を果たしていることが明らかにされていた。一方、IQGAP3 は *in vitro* での神経突起伸長へ関与することが報告されていたが、その機能の詳細は長らく未解明のままだった。本研究課題開始以前までに申請者らは IQGAP3 が細胞の増殖に重要な機能を持つことを初めて明らかにしていた(Nojima, Adachi et al. (2008) *Nat. Cell Biol.* 10:971-978)。その後、IQGAP3 が肝細胞の再生・発生時に特異的に発現量を増大させること、複数の癌種で腫瘍形成に必要であること、またゼブラフィッシュでは3つの IQGAP ファミリーの中で IQGAP3 が特異的に細胞増殖に必要であること、などの報告が相次いでなされ、我々の結論が裏付けられてきた。またさらに申請者らは IQGAP3 が細胞分裂期の分裂溝に局在し、細胞質分裂に重要な役割を果たしていることを初めて報告した(Adachi et al. (2014) *Genes Cells* 19:803-820)。元々 IQGAP 分子が初めて発見された種である酵母において、そのほぼ唯一の知られた機能が分裂溝における細胞質分裂制御であったことを考えると、哺乳類の IQGAP3 は、これまでその解析が大きく立ち遅れてきたものの、実は進化的に最も保存された IQGAP ファミリー分子の機能を受け継ぐ非常に重要な分子であると言えるかもしれないと考えられた。そしてその後の申請者らの研究によって、IQGAP3 に結合する新たな因子を同定し、この因子を介してこれまで全く知られていなかった新たな IQGAP3 の機能が存在する可能性を示唆する結果を得ていた。

## 2. 研究の目的

上述のような当時の研究背景を踏まえ、本研究課題では以下の4つの側面から研究を進めたいと考えた。

### (課題1) 上皮細胞における IQGAP3 の細胞質分裂制御機構の解析

申請者らは以前、HeLa 細胞において、IQGAP3 が分裂溝形成の制御因子である anillin と結合することで分裂期の分裂溝に局在し、anillin とともにその形成に重要な役割を果たしていることを示した。一方、近年上皮細胞における細胞質分裂の重要性が認識されつつある。実際、上皮細胞は隣接する細胞との間で tight junction (TJ) や adherens junction (AJ) などの細胞間接着装置を形成し、外部とのバリアーを維持・形成し個体の恒常性を維持する必要があり、細胞質分裂もまた細胞間に間隙が生じないように行なわれなければならない。したがってこの分裂の過程では細胞間接着装置のダイナミックな再構成が行なわれていると考えられるが、これが細胞質分裂機構と如何にリンクして行なわれているのか、ほとんど明らかにされていない。また上皮細胞には apical-basal 軸方向に極性があるが、分裂溝は apical 側の領域に偏って形成され、また分裂装置の紡錘体は(通常の体細胞においては)この軸に対して垂直に形成されるという特徴がある。そしてこれらが実現するためには、分裂溝と TJ・AJ との直接の相互作用が重要であると考えられている。申請者はこれまでに、上皮細胞では IQGAP3 は間期に AJ を含む lateral 膜に局在すること、また分裂期には分裂溝に局在することを確認している。一方、IQGAP1 は AJ を構成する細胞間接着因子と結合し、接着構造の維持形成に重要な役割を果たしていることが知られているが、我々の実験から IQGAP3 にも似た機能があることが示唆された(未発表)。また申請者らは、IQGAP1 は HeLa 細胞において分裂溝には局在しないものの、IQGAP3 とは異なるメカニズムで細胞質分裂に関与していることを報告している。こうしたことから、IQGAP3 および IQGAP1 は上皮細胞の特異な細胞質分裂においても重要な機能を担っていることが考えられ、本研究課題ではその詳細を明らかにしたいと考えている。

### (課題2) IQGAP3 のノックアウトマウスの解析

これまでに IQGAP1 と2のノックアウトマウスの報告がされているが、共に微細な異常は認められるものの正常に生育が可能であり、培養細胞系などの *in vitro* 系で見出されて来た様々な分子機能が *in vivo* においてどれほど当てはまるものなのか明確にできていない。申請者らは昨

年度までに IQGAP3 のノックアウトマウスの作製を行なった。そこで本研究課題ではまずその表現型を詳細に解析して記述することを目指す。また、上述の通り IQGAP 1、2 各分子の単独のノックアウトでは顕著な異常が認められていないが、これは他の IQGAP 分子による機能的な相補によるためである可能性が考えられ、そのことを検証するために、特に機能的重複が考えられる IQGAP1 と 3 とのダブルノックアウトマウスの作製を視野に入れる。

