

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22570192

研究課題名（和文） 間葉性遊走とアメーバ様遊走に於ける RacGAP 因子 FilGAP の機能解析

研究課題名（英文） Studies on the role of FilGAP (RacGAP) in mesenchymal and amoeboid cell migration.

研究代表者

太田 安隆 (OHTA YASUTAKA)

北里大学・理学部・教授

研究者番号：90192517

研究成果の概要（和文）：FilGAP は低分子量 GTP 結合タンパク質 Rac を特異的に不活化する因子である。本研究で FilGAP による動物細胞の運動制御機構を解析した。(1) 葉状仮足を介した間葉性遊走における FilGAP の機能解析を行い、FilGAP は 2 次元環境下で運動している細胞の葉状仮足の形成を細胞前部に限定させる機能があることが示唆された。(2) ヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 は、3 次元培養条件下(3D)で Bleb 型と間葉型の形態を混在して持っているが、FilGAP を欠失した細胞は間葉型の形態になり、Bleb 型に移行できなくなった。これから FilGAP は 3D で Bleb 型の運動に必要な因子であることが明らかになった。また、MDA 細胞は FilGAP 存在下でより高度の浸潤能を示すことが明らかになった。(3) FilGAP は Rho/ROCK シグナル伝達系で、リン酸化され活性化することで、3D での Bleb 構造の形成に関与していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：FilGAP is a Rac-specific GAP that suppresses Rac-dependent lamellipodia formation and cell spreading. We have investigated how FilGAP is involved in the control of mesenchymal and amoeboid migration of tumor cells in 2-dimensional (2D) and 3-dimensional (3D) environments. (1) We found that FilGAP may restrict the area of lamella formation at the front of migrating cells in 2D. (2) We found that FilGAP is necessary for Bleb formation and amoeboid movement in 3D. Expression of FilGAP stimulates invasion of MDA-MB-231 cells. (3) FilGAP is phosphorylated and activated by Rho/ROCK-signaling. We found that Phosphorylation of FilGAP induces Bleb formation of tumor cells in 3D environment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞運動・細胞接着・細胞極性・低分子量 GTP 結合タンパク質・細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

(1) RhoGTPase は細胞の形態、運動を制御する因子で分子スイッチとして働いている。生体中で、多くの細胞はコラーゲンなどの細胞外基質に囲まれた3次元環境(3D)の中で運動している。3Dで、細胞は葉状仮足を用いた間葉性(mesenchymal)遊走とBlebと呼ばれる泡状の構造体を用いたアメーバ様(amoeboid)遊走を外部環境によって使い分けながら移動している。葉状仮足を介した間葉性遊走はRacにより制御されており、Blebを介したアメーバ様遊走はRhoとその標的タンパク質ROCKにより制御されていることがわかっている。すなわち3Dでの細胞運動の外部環境に応じた変換は、RacとRhoの細胞内での役割分担が細胞外環境に応じて変わるためだと考えられているがその分子メカニズムは不明である。

(2) FilGAPは本研究代表者が同定した因子でRacを特異的に不活化するGAP活性を持っている。FilGAPはRhoの下流のROCKにより活性化され、Racを不活性化するので、葉状仮足を用いた間葉性遊走とBlebを用いたアメーバ様遊走両者の制御に関わっている可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、FilGAPのMATにおける役割を明らかにすることを目的とし、具体的には次の3点に焦点を絞り解析を進めた。

- (1) 葉状仮足を介した間葉性遊走におけるFilGAPの機能解析を進める。
- (2) Blebを介したアメーバ様遊走におけるFilGAPの役割を明らかにする。
- (3) がん細胞が細胞外基質中を移動する

際に起こる間葉型の運動とアメーバ型運動の変換におけるFilGAPの役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 葉状仮足を介した間葉性遊走におけるFilGAPの機能解析は、創傷治癒アッセイを用いて行った。

