

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：	14101
研究種目：	若手研究（B）
研究期間：	2011～2012
課題番号：	23790247
研究課題名（和文）	低分子量Gタンパク質Rac1による遊走細胞の運動方向制御機構の解明
研究課題名（英文）	Regulatory mechanism of administrating directional migration in motile cells by small GTPases family Rac1
研究代表者	
	王 淑杰 (WANG SHUJIE)
	三重大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：	90567926

研究成果の概要（和文）：

遊走細胞における低分子量G蛋白質Rac1による運動方向の制御機構の解明を目指した。低分子量G蛋白質Rac1は遊走細胞の進行先端部のフォーカルアドヒージョンの形成を維持し、さらに、Rac1はフォーカルアドヒージョンで、PAR3およびRac1活性化因子であるTiam1と複合体を形成し、細胞遊走を制御する。本研究では、Tiam1がインテグリンの足場タンパク質Talinと直接結合して、遊走細胞の先端部の接着部位によく濃縮し、PAR複合体との相互作用によって、接着部位のターンオーバーとRac1の活性化を制御することを解明した。

研究成果の概要（英文）：

Major purposes in this research are to reveal the regulatory mechanisms administrating a directional migration in motile cells. At the front of migrating cells, the higher activity of small GTPase Rac1 control the formation of focal adhesions and maintain adhesion sites toward substratum. Furthermore, Tiam1, the GDP/GTP exchange factor for Rac1, participates in polarized cell migration with the PAR complex of PAR3, PAR6, and atypical protein kinase C (aPKC) at adhesion sites. This research shows that Tiam1 interacts directly with talin, which binds and activates integrins to mediate their signaling, and also demonstrates that Tiam1 accumulates at adhesion sites in a dependent on talin and the PAR complex. Furthermore, this research also demonstrates the regulatory mechanisms controlling Rac1 activation and adhesion turnover for the polarized cell migration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・生理学一般

キーワード：細胞運動・形態形成・細胞間相互作用

1. 研究開始当初の背景

細胞の遊走は、発生過程における形態形成、創傷治癒、ガン転移・浸潤などにおいて見ら

れる普遍的な現象であり、生体内で重要な役割を果たしている。細胞が遊走する際には、

細胞内外のシグナルに応じて、運動方向軸に対して、進行先端部と後端部の間で、細胞骨格をはじめ細胞内小器官、多様な蛋白質を不均一、非対称に配置され、極性を獲得する。この細胞極性は、細胞の一方向性移動を維持し、細胞が臓器や組織内でその特異的な生理機能を発揮するために必須であることが知られている。

最近、申請者を含むいくつかのグループにより、低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho ファミリー Rac1 と Cdc42 が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、細胞の極性形成、細胞運動、細胞接着に重要な役割を果たしていることが報告されている。Rho ファミリーは、活性型 GTP 結合型と不活性型 GDP 結合型とを cycle することにより、細胞内で molecular switch として機能している。活性型 Rho family はその特異的な標的蛋白質を介して、細胞骨格の再構築、細胞内小胞輸送、遺伝子発現など多彩な生理機能を制御している。さらに、遊走細胞内で Rho ファミリーの活性は非対称に分布し、Rac1 や Cdc42 の活性は進行先端部である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、Rac1 と Cdc42 が遊走細胞の進行先端部のフォーカルアドヒージョンの形成維持し、RhoA が後端部でのフォーカルアドヒージョンの解離に重要な機能をしていることが報告されてきた。しかし、いかなる機序で、進行先端部のフォーカルアドヒージョンで、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、また活性化した Rac1 はどうやって遊走細胞の極性を維持しているかなど、接着分子との関係を含めて極性形成の分子メカニズムは不明な点が多かった。

2. 研究の目的

組織内で細胞はその特異的な機能を担うために、極性を獲得し、特徴的な形態を呈している。また、細胞が細胞外のシグナルに応答して、その極性や形態をダイナミックに変化させることが個体や組織の形成・維持に必須である。さらに、極性や形態形成がさまざまな疾患に関与することから、その制御機構を解明することは病気の治療法を確立する上で必須であることが分かっている。

