

| | |
|--------------|--|
| Title | Rho and Rab Small G Proteins Coordinately Reorganize Stress Fibers and Focal Adhesions in MDCK Cells |
| Author(s) | Imamura, Hiroshi |
| Citation | |
| Issue Date | |
| Text Version | ETD |
| URL | https://doi.org/10.11501/3155675 |
| DOI | 10.11501/3155675 |
| rights | |
| Note | |

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

| | |
|---------------|---|
| 氏 名 | い 今 村 ひる し 博 士 博 司 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博 士 (医 学) |
| 学 位 記 番 号 | 第 1 4 7 8 7 号 |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 11 年 3 月 25 日 |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当 |
| 学 位 論 文 名 | Rho and Rab Small G Proteins Coordinately Reorganize Stress Fibers and Focal Adhesions in MDCK Cells (アクチンストレスファイバーと細胞接着斑の再編成における低分子量G蛋白質 Rho と Rab の協調的制御機構の解明) |
| 論 文 審 査 委 員 | (主査) 教 授 門 田 守 人 (副査) 教 授 高 井 義 美 教 授 宮 坂 昌 之 |

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

癌細胞が周辺組織へ浸潤する場合、まず、細胞間接着が減弱しつつ、浸潤方向先進部の接着斑 (focal adhesion, 以下 FA) において細胞外マトリックスとの接着がおこる。次に、浸潤方向のプロテアーゼを活性化して細胞外マトリックスを破壊しながら、浸潤方向への細胞膜を伸展 (ラメリポディア, ラッフルズの形成) させる。そして、FA を足場にして浸潤方向への細胞を牽引し周辺組織へ浸潤する。これら過程には細胞骨格系のダイナミックな変化と FA の再編成を伴う複雑な制御機構が存在すると考えられているが、その詳細は不明である。一方、Rho ファミリー低分子量G蛋白質は、アクチン細胞骨格系を介して細胞形態、細胞接着、細胞運動などを制御し、Rab ファミリー低分子量G蛋白質は、細胞内小胞輸送を制御しているとされている。そこで、癌細胞の浸潤過程におけるこのような細胞運動の制御機構に、Rho と Rab が関与している可能性を検討するために以下の実験を行った。

【方法】

上皮系細胞のモデルとして MDCK 細胞を用い、hepatocyte growth factor (以下 HGF) や 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (以下 TPA) で刺激することで運動能の亢進を惹起し、アクチン細胞骨格系と FA の変化を観察した。F-actin は rhodamine-phalloidin で、FA はその構成蛋白質の1つである vinculin を FITC で蛍光免疫染色し、主に共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。変異遺伝子の作製は PCR mutagenesis を用いた。形質転換はリポフェクトアミン法で行い、Rho, Rac, Rab 5, -8, -11 の活性変異および不活性変異を定常発現した MDCK 変異細胞株を樹立した。マイクロインジェクションに用いた RabGDI は His 6 融合蛋白質として大腸菌より精製した。

【結果】

[HGF, TPA 刺激による F-actin および FA の再編成]

野生型 MDCK 細胞の静止時における F-actin の局在として、細胞接着部の cortical bundle, colony 周囲の peripheral bundle, および basal level で平行に走行する弱いアクチンストレスファイバー (actin stress fiber, 以下 ASF) が認められた。この時、FA は ASF の先端に局在していた。TPA 刺激15分後には、細胞膜のラッフルング、

peripheral bundle の減弱, ASF の消失を認めた。この時, FA の局在が不明瞭となった (消失期)。2 時間後には, 強い放射状の ASF が再編成され, 細胞接着は減弱しはじめた。この時, FA は放射状の ASF の先端に強く局在していた (再編成期)。18 時間後には, 細胞間接着が完全に消失し細胞は遊走能を獲得した (遊走期)。TPA の代わりに HGF を用いて同様の実験を行ったが, 同様の細胞の形態学的変化を経時的に観察できた。以上より, 細胞運動能亢進時には細胞骨格系および FA のダイナミックな変化がみられることが明らかとなった。

[Rho の活性と ASF および FA の再編成]