#### (課題 3) IQGAP3 の細胞増殖制御の分子機構の解析

申請者らは以前、乳腺上皮細胞株 Eph4 において IQGAP3 の RNAi が癌原遺伝子産物である Ras の活性低下を引き起こし、細胞増殖を抑制することを示した。そして IQGAP3 が Ras と直接結合し、その活性を正に制御することがその機能として重要であるという仮説を提示した。しかしその後の研究で、RNAi などによる IQGAP3 の発現抑制が他の非上皮系の細胞株では顕著な増殖抑制を引き起こさず、また Ras-ERK シグナル伝達経路にも目立った活性の変化を与えないことが見出され、この IQGAP3 の機能は細胞特異的(一つの可能性として、上皮細胞特異的)なものである可能性が浮かび上がって来た。その場合、IQGAP3 による細胞増殖制御は Ras の直接的な制御だけでは説明できないと考えられる。そこで本研究課題では、細胞種依存的に生じる IQGAP3 による Ras-ERK 経路の制御機構について、その詳細の解明を目指す。

#### (課題 4) IQGAP3 の制御する新たな細胞機能の解析

申請者はこれまでの研究から、IQGAP3 の新たな結合分子を同定した。この新規因子(以下便宜上“因子 A”と呼称する)は、その内在性分子が細胞内で内在性の IQGAP3 と結合し、また試験管内において両者は直接結合した。この因子 A にはその一次配列上酵素活性を持つようなドメインは存在せず、またこれまでに分子機能に関する報告もほとんど無いが、in vitro で胚体外組織の分化に関与するとする報告がある。一方この因子 A の細胞内局在を免疫染色によって観察したところ、ある細胞内小器官に特異的に局在していることが見出された。これまでの解析では、この因子の RNAi によって IQGAP3 の発現量や細胞内局在などに異常は観察できていないが、逆に IQGAP3 の RNAi によって因子 A の該当細胞内小器官における局在が顕著に増加することが認められた。このことの機能的意義については現在のところ不明であるが、GEO プロファイルなどを解析すると、ある種の癌(類内膜癌、肺癌)において、その悪性度の進行に伴って因子 A の発現が減少する傾向があった。一方で、IQGAP3 はその発現が肺癌組織において大きく増加すること、およびその発現が複数の癌腫で癌細胞の癌形成度と機能的に正に相関することが報告されている。これらのことから、因子 A は IQGAP3 のエフェクターとしてその機能に重要な役割を果たしている可能性があると考えられる。そこで本研究課題では因子 A の IQGAP3 との関連性を含めた詳細な機能解析を行ないたいと考えている。

### 3. 研究の方法

本研究は 3 ヶ年での達成を目標とし、初年度には IQGAP1,3 の上皮細胞内局在の詳細な解析と各分子単独、およびダブルノックアウト上皮細胞株の樹立(課題 1) IQGAP3 ノックアウトマウスの表現型の解析(課題 2)、Eph4 細胞において IQGAP3 の RNAi によって活性の阻害される、Ras の上流のシグナル伝達分子のスクリーニング(課題 3)、IQGAP3 による因子 A の局在制御機構の解析および RNAi などによる因子 A の機能解析(課題 4)を行なう。次年度以降は IQGAP1,3 ノックアウト細胞の細胞質分裂異常の解析(課題 1) IQGAP3 ノックアウトマウスの組織・細胞レベルでの詳細な解析(課題 2)、活性に変化の認められたシグナル伝達分子の IQGAP3 による制御機構の解析およびその RNAi の表現型の解析(課題 3)、因子 A と結合する分子のスクリーニング、および同定された結合分子の因子 A との機能的関連の解析(課題 4)を行なう。以下にその詳細を記述する。

(課題 1) 上皮細胞での細胞質分裂過程の解析にあたっては、apical-basal の極性が明瞭で細胞質分裂解析のモデルとして実績のある MDCKII 細胞を使用する(IQGAP1,3 がこの細胞に発現していることは RT-PCR で確認済み)。またこれまでの研究で、この細胞における(特に IQGAP3 の)RNAi の効率が非常に悪かったことから、明確な遺伝子発現抑制を実現するためにノックアウト細胞株を樹立することにする。MDCKII 細胞に IQGAP1,3 各遺伝子(各々第 3、第 7 染色体

上)の開始コドン周りのゲノム領域を切り抜くよう CRISPR/Cas9 システムを用いたベクターをデザイン・作製する。非特異的なゲノム切断を抑えるため、ニックアーゼ活性を持つように改変した変異型 Cas9(Cas9D10A)を用いたダブルニックアーゼ法を採用する。各分子単独のノックアウト細胞が作製できた(クローン差に起因する表現型の差を排除して解析するため、各々2~3クローン作製する)両分子のダブルノックアウト細胞を引き続き作製する。ノックアウトの正否の確認は、該当ゲノム領域のシーケンスおよびイムノプロットングによって行なう。GFP-IQGAP1,3 を各々恒常的に発現させた MDCKII 細胞株を作製し、デルタビジョンによって分裂過程における IQGAP1,3 の局在変化を継時的に観察する。