本研究では遊走細胞における極性形成の分子メカニズムを解明することを最終目標として、低分子量 GTP 結合タンパク質 Rac1 活性化因子 Tiam1 と Talin の遊走細胞の極性形成におけるメカニズムを明らかにする。具体的には、いつ、どこで、どのようにして細胞膜近傍における、低分子量 GTP 結合タンパク質 Rac1 を活性化させるのか、その結果、どのようにして細胞極性を形成していくのかを細胞の遊走方向とフォーカルアドヒージョンとの関係に着目して、明らかにしていく。

3. 研究の方法

低分子量 GTP 結合蛋白質 Rho ファミリーは、細胞膜近傍で活性化され、そこで標的蛋白質と相互作用することで生理機能を発揮すると考えられている。Rac1 の主要な活性化因子（グアニンヌクレオチド交換因子；GEF）である Tiam1 に着目し、精製 Tiam1 蛋白質を用いたアフィニティーカラムクロマトグラフィーによりラット脳抽出液から Tiam1 の結合蛋白質を粗精製した。この粗精製サンプルを LC-MSMS により解析することで、Tiam1 結合蛋白質を高感度かつ網羅的に同定した（図 1 参照）。

得られた結合候補蛋白質との相互作用を確認する目的で、免疫沈降実験、精製蛋白質

を用いた結合実験、表面プラズモン共鳴を利用した分子間の相互作用解析を行った。培養細胞を用いた免疫染色により結合蛋白質と Tiam1 との細胞内局在の検討を行った。また、RNAi (RNA interference)により Tiam1 や結合蛋白質の発現量を抑制し、それら分子の細胞内における機能、特に Rac1 の活性化能を検討した。さらに、RNAi に反応しない変異体を作製し、RNAi による効果がレスキューされるかどうか検討することで、RNAi の off-target の可能性を排除した。一方で、Tiam1 に結合せず、かつ RNAi に反応しない変異体を用いて Tiam1 と得られた結合蛋白質が結合する生理的意味を検討した。細胞極性形成や形態形成への関与を示す目的で、培養細胞の細胞外シグナル依存的な極性化、遊走機能を解析した。

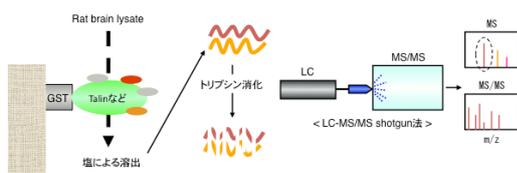


図1 LC-MS/MS ショットガン法による結合蛋白質の同定 ラット脳抽出物と精製蛋白質を用いてアフィニティークラムクロマトグラフィーを行い(左図)、塩で溶出する。溶出サンプルをトリプシン消化により切断後、LC-MS/MS によって結合蛋白質を網羅的に同定する。

4. 研究成果

Rac1 活性化因子 Tiam1 の結合蛋白質として Talin を同定した。Talin は細胞外マトリクスの主要なレセプターである integrin の裏打ち蛋白質であり、integrin シグナルに極めて重要な機能を担っている。Talin と Tiam1 の結合を *in vitro* や *in vivo* で解析したところ両者は直接結合した。遊走する細胞(グリオーマ)を用いて免疫染色を行ったところ、Tiam1 や Talin は共に focal adhesion と呼ばれる細胞の足場に濃縮した。興味深いことに、

Talin は遊走細胞のほぼ全ての focal adhesion に濃縮する一方で、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2)

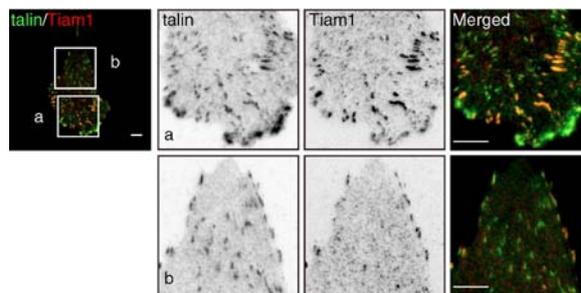


図2 遊走細胞における Talin (緑) と Tiam1 (赤) の局在

さらに、遊走細胞の進行方向前方 focal adhesion と細胞体中心あるいは後方の focal adhesion の超微細形態学的な差異が電子顕微鏡を用いて明らかにするとともに、Tiam1 の局在を免疫電顕により明らかにした。(図3)

