

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24年 4月 4日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790279

研究課題名（和文）遊走細胞の前後軸形成を制御する分子機構

研究課題名（英文）Molecular mechanisms controlling a front-rear axis in motile cells

研究代表者

渡辺 崇 (WATANABE TAKASHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・特任講師

研究者番号：10402562

研究成果の概要（和文）：遊走細胞における前後軸形成を制御する分子機構の解明を目指した。遊走細胞前方では低分子量 GTP 結合蛋白質 Rac の活性が高く維持され、常に新しい接着が形成される。さらに活性化した Rac は細胞骨格蛋白質である微小管を前方で捕捉する。本研究では、Rac 活性化因子である Tiam1 が接着部位に濃縮し、遊走細胞前方での Rac の活性化を担うことを明らかにし、活性化した Rac が微小管のダイナミクスを制御する分子機構を解明した。

研究成果の概要（英文）：Major aims in this research are to reveal the molecular mechanisms governing a front-rear polarity in motile cells. Migrating cells acquire front-rear polarity along the directional axis, with signaling molecules, adhesions and the cytoskeleton distributed asymmetrically. At the front of migrating cells, they maintain the higher activity of small GTPase Rac and persistently form adhesion sites toward substratum. Activated Rac at the front then controls microtubule dynamics. This research demonstrates that Tiam1 accumulates at adhesion sites and is responsible for Rac activation at the front of motile. Furthermore, this research also shows the molecular mechanisms controlling microtubule dynamics downstream of Rac in a region-specific manner.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生化学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：細胞極性・細胞遊走・細胞内シグナル伝達・Rhoファミリー・細胞骨格

1. 研究開始当初の背景

生体を構成する種々の細胞は、それぞれ特徴的な極性を獲得し、固有の生理機能を担っている。遊走細胞がその顕著な例である。炎症細胞や線維芽細胞、内皮細胞などは細胞外マトリクスやケモカインなどの細胞外シグ

ナルに応答して遊走する。この過程で、細胞は外界シグナルの濃度勾配に対して細胞内に前後軸を形成し、極性を獲得している。前方ではアクチン細胞骨格を再構築してリーディングエッジを形成する。また、微小管はリーディングエッジ側で捕捉され、その方向

に再配向される。再配向された微小管を介して種々の蛋白質や小胞が前方もしくは後方に向かって選択的に輸送される。その結果、細胞内に非対称性が生じ、細胞の極性が形成される。形成された極性、すなわち前後軸を維持・修正することで細胞は特定の方向に遊走する。

低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho ファミリーは、様々な細胞外シグナルの下流で細胞骨格や接着、蛋白質および小胞輸送を制御することで、細胞の極性や遊走を調節している。遊走細胞内で Rho ファミリーの活性は非対称に分布しており、Rac1 や Cdc42 の活性はリーディングエッジでのみ高く、RhoA の活性は前方と後方の両方で高く維持されている。また、遊走細胞はリーディングエッジで細胞外マトリクスとの新たな接着を形成し、後方ではその接着を解離させる。細胞外マトリクスとの接着は主にインテグリンが担っており、インテグリンを介するシグナルは Rac1 を活性化する。さらに、活性化した Rac1 は細胞膜を伸展させる。すなわち、遊走細胞のリーディングエッジでは、インテグリンと Rac1 との間にポジティブフィードバック機構が存在し、遊走細胞の前後軸の維持に必須な役割を果たしている。しかしながら、どのようにしてインテグリンシグナルが局所的に Rac1 を活性化するのか、またそれが遊走細胞の前後軸形成および維持にどのように寄与しているのか判然としていなかった。

細胞が一定方向に遊走する際、微小管の先端は遊走方向の前方で捕捉される。+TIPs と総称される一群の微小管結合蛋白質は伸長する微小管の先端に濃縮し、そのダイナミクスを制御している。さらに、+TIPs は細胞内の特定部位と微小管を繋ぐメディエーターとして機能している。以前に我々は Rac/Cdc42 の標的蛋白質 IQGAP1 が +TIPs の一つ CLIP-170 と結合することで、微小管を捕捉することを提唱していた。その後、我々を含む国内外の研究者により、Rho ファミリーの標的蛋白質や脂質結合蛋白質など細胞表層に濃縮する蛋白質と +TIPs の相互作用が報告され、遊走細胞における微小管の捕捉機構がいくつか提唱されていた。しかしながら、遊走細胞における微小管ダイナミクスの制御機構や微小管捕捉機構は不明な点が多かった。