活性型 Rho 変異細胞株は, 刺激前から cortical bundle, peripheral bundle, ASF が増強しており, 刺激後も, 消失期への移行がほとんど認められなかった。一方, Rho の機能を特異的に阻害する C3 をマイクロインジェクションした細胞は, 刺激前から cortical bundle, peripheral bundle が減弱し, ASF が消失していた。刺激後は, 消失期へは移行するが, 再編成期には至らなかった。以上より, 細胞が運動する際, まず, Rho の一時的な不活性化により消失期に至り, その後, Rho の活性化により再編成期, 遊走期と進むことが明らかとなった。

[Rac の活性と ASF および FA の再編成]

活性型 Rac 変異細胞株では刺激前から細胞接着部の cortical bundle が増強し, 細胞膜のラフリングを認めた。刺激後は, 消失期へは移行するが, 再編成期には至らなかった。不活性型 Rac 変異細胞株では刺激前から細胞接着部の cortical bundle が減弱していた。刺激後は, 消失期へは移行するが, 細胞膜のラフリングはおこらず, 再編成期には至らなかった。以上より, 消失期の細胞膜のラフリングに Rac の活性化が必要であり, 再編成期から遊走期へ至るには Rac のサイクリカルな活性制御が必要であることが明らかとなった。

[Rab の活性と ASF および FA の再編成]

Rab は30種類以上のメンバーから成るが, これらすべての Rab の活性を阻害する RabGDI をマイクロインジェクションして同様の実験を行った。刺激前, RabGDI は細胞骨格系および FA に影響を及ぼさなかった。刺激後, 消失期へ移行するものの, 再編成期には至らなかった。以上より, 再編成期に Rab の活性化が必要であることが明らかとなった。さらに, いずれの Rab の活性化が ASF および FA の再編成に必要であるのかを検討するため, FA の再編成に関与している可能性が高い Rab 5, -8, -11 の活性型および不活性型変異細胞株を作成し同様の実験を行った。いずれの変異細胞株も消失期へは移行したが, 不活性型 Rab 5 変異細胞株で再編成期, 遊走期への移行が阻害された。以上より, 少なくとも Rab 5 の活性化がおそらく細胞膜コンポーネントのエンドサイトーシスを介して ASF および FA の再編成や細胞の遊走に必要であることが明らかとなった。

【総括】

細胞が運動する際, ASF と FA の再編成を含む様々な細胞骨格系のダイナミックな変化が起こることを明らかにした。また, この過程には低分子量 G 蛋白質の Rho ファミリーと Rab ファミリーによる協調的な活性制御機構が存在することを明らかにした。今回の結果に推測も含めて癌細胞浸潤の分化メカニズムを次のように考えた。すなわち, 「癌細胞が周囲組織に浸潤する際, まず, Rho の不活性化による ASF の消失と細胞間接着の減弱および Rac の活性化による運動方向前方への細胞膜の伸展がおこる。同時に, Rab 5 の活性化により運動方向後方における FA の endocytosis が起こる。次に, Rho の活性化による ASF の再編成とそれに沿っての FA の前方への transport, recycling, exocytosis が起こる。その時のダイナミックな細胞形態の変化に Rac のサイクリカルな活性制御が関与している。」というものである。

論文審査の結果の要旨

本研究は, 細胞運動について, アクチン細胞骨格と focal adhesion の再編成の側面から, 低分子量 G 蛋白質 Rho と Rab の二つのシグナルによる協調的制御機構の可能性を検討したものである。まず, TPA または HGF によって MDCK 細胞の細胞運動能の亢進を誘導し, アクチン細胞骨格と Focal adhesion についての経時的変化を詳細に検討した。そして, その系に Rho, Rab の活性型および不活性型変異の形質転換や Rho の活性抑制因子の C3 または

Rab の活性抑制因子の RabGDI のマイクロインジェクションを施し、その影響を観察することによって、Rho の一時的な不活性化による actin stress fiber と focal adhesion の消失とその後の活性化による再編成、Rac の活性化による ruffling と不活性化による細胞間接着の減弱がサイクリカルに制御されていること、および、Rab 5 の活性化による actin stress fiber と focal adhesion の再編成が細胞運動に必須であることを明らかにした。

これらの知見は、細胞運動には Rho のみならず Rab も重要な因子であることを初めて明らかにしたものである。また、この細胞運動の制御機構の解明は、今後、臨床医学的にも癌細胞の周囲組織への浸潤機構の解明へと発展する可能性を含んでおり、学位の授与に値すると思われる。