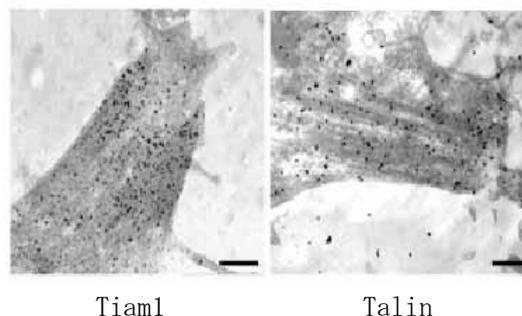


図3 免疫電顕による Tiam1 と Talin の局在。Tiam1、Talin ともにフォーカルアドヒージョン近傍のアクチン線維束の上に局在している。

Talin と Tiam1 のインテグリンシグナルにおける役割を解析するために、RNAi により両者の発現を抑制し、接着依存的な Rac1 の活性を測定した。その結果、Talin と Tiam1 をノックダウンした細胞では、Rac1 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、Talin 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 Talin ではレスキューされなかった。さらに、Talin や Tiam1 の細胞遊走とフォーカルアドヒージョンのターンオーバーにおける機能を検討し、Talin 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 Talin 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 Rac1 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。

Rac 活性化因子 Tiam1 は、別の極性制御因子である 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 のフォーカル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、Tiam1 のフォーカルアドヒージョンでの濃縮が半分まで減弱したことに對して、Talin の濃縮は顕著な変化が見られなかった。また、PAR 複合体をノックダウンすると周辺部フォーカルアドヒージョンの変化は僅かであるのに対して、内側のフォーカルアドヒージョンが減弱し、さらには Rac1 の活性化が減弱することも見出した。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 PAR3 ではレスキューされなかった。aPKC をノックダウンすると Tiam1 のフォーカルアドヒージョンへの濃縮が認められないことから、aPKC が Tiam1 のフォーカルアドヒージョンへの濃縮

に必要であることも考えられた。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。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し、遊走細胞内の局所的な Rac1 の活性化や極性形成を担っていることが示唆された。

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 4 件)

① Tiam1 interaction with the PAR complex promotes talin-mediated Rac1 activation during polarized cell migration. Wang S, Watanabe T, Matsuzawa K, Katsumi A, Kakeno M, Matsui T, Ye F, Sato K, Murase K, Sugiyama I, Kimura K, Mizoguchi A, Ginsberg MH, Collard JG, Kaibuchi K. *J. Cell Biol.* 2012 199(2):331-345 査読有

② Distinct distribution and localization of Rho-kinase in mouse epithelial, muscle and neural tissues. Iizuka M, Kimura K, Wang S, Kato K, Amano M, Kaibuchi K, Mizoguchi A. *Cell Struct Funct.* 2012 Sep 15. 査読有

③ The inositol 5-phosphatase SHIP2 is an effector of RhoA and is involved in cell polarity and migration. Kato K, Yazawa T, Taki K, Mori K, Wang S, Nishioka T, Hamaguchi T, Itoh T, Takenawa T, Kataoka C, Matsuura Y, Amano M, Murohara T, Kaibuchi

K. *Mol Biol Cell*. 2012 Jul;23(13):2593-604.
査読有

④ Numb controls E-cadherin endocytosis through p120 catenin with aPKC. Sato K, Watanabe T, Wang S, Kakeno M, Matsuzawa K, Matsui T, Yokoi K, Murase K, Sugiyama I, Ozawa M, Kaibuchi K. *Mol Biol Cell*. 2011 Sep;22(17):3103-19. 査読有

[学会発表] (計2件)

①渡辺 崇、王 淑杰、松沢 健司、佐藤 和秀、掛布 真愛、松井 利憲、貝淵 弘三
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

② Watanabe T, Wang S, Matsuzawa K, Sato K, Kakeno M, Matsui T, Kaibuchi K.
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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

王 淑杰 (WANG SHUJIE)

三重大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号： 90567926