OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Rho and Rab Small G Proteins Coordinately Reorganize Stress Fibers and Focal Adhesions in MDCK Cells
Author(s)	Imamura, Hiroshi
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3155675
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	今村博司（いまむらひろし）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第14787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，細胞膜のラッフリング，

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，細胞膜のラッフリングを認めた。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，細胞膜のラッ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ッフリングに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がおこる。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考えられる。