2. 研究の目的

本研究では線維芽細胞および上皮細胞の極性形成と遊走を制御するシグナル伝達機構を明らかにすることを目的とした。遊走細胞の前後軸形成とその維持に中心的な役割を担う可能性が高いインテグリンシグナル、特に Rho ファミリーへのシグナル伝達機構

に着目し、細胞極性形成、遊走における時空間的な Rho ファミリーの活性制御機構を明らかにしようと試みた。一方で、cell-free での再構成実験を主な実験手法とし、細胞表層におけるシグナル依存的な微小管ダイナミクスの制御機構と微小管の捕捉機構を明らかにすることを目的とした。これらの解析により、遊走細胞が前後軸を決定・維持する分子機構を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

遊走細胞における前後軸の形成をシグナル伝達に基づいて解析した。インテグリンシグナルによる遊走細胞の前後軸調節機構の解析においては、生化学的な解析やイメージングの易しさから、主に線維芽細胞と上皮細胞をモデルシステムとした。インテグリンからのシグナル伝達を担う主要分子の新規結合蛋白質を LC-MS/MS によるプロテオミクスアプローチにより同定し、その性状解析を行った。一方、微小管のダイナミクスおよび捕捉機構の解析においては精製蛋白質での再構成実験 (in vitro) を主たる研究方法とした。これらの解析により、遊走細胞におけるシグナル依存的な前後軸形成およびその調節機構を解明することを試みた。

インテグリンシグナルによる前後軸調節機構の解明

タリンなどインテグリンの細胞内ドメインに結合する主要分子に着目し、アフィニティーカラムクロマトグラフィーと、ショットガン法による LC-MS/MS を用いて相互作用分子を網羅的に同定し (下図参照)、インテグリンシグナルから Rac1 の活性化を引き起こすシグナル伝達機構の解明を目指した。

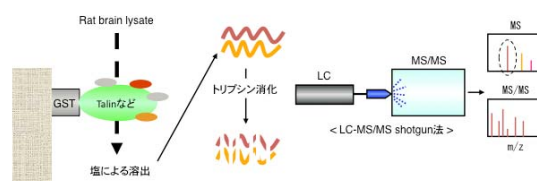


図 LC-MS/MS ショットガン法による結合蛋白質の同定 ラット脳抽出物と精製蛋白質を用いてアフィニティーカラムクロマトグラフィーを行い (左図)、塩で溶出する。溶出サンプルをトリプシン消化により切断後、LC-MS/MS によって結合蛋白質を網羅的に同定する。

再構成実験による微小管捕捉機構の解明

本研究では精製蛋白質を用いた in vitro 再構成実験を主な手法とした。微小管ダイナミクスを解析する目的では、安定化した微小管の種をガラス表面にビオチンを介して固相化し、溶液中に蛍光ラベルした tubulin や

精製+TIPsを加え、全反射顕微鏡を用いて観察することで、微小管や+TIPsのダイナミクスを解析した（下図参照）。

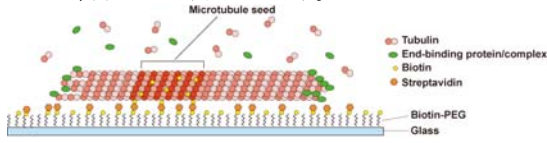


図 微小管ダイナミクスの解析に使用した実験系

微小管の捕捉機構を *in vitro* 再構成実験にて検証する際には、蛋白質を固相化することのできる微小チャンバーを用いた。チャンバー側壁にストレプトアビジンを固相化し、ビオチン化 IQGAP1 を側壁に塗布することで、仮想細胞膜を作製した。さらに、チャンバー内で蛍光ラベルした精製 CLIP-170 とチューブリンを加えて微小管を重合させる。微小管が側壁まで重合した際に IQGAP1 と相互作用すると考えられ（下図参照）、側壁に衝突した微小管のダイナミクスを測定・検証することで、IQGAP1 による微小管捕捉機構を検討した。