①細胞はヒト上皮がん由来のHeLa細胞とMDA細胞を用い、細胞内FilGAPの発現をsiRNAで抑えたり、GAPドメインを欠失させたFilGAP変異体を優性型阻害剤として用い、葉状仮足による運動に対する効果を解析した。

②運動解析は、Time-lapse顕微鏡を用い細胞運動の軌跡を観察し検討した。

③運動している細胞の進展する葉状仮足の数や方向、極性形成などは、運動中の細胞を固定し、パラメータの指標になる分子の局在を間接蛍光抗体法で同定した。

(2) Blebを介したアメーバ様遊走におけるFilGAPの機能解析は、3D環境下で実験を行った。

①細胞の形態観察は、培養用ディッシュにコラーゲンゲルを低濃度(1.7mg/ml)で厚めにコートしその上に細胞を播き観察した。

②コラーゲンゲル上での細胞運動は、Time-lapse顕微鏡を用いて解析した。

③コラーゲンゲル上での細胞形態と細胞内分子の局在は、間接蛍光抗体法を用いた。

④3Dでのアメーバ様運動は、3Dトランスウエルによる浸潤アッセイで検討した。走化性因子としては、HGFを用い、ゲル内に浸潤した細胞数や細胞形態は、共焦点顕微鏡で観察した。

⑤3DでのBleb形成におけるROCKとミ

オシンの関与については、それぞれの特異的阻害剤の効果を検討した。

(3) がん細胞が葉状仮足型から Bleb 型へ変換する時には細胞内 Rho の活性が必要である。FilGAP は Rho の下流で ROCK によりリン酸化されるので、FilGAP のリン酸化ががん細胞の Bleb 型への移行に関与しているか検討した。

① FilGAP の ROCK によるリン酸化部位をアラニンに変異させた非リン酸化型 FilGAP 変異体と、アスパラギン酸に変異させた疑似リン酸化型 FilGAP 変異体を細胞に導入し、細胞形態の観察および ROCK 阻害剤(Y27632)の効果を検討した。

② コラーゲンゲル上で培養した MDA 細胞に LPA を添加すると細胞は Bleb 型に移行する。このとき FilGAP のリン酸化が上昇するか、細胞を P32 正リン酸でラベルし、細胞を可溶化後、抗 FilGAP 抗体で免疫沈降することで、FilGAP の細胞内リン酸化状態を解析した。

③ 上記の実験は、主にヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 を用いて行ったが、必要に応じて、様々な上皮由来悪性がん細胞を用いた。細胞株としては HeLa (子宮頸癌)、KB (咽頭癌)、A549 (肺がん)、SW620 (結腸がん) を検討した。

4. 研究成果

(1) 葉状仮足を介した間葉性遊走における FilGAP の機能解析。

創傷治癒アッセイ (Wound healing assay) を用いた FilGAP の機能解析を行った。複数の RNAi で FilGAP を欠失させると傷の修復が予想に反して遅くなることが明らかになった。そこで、Time-lapse 顕微鏡観察により、創傷治癒アッセイで FilGAP を欠

失させた細胞の運動を詳細に解析した。まず FilGAP を RNAi で欠失させると葉状仮足が細胞の進行方向だけでなく、側面にも多数ランダムに形成されることが明らかになった。また、運動している細胞の面積もコントロールに比べて大きくなることがわかった。運動している細胞の速度には FilGAP KD 細胞とコントロールで差が認められなかった。細胞内 FilGAP の局在を間接蛍光抗体法を用いて解析したところ、FilGAP は運動している細胞の側面と尾部に局在していることが明らかになった。以上から FilGAP は 2 次元環境下では、運動している細胞の葉状仮足の形成を細胞前部に限定させる機能があることが示唆された。

(2) 3D でのアメーバ様運動における FilGAP の機能解析

① ヒト乳がん細胞 MDA-MB-231 は、3 次元培養条件下(3D)で Bleb 型と間葉型の形態を混在して持っているが、FilGAP の発現を RNAi で欠失させると大部分の細胞が間葉型に変化した。

