

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 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790335

研究課題名（和文）Rac1 活性の振動による膜突起動態の制御

研究課題名（英文）Regulation of lamellipodial dynamics by oscillation of Rac1 activity

研究代表者

山崎 大輔 (YAMAZAKI DAISUKE)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：50422415

研究成果の概要（和文）：運動する細胞先端で認められる膜突起構造ラメリポディアの形成には低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリー Rac が中心的な役割を担っていることが知られているが、その調節機構については不明な点が多い。本研究では srGAP1 がラメリポディアにおける Rac 活性の調節を介して膜突起の動態を制御していることを明らかにした。細胞が効率的に運動するためには、srGAP1 により膜突起における Rac 活性が適切に調節されることが重要である。

研究成果の概要（英文）：It has been reported that Rac, one of Rho-family small GTPase, plays an important role in formation of lamellipodia. However, the regulatory mechanism of Rac activity remains unknown. In this study, it becomes clear that srGAP1 regulates lamellipodial dynamics through the control of Rac activity. The proper control of Rac activity at lamellipodia is important for efficient 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	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞内情報伝達

1. 研究開始当初の背景

細胞辺縁部で観察されるシート状の膜突起構造はラメリポディアや膜ラッフルとよばれ、運動先端における進行方向の決定や運動の駆動力の発生、細胞間接着部位における接着構造の維持など様々な場面で利用されている。発生期における形態形成の過程では、膜突起構造の形成を介して細胞の移動や細胞間接着の構造が厳密に制御されており、その制御機構の破綻は癌の進行につながっている。例えば、ヒト癌細胞では膜突起の過剰に形成されることにより運動能が亢進することや、逆に突起が減少することにより細胞間接着構造が弱体化し浸潤性が増すことが報告されている。したがって膜突起構造の制御機構を解明することは正常組織における

形態形成や癌の病態を理解するうえで非常に重要な課題である。

シート状の膜突起形成部位では、膜が持続的に伸展するのではなく伸展と停滞が周期的に繰り返されている。まずアクチン線維に押し出されて膜が伸展し、次いでアクチン線維が細胞後方へと引き戻されることで伸展が止まり、そのときに膜の先端と基質の間に接着構造が形成される。周期性が失われると突起は接着できずめくれあがって消失することからその重要性は明らかであるが、周期性を制御する分子機構は不明である。しかし生物には概日リズムに代表されるように周期性を制御する機構が備わっており、膜突起動態の周期性を制御する機構の存在が予想される。

2. 研究の目的

膜突起形成の過程はヒトが歩く動作に似ている。ヒトが二足歩行する場合、一方の足を地面に着けもう一方の足を前方へ踏み出し、踏み出した足が地面に着くとまたもう一方の足を踏み出す。膜突起では、前方への足の踏み出しは膜の伸展に、地面との接触は基質との接着に相当する。歩く速度はヒトによって異なるが、その違いは歩幅、足を踏み出す速度、次の踏み出しを行うまでの間隔により生み出される。膜突起の場合、歩幅は膜が一回の周期で伸展する距離、踏み出す速度は膜の伸展する速度、踏み出しまでの間隔は膜が停滞している時間ということになる。したがって膜動態の周期性を制御する機構を明らかにすることができれば、安定性だけでなく形成速度や持続時間といった膜突起動態全体を規定するパラメータを制御する仕組みが明らかになる。

周期性は何らかのシグナルの強弱が振動することにより生み出されている可能性があるが、最近膜突起の先端で Rho ファミリー低分子量 G タンパク質のひとつ Rac1 の活性が膜突起の動態に合わせて周期的に変化していることが報告された。Rac1 は膜突起先端でのアクチン細胞骨格の再編成を制御しているので、その活性を調節すれば膜伸展を制御できると考えられる。そこで本研究では Rac1 活性の振動による膜突起動態の周期性制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) srGAP1 による Rac1 活性調節の分子機構の解明

膜突起形成時に srGAP1 の GAP 活性を調節する分子機構の同定を行う。srGAP1 が持つ GAP 活性の調節は、①分子内もしくは分子間の相互作用と②膜突起構造への局在の二つのレベルで制御されている可能性が考えられる。

①分子内もしくは分子間の相互作用による GAP 活性調節機構の解明

srGAP1 は N 末端側から F-BAR、FX、RhoGAP、SH3 の四つの機能ドメインと C 末端の機能未知の領域から構成されている。これらのドメインはそれぞれ異なる分子と相互作用するので、それらが GAP 活性に及ぼす影響を検討する。

F-BAR および FX は酸性リン脂質に結合するドメイン構造であり、突起形成時に細胞膜上で起こるイノシトール脂質の量的な変化や膜に生じる曲率を認識することが知られている。srGAP1 の F-BAR および FX も同様の性質をもっているのか、またそうした脂質との結合が GAP 活性に影響を与えるのかを、組換えタンパク質を用いた *in vitro* の実験系で検討する。また F-BAR と類似の構造をとる BAR