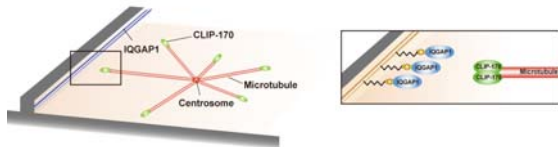


図 IQGAP1 をチャンバー側壁に塗布し、centrosome から重合した微小管・+TIPs が側壁に衝突する際のダイナミクスを解析した。

4. 研究成果

インテグリンのシグナル伝達に中心的な役割を担うタリンのアフィニティーカラムクロマトグラフィーを行い、その結合蛋白質を LC-MS/MS により網羅的に同定した。候補蛋白質として Rac 活性化因子で、極性形成への関与が示唆されていた Tiam1 が得られ、以後この分子に着目して研究を遂行した。タリンと Tiam1 の結合を免疫沈降法で検討したところ両者の共沈降が認められ、実際生体内でも両者は複合体を形成していることが示唆された。さらに、タリンと Tiam1 の精製蛋白質を用いた結合実験により、直接結合することも明らかとなった。

遊走細胞内でタリンは、インテグリンと細胞外基質の接着部位であるフォーカルアドヒージョンに濃縮する。Tiam1 の細胞内局在を検討したところ、タリンと同様にフォーカルアドヒージョン部位に濃縮し、一部タリンと共局在した（下図参照）。また、この Tiam1 はタリンと直接結合することで、フォーカルアドヒージョンへの濃縮することを見出した。フォーカルアドヒージョンへの濃縮分布

を詳細に検討したところ、タリンの局在は遊走細胞内で一様にフォーカルアドヒージョンに濃縮したのに対し、Tiam1 は遊走方向前方の比較的大きなフォーカルアドヒージョンに有意に濃縮した。

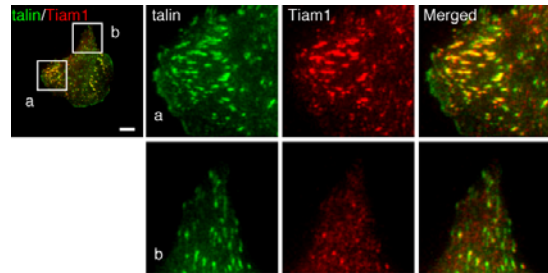


図 遊走細胞におけるタリン（緑）と Tiam1（赤）の局在

タリンと Tiam1 のインテグリンシグナルにおける役割を解析する目的で、RNAi により両者の発現を抑制し、接着依存的な Rac の活性を測定した。その結果、タリンと Tiam1 をノックダウンした細胞では、Rac の活性化が減弱することを見出した。また、コントロール細胞群では接着後経時的に細胞面積や細胞周長が増加するのに対し、タリンあるいは Tiam1 をノックダウンした細胞群ではこの増加が抑制されることも見出した。ノックダウン細胞群に見られた細胞形態の異常はそれぞれの野生型を発現することによりレスキューされが、Tiam1 結合能を欠いたタリンではレスキューされなかった。さらに、タリンあるいは Tiam1 をノックダウンすると、フォーカルアドヒージョンの形成と解離が遅延すること、細胞遊走が抑制されることも明らかになった。これらのことから、Tiam1 はタリンと結合することで遊走細胞前方のフォーカルアドヒージョンに濃縮し、インテグリンシグナルの下流で Rac を活性化することで、細胞遊走に関与していることが示唆された（下図参照）。