次年度以降は前年度までに作製した IQGAP1,3 単独およびダブルノックアウト MDCKII 細胞の細胞質分裂過程をタイムラプス顕微鏡で観察し、細胞質分裂のどの段階で異常が生じるかを検討する。また様々な分裂制御因子の局在への影響を免疫蛍光染色によって検討する。この際、上皮細胞の分裂の特徴、すなわち 分裂面の apical 側への非対称な偏り、 分裂面と apical-basal 軸との直交性(基底膜と並行) 分裂時の細胞接着装置の分解・抑制、 分裂終了後の細胞接着装置の再形成、などについて特に詳しく観察する。異常な表現型が観察されたら、IQGAP1,3 発現によってその異常が回復出来るか検討する。同様に様々なドメインを欠失した IQGAP 分子を用い、どのドメインが異常の回復に重要であるかを明らかにし、そのドメインに結合する分子(既知のものからのスクリーニングもしくは該当領域に結合する新規因子の探索)を明らかにすることで IQGAP の機能の分子メカニズムを解明する。なおこれらの解析においては、IQGAP3 との機能的関連性の大きい anillin との関連について特に留意する。

(課題2) IQGAP3 ノックアウトマウスの各組織の発生状況・形態を観察する。また各組織切片の HE 染色サンプル像を詳細に観察し、野生型との差異が認められないか検討する。特にその癌との関連が示唆されている表皮・肺などの上皮系組織、また *in vitro* の研究などで機能が示唆されている肝臓や神経組織などは特に詳細に解析する。必要に応じて免疫組織学的な観察を併せて行なう。なおノックアウトマウスの解析は大阪大学大学院・生命機能研究科の月田早智子教授の研究室の協力のもとで行なう予定である。

次年度以降も引き続き、IQGAP3 ノックアウトマウスの解析を行なう。IQGAP1,2 のノックアウトマウスの場合のように見かけ上の顕著な発生異常が認められなかった場合は、幾つか注目すべき臓器の細胞について初代培養細胞を作製し、その細胞に適したアッセイ系で *in vitro* でその機能を検討する。また IQGAP1 のノックアウトマウスを購入し、IQGAP3 ノックアウトマウスと掛け合わせてダブルノックアウトマウスを作製し、同様に解析を進める。

(課題3) Ras の上流因子として、EGFR,FGFR などの増殖因子受容体、Shc,Grb2 などのアダプター分子、Sos1 などの GEF (guanine nucleotide exchange factor)、RasGAP などの GAP(GTPase-activating protein)が存在する。まずこれらの分子について、その細胞内における活性化状態(リン酸化状態)や発現量を、リン酸化部位特異的抗体によるイムノプロットングや phos-tag ゲル泳動後の特異的抗体によるイムノプロットングによって、コントロールと IQGAP3 ノックダウン EpH4 細胞との間で比較する(ただ、細胞内在性の GEF や GAP 分子の活性を検討するのは困難である)。また IQGAP3 と結合している分子を免疫沈降実験(293T 細胞などに過剰発現した分子同士、もしくは EpH4 細胞内在性分子同士の結合の検討)や組換え蛋白質同士の結合実験で検討する。これらの結果から IQGAP3 によって制御されていると考えられる分子が見つかったら、両者の結合に必要な各分子上の領域を、様々なドメインを欠失したコンストラクトを用いて明らかにする。

次年度以降は同定された領域を介する IQGAP3 と該当分子との結合が、どのように該当分子の活性に影響を与えるのかを組換え蛋白質を用いた *in vitro* のアッセイ系で明らかにする。また EpH4 細胞においてその分子の RNAi を行ない、IQGAP3 の表現型と対応する表現型を示すか検討する。また、非上皮細胞における該当分子の発現の有無を検討し、発現が認められた場合はその細胞における IQGAP3 の RNAi が活性に与える影響の検討、および該当分子の RNAi の表現型の検討を行い、この分子が細胞種依存的な IQGAP3 の機能の裏付けとなる分子であることを明らかにする。

(課題4) IQGAP3 の RNAi を行なった細胞における因子 A の発現量の変化が転写・翻訳・分解

のどの段階で生じているのかを検討する。また因子 A の RNAi を行ない、該当細胞内小器官に対して因子 A がどのような機能を持つのか、また これまで明らかになっている IQGAP3 の増殖や細胞質分裂における機能に対して因子 A は関与しているのか、について検討する。なおにおいて明らかになった機能に対して IQGAP3 が関与しているかについても検討する。ただし、その機能そのものが既知の IQGAP3 の機能に関与している可能性があることを考慮しておく必要がある。また、因子 A が胚体外組織への分化に関与するとの報告があることから、F9 細胞や ES 細胞を用いた分化誘導系での両分子の機能、および機能的関連性を RNAi などで検討する。