② Time-lapse 顕微鏡で細胞の動的挙動を観察したところ、FilGAP を欠失した細胞は一度間葉型の形態になるとアメーバ型の形態に戻ることができなくなることがわかった。

③ FilGAP の GAP ドメインを欠失した変異体 FilGAP を優性阻害剤として MDA 細胞に導入しても 3D で細胞形態が間葉型になることが確認できた。

④ 浸潤アッセイで 3D での運動能を測定したところ FilGAP を欠失した細胞は浸潤能が低下することがわかった。

以上から FilGAP は 3D で Bleb 型の運動に必要な因子であり、細胞は FilGAP 存在下でより高度の浸潤能を示すことが明らかになった。

(3) 3D でのアメーバ様運動における FilGAP の制御機構

① FilGAP は Rho の標的タンパク質である ROCK によりリン酸化されることで活性化される。このシグナル伝達系が 3D での Bleb 構造の形成に関与しているか検討した。活性化型 Rho および ROCK を MDA-MB-231 細胞で過剰発現させると、細胞は Bleb 構造を形成する。FilGAP の発現を RNAi で欠失させると細胞は葉状仮足を伸展させ、アメーバ型の形態をとらなくなった。

② FilGAP の ROCK によるリン酸化部位をアラニンに変異させた非リン酸化型 FilGAP 変異体は Bleb 構造を形成しないが、アスパラギン酸に変異させた疑似リン酸化型 FilGAP 変異体は ROCK 特異的阻害剤存在下でも Bleb 構造を形成することがわかった。

③ FilGAP が 3D で Bleb を誘導する細胞外刺激によって実際にリン酸化が亢進するか検討した。コラーゲンゲル上で培養した MDA 細胞に Rho 活性化因子である LPA (リソフォスファチジン酸) を添加すると細胞は一過性に Bleb を形成する。このとき細胞内 FilGAP のリン酸化も一過性に亢進することを免疫沈降法で確認した。

以上から FilGAP は Rho/ROCK シグナル伝達系で 3D での Bleb 構造の形成に関与していることが明らかになった。

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 1 件)

Saito, K., Ozawa, Y., Hibino, Y., & Ohta, Y. FilGAP, a Rho/Rho-associated protein kinase-regulated GTPase-activating protein for Rac, controls tumor cell migration. Mol. Biol. Cell 2012; 23: 4739-4750

[学会発表] (計 4 件)

① 椎野達夫、太田安隆 RapGAP 因子 FilGAP は Afadin と結合し、腎糸球体上皮細胞におけるアクチン細胞骨格形成を制御する。第 35 回日本分子生物学会年会 (2012 年 12 月 11-14 日、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡)

② 中村 遥、太田安隆 FilGAP と AGAP1 の相互作用による Rac1 シグナルと Arf1 シグナルのクロストーク。第 35 回日本分子生物学会年会 (2012 年 12 月 11-14 日、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡)

③ 森真美子、太田安隆 RacGAP 因子 ARHGAP22 は葉状仮足の形成と伸展を抑制する。第 35 回日本分子生物学会年会 (2012 年 12 月 11-14 日、福岡国際会議場、マリンメッセ福岡)

④ 山田葉月、太田安隆 チロシンリン酸化下流における FilGAP の機能解析。平成 23 年度第 25 回バイオサイエンスフォーラム (2012 年 8 月 4 日、北里大学白金キャンパス)

[その他]

ホームページ等

<http://www.kitasato-u.ac.jp/sci/resea/eibutsu/kino/Home.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

太田安隆 (OHTA YASUTAKA)

北里大学・理学部・教授

研究者番号：90192517

(2) 研究分担者

斉藤康二 (SATO KOJI)

北里大学・理学部・助教

研究者番号：70556901