



Title	Comprehensive screening and functional analysis of the Rho GTPase-activating proteins involved in the maintenance of cell morphology
Author(s)	康, 娜
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/77632
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Abstract of Thesis

Name (Kang Na)	
Title	Comprehensive screening and functional analysis of the Rho GTPase-activating proteins involved in the maintenance of cell morphology (細胞形態の維持に関与するRho GTPase活性化タンパク質の包括的なスクリーニングと機能解析)
<p>Abstract of Thesis</p> <p>The Rho-GTPase-activating proteins (Rho-GAPs), a negative regulator of Rho family of GTPases (Rho-family), are the well-characterized modulators of the actin cytoskeleton that give rise to epithelial-mesenchymal transition (EMT)-associated cell activities. Based on comprehensive screening on the whole Rho-GAP family, we aim at identifying Rho-GAPs that are responsible for the maintenance of proper epithelial cell phenotypes. Specifically, small interfering RNA (siRNA)-based screening on all human Rho-GAPs is performed to find specific molecules that significantly affect the cell morphology at both high and low cell densities. Then we further searched for a novel pathway, Septin9/ARHGAP4/FAK/Src-mediated EMT-related processes. In addition, we also demonstrate that ARHGAP4 forms a complex with Septin2 and Septin9 via its Rho-GAP domain and SH3 domain to allow for both up- and down-modulation of integrin-mediated focal adhesions (FAs). Notably, we found that silencing ARHGAP4 as well as overexpressing its two mutually independent upstream regulators Septin2 and Septin9 all induce reorganization of FAs to newly express integrin $\beta 1$ and also enhance both cell migration and invasion. These regulations of FAs are realized only under the proper activity of nonmuscle myosin II. Rho-GTPase-activating proteins (Rho-GAPs) are essential upstream regulators of the Rho family of GTPases, i.e., RhoA, Rac1, and Cdc42, but it remains unclear if the potential phenotypic change caused by perturbations to a Rho-GAP is predictable from its structural sequence. Therefore, we analyzed the relationship between the morphological response of cells to the silencing of Rho-GAPs and their primary structure. Principal component analysis determined the critical parameters that characterize the Rho-GAP silencing-induced morphological change of MCF10A human breast epithelial cells, which express 57 different Rho-GAPs. Specifically, upon silencing of individual Rho-GAPs, cells were found to predominantly exhibit an elongated morphology, thus reminiscent of EMT. For all the pairs of the Rho-GAPs, the similarity in the primary structures was quantified and compared to that in the critical morphological parameters of the corresponding pairs. We found that there is a distinct correlation between the structural and morphological similarities regarding the group of Rho-GAPs whose target is RhoA. Thus, the family-wide analysis reveals a tendency of RhoA-targeted Rho-GAPs, in which a similar structure amounts to a similar morphological response upon its silencing.</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (Kang Na)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教 授	出 口 真 次
	副 査	教 授	田 中 正 夫
	副 査	教 授	和 田 成 生
	副 査	教 授	松 野 健 治 (理学研究科)

論文審査の結果の要旨

本論文ではRho-GAPと呼ばれる、Rhoファミリータンパク質を阻害的に制御する一連のタンパク質を研究対象とし、それらが細胞の形態維持に果たす役割について調べた。研究内容は大きく3つに分けることができ、1)一つ目は細胞レベルでの包括的なスクリーニングを通して、上皮細胞の形態維持に重要な役割を果たすRho-GAPタンパク質を同定したこと、2)二つ目は前記スクリーニングにおいて強い効果を示したRho-GAPタンパク質の一つであるARHGAP4に焦点を絞り、その細胞形態調節メカニズムを明らかにしたこと、3)三つ目は前記スクリーニング結果を解析し、複数のRho-GAPタンパク質が共有する関係性を見出したことが主な成果である。

上記1)のスクリーニングでは、ヒト乳腺上皮細胞に発現する57種類のRho-GAPタンパク質の全てを研究対象とし、細胞の形態変化の定量化を通してARHGAP4が最大の影響を及ぼすRho-GAPであることを明らかにした。上記2)の研究では生化学実験とプロテオミクス解析を通して、ARHGAP4が細胞内でSeptin2およびSeptin9と複合体を作ることを見出した。さらに、マイクロアレイ解析・生化学解析・細胞機能解析等により、同複合体への変異、発現抑制、強制発現などの分子的擾乱は、細胞-基質間接着のタンパク質組成と活性化の変化を通して細胞形態に影響を及ぼすこと、またそれがひいては細胞の運動能や浸潤能の変化につながることを明らかにした。上記3)の研究では、細胞形態の定量パラメーターに関する主成分分析・階層的クラスター分析と、Rho-GAPタンパク質の配列類似性解析を通して、Rho-GAPタンパク質における特定のグループが共有する関係性を明らかにした。具体的には、RhoAタンパク質を標的とするRho-GAPタンパク質に限り、上記主成分と配列の類似度に強い相関があることを見出した。すなわち、複雑な細胞形態維持の制御下において、個々の分子の性質がそのまま細胞の表現型に直結するRho-GAPタンパク質グループの存在とその性質を明らかにした。

上皮細胞の形態変化は、がんの進展に関わる上皮間葉転換の指標の一つであるとされている。本研究ではARHGAP4の発現抑制に伴い、実際に上皮間葉転換を示す分子マーカーが活性化することを観察した。すなわち、ARHGAP4ががん抑制分子として機能している可能性を提示し、かつSeptin2/9が関与するその分子メカニズムの根幹部分を明らかにした。さらに、分子包括的解析を通してこれまで不明瞭であったRho-GAPファミリー全体が細胞レベルで発現する傾向を明らかにし、今後のRho-GAP研究の基盤となる知見を得た。以上の理由から、本論文が博士(理学)の学位論文として価値のあるものと認める。