次年度以降は因子 A の機能や制御機構を明らかにするために因子 A と結合する分子のスクリーニングを行なう。タグを付加した因子 A を内在性分子と同程度の量で恒常的に発現させた細胞株を樹立し、その懸濁液からタグを用いた免疫沈降を行ない、SDS-PAGE する。コントロールの細胞には存在せず因子 A 発現細胞にのみ存在するバンドを切り出し、質量分析によって結合分子を同定する。この際、該当細胞内小器官のみを分画した懸濁液を使用して非特異的吸着を減らす、懸濁液を予め DNase 処理することで DNA 結合蛋白質の非特異的な回収を抑える、などの工夫をする。得られた因子(群)の cDNA をクローニングして発現ベクターを作製し、因子 A との結合を免疫沈降によって確認する、抗体(必要に応じて自作)を用いてその分子挙動(細胞内局在・発現量・翻訳後修飾)が因子 A の RNAi で変動するかを検討する、因子(群)の siRNA を行ない、因子 A の分子挙動への影響の検討、および因子 A や IQGAP3 の siRNA の表現型との比較、などを行ない、互いの分子間の機能的な関連性を明らかにする。

#### 4. 研究成果

(課題 1) MDCKII 細胞を用いて IQGAP1,3 ノックアウト細胞の作成を試みたが、使用している抗体の問題(犬抗原に対する反応性が極めて低い)からノックアウト細胞の評価が困難な状況に陥ってしまった。そこで Eph4 細胞の IQGAP1,3 ノックアウト細胞を作成した。その解析を行った結果、細胞質分裂過程の遅延・マーカー分子の局在異常などを示唆するデータが得られたものの、その表現型が安定しないという問題が生じた。そこで RNAi の結果と併せて検討する、および複数のノックアウトクローンを比較検討するなどしたが、最終的に再現性のある有意な異常は認めることができないという結論を得るに至った。用いていた培養上皮細胞株 Eph4 がもともとクローンごとの差異の大きい細胞であったために生じた問題であると思われる、現在は他の細胞株に切り替えて解析を進めている半ばである。

(課題 2) IQGAP3 ノックアウトマウスの解析は、他の研究課題に予算と労力を取られてしまった結果、ほとんど進めることができなかった。

(課題 3) IQGAP3 ノックダウン細胞において Ras 活性に関連のあると思われるシグナル伝達分子の中に発現量の顕著な変動を示す分子は見つけることはできなかったが、Ras の上流で働き細胞増殖に対し重要な機能を持つことが広く知られている複数の増殖因子受容体に対し、IQGAP3 が in vitro および in vivo で結合することを新たに見出した。また、各分子内で両者の結合に関与する領域の同定にも成功した。そこでこれらの受容体分子が IQGAP3 による細胞増殖制御に対し機能的に関与しているかについて明らかにするため、IQGAP3 ノックアウト細胞における各受容体の分子的挙動(発現量・リン酸化・細胞内局在)を検討したが、コントロールの細胞と比較してもいずれの点でも顕著な変動は認められなかった。そのため現時点ではこれら受容体と IQGAP3 との機能的関連は不明である。なお、逆に IQGAP3 が当該受容体の細胞増殖制御における機能に対して関与するかについても併せて検討したが、受容体分子のノックダウンによって IQGAP3 の発現量が顕著に減少したものの、これが受容体の機能に IQGAP3 が直接関与することを示すものであるかは不明である。

(課題 4) IQGAP3 の結合因子である因子 A の IQGAP3 ノックダウン細胞における細胞内小器官への局在変化が因子 A の mRNA・タンパク質レベルでの発現量の変化に起因するものではないことを示唆する結果を得たものの、その後の詳細な顕微鏡観察によってこれまで考えられていた局在変動が統計的に有意でない可能性が高いことが明らかになった。また因子 A の胚体外組織分化への機能的関与を明らかにするためにノックアウト F9 細胞の樹立を行い、その解析を行っ

たが、こちらについても否定的な結果が得られた。一方、この因子が特に肝細胞において顕著な細胞増殖制御能を有することを明らかにした。この機能における IQGAP3 との関連を示唆する結果は現在のところ得られていないが、他の分子機構を示唆する結果が得られており、現在その解析を進めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://cell.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/about\\_01.html#adachi](http://cell.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/about_01.html#adachi)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。