ドメインや I-BAR ドメインに低分子量 G タンパク質が結合することから、srGAP1 の F-BAR ドメインに結合する低分子量 G タンパク質を検索したところ、Rac1 や RhoA が結合することが分かった。GAP 活性がそうした結合により変化するのか *in vitro* の実験系で検討する。

srGAP1 の SH3 ドメインに結合するタンパク質をプロテオミクスの手法を用いて同定したところ、WAVE を含めた WAVE 複合体の各コンポーネントやラメリポディン、mDia1 など膜突起形成に関連した分子が結合することが明らかになった。こうした分子との結合が srGAP1 の活性に与える影響を *in vitro* の実験系を用いて検討する。

分子内のドメイン間の相互作用を調べたところ、C 末端領域は RhoGAP および SH3 ドメインに結合することが明らかになった。こうした分子内相互作用が GAP 活性に及ぼす影響を各ドメインが欠損した変異体を用いて *in vitro* の実験系により検討する。

②膜突起構造への局在の制御機構の解明
突起形成時に Rac1 は細胞膜上で活性化されているが、srGAP1 は通常細胞質に局在するので Rac1 の活性を調節するためには細胞膜まで運ばれる必要がある。したがって Rac1 の活性は srGAP1 が膜突起部位へ移行するタイミングにより制御されている可能性がある。srGAP1 には突起構造に存在する分子と結合するドメイン構造が複数存在するので、それらのドメイン構造を欠損した変異体を作製し突起構造への局在に必要な領域を同定する。また srGAP1 の膜への局在と Rac1 活性の変化そして膜突起の動態の三者の関係をライブイメージングにより検討する。

(2) 膜突起形成における Rac1 の周期的変化の役割の解析

srGAP1 が Rac1 活性の周期的な変化に関与しているのかどうか、その発現量を増減させたときに Rac1 活性を測定することで確認する。同時にそのときの膜突起動態を検討し、Rac1 活性と膜突起動態の関係を検討する。また RNA 干渉とレスキュー実験を組み合わせることで srGAP1 の活性調節の詳細を検討する。

①ライブイメージング

遺伝子の異所発現および RNA 干渉法により srGAP1 の発現量を増減させた細胞を用意し、膜突起形成時に Rac1 活性が変化の様子を、FRET 法を利用してリアルタイムで観察する。また同時にそのときの膜突起の動態を観察しその周期性がどのように変化するか検討する。

②RNA 干渉およびレスキュー実験

srGAP1 が膜突起に与える影響がその GAP 活性によるものであるかどうか確かめるため、RNA 干渉法により srGAP1 の発現を抑制した細

胞に GAP 活性を消失させた srGAP1 を発現させ機能回復が認められるかどうかを確認する。また srGAP1 は複数の機能ドメインから構成されているので、それらを欠いた srGAP1 についても同様の解析を行い膜突起制御に必要な領域を同定することで、GAP 活性の詳細な分子機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) srGAP1 は Rac 活性の調節を介して膜突起の動態を制御している。

膜突起が発達し高い運動能を有する HT1080 細胞を用いて、膜突起形成における srGAP1 の役割を検討した。内在性の srGAP1 の細胞内局在を調べたところ、srGAP1 は膜突起の先端に局在していることが明らかになった。そこで次に srGAP1 の発現を RNAi 干渉法により抑制し、膜突起の形態や動態を検討した。HT1080 細胞で観察される膜突起は進展とめくれ上がりを周期的に繰り返す膜ラッフルであるが、srGAP1 の発現を抑制した細胞では突起がめくれ上がる頻度が減少し膜ラッフルがラメリポディアへと変化した。これらの細胞において srGAP1 を再度発現させたところラメリポディアは再び膜ラッフルへと戻る。しかし GAP 活性を持たない srGAP1 を発現させた場合にはこうした膜突起の変化は認められず、ラメリポディアのままであった。このことから srGAP1 は GAP 活性を介して膜突起の動態を制御する分子であることが示唆された。

そこで srGAP1 がもつ GAP 活性の特異性を検討したところ *in vitro* および *in vivo* のいずれの実験系においても srGAP1 は Rac に対する GAP 活性を有することが明らかになった。細胞内の Rac 活性を FRET 法により検討したところ、srGAP1 の発現を抑制した細胞においてはコントロールの細胞と比較して膜突起部位での Rac 活性が亢進していた。これらの結果から srGAP1 による Rac 活性の調節が膜突起の動態制御に重要であることが示唆された。

