

Title	Rho small GTPase regulates the stability of individual focal adhesions : a FRET-based visualization of GDP/GTP exchange on small GTPases
Author(s)	宮内, 崇行
Citation	大阪大学, 2008, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49869">https://hdl.handle.net/11094/49869</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	みやうち たかゆき 宮内 崇行
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 22350 号
学位授与年月日	平成20年4月21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 small GTPase regulates the stability of individual focal adhesions : a FRET-based visualization of GDP/GTP exchange on small GTPases (FRETを利用したGDP/GTP交換の可視化により明らかにした、低分子量GTP結合蛋白質Rhoによる個々の接着斑の安定性制御)
論文審査委員	(主査) 教授 柳田 敏雄 (副査) 教授 米田 悦啓 教授 月田早智子

## 論文内容の要旨

## 〔 目 的 〕

近年の活発な研究によってRho GTPasesを制御する GEF, GAP, GDI, そして Rho の下流で機能する標的蛋白質が数多く同定されてきたものの、細胞内の微小な領域において Rho の活性を検出することは困難であるために、Rho と細胞基質間接着装置との間の相互作用について未解明な部分が大きかった。ここに本研究の目的は、GDP-GTP 交換反応を高感度に検出可視化する技術を開発し、Rho の接着斑における時空間的な活性制御を調べ、その生理的意義を明らかにすることである。

## 〔 方法ならびに成績 〕

私は「蛍光ラベルした GTP; BODIPY(TR)-GTP」と「Rhoと蛍光蛋白質との融合蛋白質; YFP-Rho」との間で発生する蛍光エネルギー移動を細胞内で検出することによって、目的とする局所的な活性検出を実現した。蛍光標識 GTPの細胞内への導入は microinjection により、細胞の観察には微弱蛍光の検出に優れた細胞内1分子計測システムを転用した。

まず in vitro において FRET が Rho の活性化を反映することを確認した。GEF 依存的に、蛍光GTP と Rho は複合体を形成し、また、Rho-蛍光GTP複合体は標的蛋白質を認識した。

YFP-Rho を発現させた PC12D 細胞に蛍光 GTP を導入すると、内在性の Rho 活性を示す FRET シグナルが観察された。LPA などの Rho の活性化を惹起する細胞外刺激を行うと、さらに強い FRET シグナルが検出された。FRET の生成は、Rho の機能阻害により強く抑制された。以上の結果は、本研究で開発した手法が Rho の活性モニタリングに有効であることを示す。

続いて、細胞内の Rho GTPases 活性化の観察において 活性化 Rho, Rac が接着斑様に局在化することに注目して研究を進めた。活性化 Rho(Rac) が局在化しているのが接着斑であることは抗体染色によって確認した上で、接着斑の動態を時間的空間的に高分解で観察したところ、特に 活性化型 Rho の接着斑蛋白質複合体への局在化が、その接着斑の「堅固さ」を制御することを発見した。

## 〔 総 括 〕

今までの知見によれば、Rho は接着斑を繋ぐアクチン繊維の張力の制御をすることで接着斑の会合を引き起こすとされ、また Rac は接着斑(focal adhesion)を解消させる作用を有すると考えられていた。加えて、新規接着の形成が Racを活性化させかつRhoを不活性化させるという逆の現象も知られており、Rho と細胞基質間接着との相互作用についての知見は混沌としていた。本研究が明らかにした活性化型 Rho の細胞基質間接着蛋白質複合体への濃縮は、Rho が個々の接着斑の直上で接着を正に制御していることを示す。また、Rac による個々の細胞基質間接着装置への制御の寄与は小さいことも明らかに出来た。これらは細胞基質間接着の柔軟性を理解する上で重要な発見と考えられ、細胞の浸潤転移の研究などに貢献が期待される。また、ヌクレオチドの交換すなわち活性化を、FRET を利用して可視化する本研究の手法は、Rho 以外の GTPase の研究にも広く応用可能であることを既に確認しており、細胞生物学分野、基礎医学分野において広く使用されるものと考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

宮内氏は、低分子量GTPaseの活性化を検出する画期的な手法を開発した。蛍光ラベルしたGTPと、蛍光蛋白質融合のGTPaseとの間に起こる蛍光共鳴エネルギー移動を測定する方法である。この新開発の手法は、Rho以外のGTPaseの研究にも広く応用可能で細胞生物学分野、基礎医学分野において広く使用されるものと考えられる。今回、宮内氏が明らかにしたのは、個々の接着斑の直上に活性型Rhoが集合して、細胞基質間接着を局所的に正に制御している可能性が高いということである。これは、従来知られていた接着装置の制御機構;アクチンファイバーの張力が接着斑の成長を制御するモデルとは異なり、細胞が柔軟に外界環境に適応できることを合理的に説明できる。また、接着のフィードバックループの存在も示唆された。いずれも、細胞の浸潤転移の研究などにおいて重要な貢献と言えよう。よって、宮内崇行氏は学位に値するものと認める。