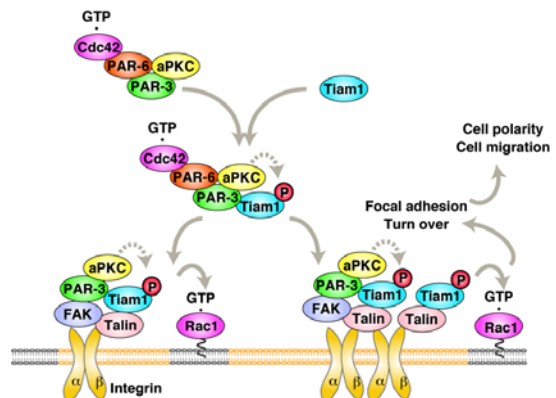


図 フォーカルアドヒージョン部位におけるタリン/Tiam1 複合体の作用モデル

Rac 活性化因子 Tiam1 は、別の極性制御因子 PAR 複合体 (PAR6, PAR3, aPKC) と協調して極性を制御することが示唆されつつある。そこで、Tiam1 のふおーかるアドヒージョンへの濃縮に PAR 複合体が関与するか否か検討した。細胞を aPKC の阻害剤で処理すると、フォーカルアドヒージョンでの Tiam1 が減弱した。同様の効果が aPKC をノックダウンすると認められることから、aPKC が Tiam1 のフォーカルアドヒージョンに必要であることが考えられた。さらに、精製蛋白質を用いた *in vitro* リン酸化アッセイにより、aPKC が直接 Tiam1 をリン酸化することを見出した。主要なリン酸化残基は Tiam1 の N 末端に位置した。一方で、Tiam1 の N 末端は分子内のドメインと相互作用することで、Tiam1 の活性を抑制していることも見出した。これらのことから、aPKC は Tiam1 の N 末端をリン酸化することで、Tiam1 の構造変化を調節し、フォーカルアドヒージョンへの濃縮を制御することで、遊走細胞内の局所的な Rac の活性化や極性形成を担っていることが示唆された。

微小管捕捉とダイナミクスを *in vitro* で再構成することを試み、遊走細胞における制御機構を検討した。始めに、代表的な +TIPs (EB1, EB3, CLIP-170, CLASP2) を大腸菌、あるいは昆虫細胞から高純度で精製し、cell-free での end-tracking (伸長する微小管先端に濃縮すること) を試みた。これら +TIPs は mGFP (単量体緑色蛍光蛋白質) との融合蛋白質としても調製し、そのダイナミクスの観察を可能とした。その結果、EB1 や EB3 は他の +TIPs の非存在下、すなわち自立的に end-tracking したのに対し、CLIP-170 や CLASP2 は EB1 あるいは EB3 存在下でのみ end-tracking した。また、CLIP-170 や CLASP2 の微小管への局在は EBs (EB1 や EB3) に依存しなかった。これらのことから、EBs は他の +TIPs を微小管先端にリクルートする主要制御因子であることが考えられた。次に CLIP-170 のリン酸化に着目して、CLIP-170 の挙動を与える因子のスクリーニングを行った。各種阻害剤やキナーゼの RNAi などの方法で、CLIP-170 をリン酸化する酵素として AMPK や Plk1 を同定した。上記 *in vitro* 再構成系において、AMPK による CLIP-170 のリン酸化の意義を検討したところ、AMPK によってリン酸化された CLIP-170 はその end-tracking 能や微小管結合能が減弱することが明らかとなった (下図参照)。

また、この CLIP-170 のリン酸化は、微小管構成成分であるチューブリンと CLIP-170 の結合を特異的に抑制し、EBs と CLIP-170 の結合には影響しないことを見出した。さらに、遊走細胞内で AMPK による CLIP-170 のリン酸化の意義を検討した。CLIP-170 や AMPK を

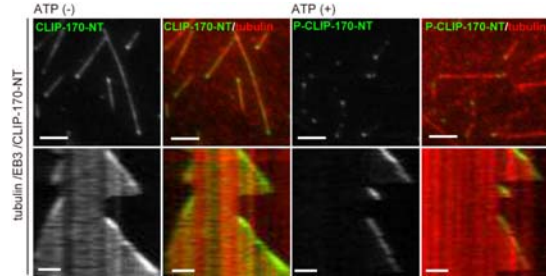


図 AMPK による CLIP-170 リン酸化の影響上のパネルは静止画像、下のパネルはそれぞれのキモグラフを示している。緑は CLIP-170、赤は微小管。ATP(+) のパネルにおいて CLIP-170 がリン酸化されている。

RNAi によってノックダウンすると、細胞の極性化や遊走が抑制されることが明らかとなった。また、この効果は野生型の CLIP-170 や AMPK を発現させるとレスキューされたが、CLIP-170 のリン酸化サイトをアラニンに置換した変異体 (リン酸化されない変異体) やアスパラギン酸に置換した変異体 (リン酸化を模倣する変異体) を発現させてもレスキューされなかった。これらのことから、CLIP-170 のリン酸化、脱リン酸化のサイクルが遊走細胞の極性形成や遊走に重要な役割を担っていることが示唆された。