(2) srGAP1 は Rac 活性依存的に細胞膜へと運ばれる。

srGAP1 による Rac 活性調節の分子機構を知るため、srGAP1 の膜突起先端への局在機構を検討することにした。srGAP1 がもつ複数の機能ドメインを欠損させた変異体を作製し、Rac の恒常活性化変異体と同時に発現させることで srGAP1 の膜突起先端への局在に必要な部位の検討を行った。その結果、srGAP1 の細胞膜への局在には N 末端側に存在する F-BAR-FX ユニットが必要であることが明らかになった。F-BAR-FX ユニットによる細胞膜への局在の分子機構を調べるため、srGAP1 の F-BAR-FX ユニットを組換え蛋白質として発

現させ精製した。重要なことに srGAP1 の F-BAR-FX ユニットは膜脂質と相互作用するだけでなく、活性化型の Rac と結合することが分かった。そこで細胞内の Rac 活性を変化させ、srGAP1 の全長および F-BAR-FX ユニットの細胞膜への局在性を検討したところ、これらの分子の細胞膜への局在は Rac 活性に依存して強くなることが明らかになった。これらの結果から srGAP1 は F-BAR-FX ユニットを介して Rac 活性依存的に細胞膜へと運ばれ膜脂質と相互作用すると考えられる。srGAP1 が Rac に対する GAP 活性を持つことを考え合わせると、以下のモデルが考えられる。srGAP1 は Rac が活性化されると細胞膜へと運ばれる。細胞膜では自身がもつ GAP 活性により膜近傍の Rac 活性を減少させる。Rac 活性の低下に伴い srGAP1 は再び細胞質へと戻る。このように srGAP1 と Rac がネガティブフィードバックを形成することで、膜突起の Rac 活性が過剰に増加しないよう調節していると考えられる。

(3) srGAP1 による Rac と Rho のバランスの調節が膜突起動態の制御に重要である。

srGAP1 による Rac 活性の調節がどのような機構で膜突起動態の制御へとつながるのかを明らかにするため、Rac と Rho の活性が互いに拮抗することに注目した。コントロール細胞では膜突起部位において Rho が活性化している様子が観察されるが、srGAP1 の発現を抑制した細胞では、膜突起部位にける Rho 活性が減弱していることが明らかになった。これは Rac が過剰に活性化されたことにより Rho の活性が低下したのだと考えられる。

Rho はその下流のエフェクター分子 ROCK を介して II 型ミオシンをリン酸化する。リン酸化されたミオシンはアクチン線維と相互作用することにより収縮力を発生させる。コントロールの細胞では膜突起部位で収縮力の発生を示す II 型ミオシンのリン酸化およびミオシンとアクチン線維の共局在が観察された。しかし srGAP1 の発現を抑制した細胞では膜突起部位において II 型ミオシンのリン酸化やアクチンとミオシンが共局在する様子は認められなかった。このことから srGAP1 の発現を抑制した細胞では膜突起部位における収縮力の発生が低下していることが示唆された。

そこで次に膜突起部位における収縮力の発生がもつ意味を検討するため、ROCK および II 型ミオシンの阻害剤をそれぞれ細胞に作用させ膜突起の動態を観察した。いずれの阻害剤を作用させた細胞においても、srGAP1 の発現を抑制した細胞と同様に膜突起のめくれ上がりが減少し膜ラッフルからラメリポディアへと動態が変化した。以上の結果から Rho/ROCK シグナルによる II 型ミオシンのリ

ン酸化を介した収縮力の発生が膜突起の動態制御に重要であることが示唆される。srGAP1 の発現を抑制した細胞では、Rho の活性が低下することで ROCK を介した II 型ミオシンのリン酸化が起こらず、その結果膜突起部位で収縮力の発生が起こらず突起の動態が変化したと考えられる。

(4) srGAP1 は膜突起動態の調節を介して細胞運動の方向性を制御している。

srGAP1 による膜突起動態の制御がもつ生理的意義を明らかにするため、srGAP1 の発現を抑制した細胞を用いて細胞運動を検討した。HT1080 細胞をコラーゲンコートしたガラスの上に播種すると、個々の細胞は頻繁に運動する方向を変化させながら移動する様子を観察することができる。一方 srGAP1 の発現を抑制した細胞では、運動方向の変化が少なくコントロールの細胞と比較して運動の方向が安定していた。この結果から srGAP1 は細胞運動の方向性を制御していることが示唆される。

このときの膜突起の様子を観察したところ、コントロールの細胞では、移動する際に進行方向にのみ膜突起を形成しており、運動の方向を変化させる際にはひとつの細胞に一度複数の突起が現出した後、ひとつの突起を残してそれ以外の突起は消失することが分かった。一方 srGAP1 の発現を抑制した細胞では、一度形成された突起の消失が起こらず突起形成方向の変化の頻度が低下していた。このように srGAP1 による膜突起動態の制御は、細胞外環境に応答して方向を変化させて移動する過程に重要であ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)

(該当なし)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 大輔 (YAMAZAKI DAISUKE)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：50422415