微小管捕捉機構を *in vitro* で検証する目的で、微小チャンバー側壁に IQGAP1 を塗布し、衝突する微小管のダイナミクスを解析した。チャンバー内には蛍光ラベルしたチューブリン、CLIP-170、CLIP-170 の end-tracking に必要な EB3 を加えた。その結果、コントロールの壁では CLIP-170 の蛍光シグナルが衝突後、すぐに消えるのに対し、IQGAP1 を塗布した壁では CLIP-170 が壁に沿って進む様子を捉えた。この結果は、IQGAP1 が微小管の退縮を抑制し、微小管をガイドする可能性が考えられた (下図参照)。

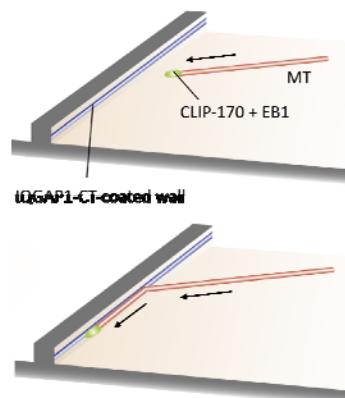


図 IQGAP1 の微小管への作用モデル

さらに、細胞内では IQGAP1 は遊走細胞前方でアクチンフィラメントに固相化されているため、そこで CLIP-170 を相互作用するこ

とで微小管をガイドすることが示唆された。

以上の研究成果により、遊走細胞における Rac の非対称な活性化パターンを制御する分子機構を明らかにした。さらに、Rac 標的蛋白質 IQGAP1 による微小管捕捉機構を in vitro で再構成し、その分子機構の解明が進んだ。

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4件)

① Takeda S, Fujimoto A, Yamauchi E, Hiyoshi M, Kido H, Watanabe T, Kaibuchi K, Ohta T, Konishi H. Role of a tyrosine phosphorylation of SMG-9 in binding of SMG-9 to IQGAP and the NMD complex. *Biochem Biophys Res Commun* 査読有, 410, 2011, 29-33

② Sato K, Watanabe T, Wang S, Kakeno M, Matsuzawa K, Matsui T, Yokoi K, Murase K, Sugiyama I, Ozawa M, Kaibuchi K. Numb controls E-cadherin endocytosis through p120 catenin with aPKC. *Mol Biol Cell* 査読有, 22, 2011, 3103-3119

③ Li W, Miki T, Watanabe T, Kakeno M, Sugiyama I, Kaibuchi K, Goshima G. EB1 promotes microtubule dynamics by recruiting Sentin in Drosophila cells. *J Cell Biol* 査読有, 193, 2011, 973-983

④ Nakano A, Kato H, Watanabe T, Min KD, Yamazaki S, Asano Y, Seguchi O, Higo S, Shintani Y, Asanuma H, Asakura M, Minamino T., Kaibuchi K, Mochizuki N, Kitakaze M, Takashima S. AMPK controls the speed of microtubule polymerization and directional cell migration through CLIP-170 phosphorylation. *Nat Cell Biol* 査読有, 12, 2010, 583-590

[学会発表] (計6件)

① Watanabe T. et al. Phosphorylation of +TIPs during cell migration. 2011 American Society for Cell Biology annual meeting. 2011.12.3. US, CO, Denver, Convention Center

② Watanabe T. et al. Tiam1 acts with the PAR complex to control talin-mediated Rac1 activation during polarized cell migration. 第63回日本細胞生物学会大会. 2011.6.29. 北海道, 札幌市, 北海道大学

③ Watanabe T. et al. Tiam1 acts with the PAR complex to control talin-mediated Rac1 activation during polarized cell migration. Gordon Research Conference, Gradient Sensing & Directional Cell Migration. 2011.6.8-9. Switzerland, Les Diablerets, Les Diablerets Conference Center

④ Watanabe T. et al. Numb controls E-cadherin endocytosis acting through p120catenin with aPKC. 50th annual meeting for American Society for Cell Biology. 2010.12.12. US, PA, Philadelphia, Convention Center

⑤ Watanabe T. et al. Numb controls E-cadherin endocytosis acting through p120catenin with aPKC. Gordon Research Conference, Signals By Adhesion Receptors. 2010.7.15. US, ME, Waterville, Colby College

⑥ Watanabe T. et al. In vitro reconstitution of microtubule dynamics at cell cortex in migrating cells. EMBO conference series. Microtubule-structure, regulation, and functions. 2010.6.3. Germany, Heidelberg, EMBL

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 崇 (WATANABE TAKASHI)

名古屋大学・医学系研究科・特任講師

研究者番号: 10402562

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし