

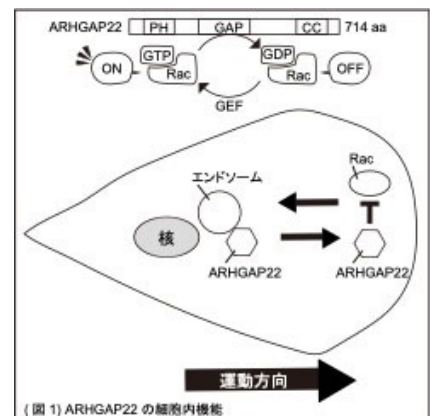
研究課題	癌細胞の運動制御機構の解析 —癌細胞の悪性化における RacGAP 因子の役割の 解明を目指して—
キーワード	①細胞内情報伝達、②アクチン細胞骨格、③低分子量 G 蛋白質

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	モリ マミコ 森 真美子	所属等	北里大学 理学部 助教
プロフィール	北里大学大学院理学研究科生物科学専攻博士課程 2 年次に応募した独立行政法人日本学術振興会特別研究員 DC2 に採用され、博士課程 3 年次より特別研究員として北里大学大学院理学研究科細胞生物学講座に在籍。2016 年 3 月博士課程修了に伴い、特別研究員の資格を DC2 から PD に変更した。同講座に講座研究員（ポストドクター）として所属し、博士課程からの研究の延長で研究を行った。PD 任期満期に伴い一般企業に就職し、2019 年より北里大学理学部助教に着任した。		

1. 研究の概要

細胞運動は生体内の高次機能にとって重要であり、発生過程における形態形成、神経ネットワークの形成、免疫細胞の貪食作用や集積などの様々な生体反応や、さらには癌細胞の浸潤、転移などを制御している。Rho ファミリー低分子量 G 蛋白質（RhoGTPase）は、アクチン細胞骨格の再編成を通じて細胞の形態や運動を制御する因子で、細胞内の分子スイッチとして重要な役割を果たしている。これまでに、RhoGTPase の Rac の不活化因子（GAP）の一つである ARHGAP22 は癌細胞の浸潤、転移に関与することが報告されているが、その活性制御機構は不明である。

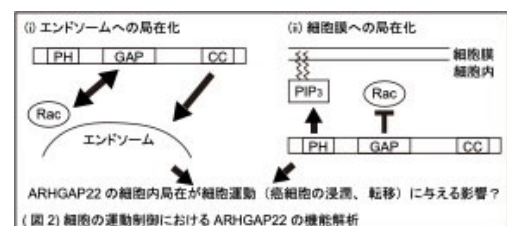


(図 1) ARHGAP22 の細胞内機能

申請者は、ARHGAP22 が細胞内において CC ドメインを介して細胞内小器官の一つであるエンドソームに局在し、細胞のアクチン細胞骨格を制御することで細胞の葉状仮足の形成と細胞伸展を抑制する働きがあることを明らかにした（PLOS ONE, 9: e100271, 2014）（図 1）。以上の結果から、ARHGAP22 はその局在をダイナミックに変化させることで細胞内の Rac 活性を調節する分子であると考えられる。しかし、ARHGAP22 の細胞内における活性制御機構や生体内における細胞運動制御機構に関しては依然不明のままである。本研究では ARHGAP22 の PH ドメインと細胞膜、CC ドメインとエンドソームの相互作用が RacGAP 活性に与える影響を調べ、癌細胞の運動制御機構を解明することを目的とする。

2. 研究の動機、目的

細胞内の様々な膜輸送は RabGTPase によって制御されている。これまでに Rac と RacGEF である Tiam1 がエンドソームにリクルートされ、Tiam1 によって活性化された Rac が RabGTPase の一つである Rab5 によるリサイクル経路で細胞膜に運ばれることが知られている（Cell, 134: 135-147, 2008）。そのため、



(図 2) 細胞の運動制御における ARHGAP22 の機能解析

ARHGAP22 がエンドソームに存在し、Rac を不活化するメカニズムが存在する可能性は十分に考えられる (図 2(i))。

PH ドメインは細胞内輸送、細胞情報伝達、細胞骨格再構築に関与しており、ホスホイノシチドとの結合によって細胞膜に局在し、シグナル伝達に寄与している。申請者のこれまでの結果から、ARHGAP22 の PH ドメインを介した細胞膜への局在化が RacGAP 活性に必要であることが示唆されている。したがって、RhoGTPase の活性制御において PH ドメインを介した正の制御 (GEF) と負 (GAP) の制御の協調した作用は細胞の運動能獲得に寄与しており、ARHGAP22 の細胞内局在の変化が負の制御において重要であると考えられる。一般的に、悪性化した癌細胞は運動能の亢進による浸潤、転移をその性質として示し、浸潤する際、細胞外環境によって形態を変化させることで移動することが知られている。そして、ARHGAP22 は Rho の下流において RacGAP として機能することで癌細胞の形態形成に関与することが報告されている (Cell, 135: 510-523, 2008)。本研究において、PH ドメインを介した Rac の負のメカニズムを明らかにすることは、新たな細胞運動機構の解明に繋がり、さらに癌治療において ARHGAP22 が癌細胞の浸潤、転移の抑制剤として標的となる可能性が期待される (図 2(ii))。

3. 研究の結果

・ ARHGAP22 の PH ドメインと細胞膜の相互作用が RacGAP 活性に与える影響

ARHGAP22のPIP₃結合欠損変異体 (K46A/R57C, KR)およびPHドメイン欠損変異体 (Δ PH)はどちらも、WTと同様に細胞内においてエンドソームに局在した。しかしながら、恒常活性化型 Racと共発現させた際、どちらの変異体も細胞膜において恒常活性化型Racと共局在せず葉状仮足にも局在しなかった。また、申請者はこれまでにARHGAP22を発現させた細胞にPI3K阻害剤であるLY294002を添加した時、ARHGAP22の細胞膜への局在化が抑制される結果を得ている。以上の結果から、ARHGAP22のPHドメインとPIP₃の結合はARHGAP22の細胞膜への局在化において重要であることが示唆された。

さらに、細胞内におけるRacGAP活性を評価するため、2つの実験を行った。まず、EGF刺激誘導性の葉状仮足形成への影響について調べた。その結果、KRおよび Δ PHはWTと比較して葉状仮足を形成する細胞数が有意に増加した。次に、細胞外基質と細胞の接着による細胞伸展への影響について調べたところ、どちらの変異体もWTと比べて細胞伸展時の細胞面積が増加していた。以上のことから、PHドメインとPIP₃の結合はARHGAP22が細胞膜においてRacGAPとして機能する上で重要であることが示唆された。

・ ARHGAP22のCCドメインとエンドソームの相互作用がRacGAP活性に与える影響

まず初めに ARHGAP22 の CC ドメインを一部欠損させた ARHGAP22 Δ CT 変異体を作成した。作成した変異体の細胞内局在を観察したところ、WT と比べて顕著に細胞膜に局在していた。さらに RacGAP 活性を評価するため、前述した葉状仮足の形成数と細胞伸展時の細胞面積について調べたところ、 Δ CT は WT よりも強い RacGAP 活性を示した。以上のことから ARHGAP22 は細胞内においてエンドソームに局在することにより RacGAP 活性が抑制されていると考えられる。さらに、細胞膜への局在化が細胞内輸送によるものであるか調べるために、リサイクリング経路 (エンドソーム~細胞膜) の制御に関わる Rab11 の不活性型変異体を共発現させ、リサイクリング経路を阻害した。その結果、ARHGAP22 による葉状仮足の形成の抑制は観察されず、正常細胞同様の葉状仮足の形成が観察された。以上のことから、ARHGAP22 はエンドソームに局在することで RacGAP 活性を抑制されており、Rac が活性化されるとリサイクリング経路により細胞膜へ運ばれて RacGAP として機能することが示唆された。

4. 研究者としてのこれからの展望

申請者の研究対象である GAP は、ヒトでは 70 種類以上存在するものの、その機能解析はごく一部でしか進んでいませんでした。しかし近年、GAP が積極的に細胞の形態や運動を制御していることが明らかとなり、その重要性が認知されるようになってきました。申請者の所属している研究室では細胞運動制御に関わる GAP の研究を主に行っており、今後も細胞運動とその制御に関わる細胞内シグナル因子について研究を進めていきたいと思っております。

5. 社会（寄付者）に対するメッセージ

2020年度女性研究者奨励金に採択いただき感謝申し上げます。本奨励金により、ARHGAP22の生理学的機能について重要な結果を得ることができました。新型コロナウイルスの感染拡大の中、研究を進めるのが困難な状況下ではありましたが、限られた時間を有効に活用することができたのも本奨励金のおかげでございます。一度企業に就職し研究から離れていた身であり、再び研究を始められるか非常に不安でありましたが、本奨励金のご支援により研究を始めることが叶いました。今後も女性研究者の活躍のため、奨励金のご支援をどうぞよろしくお願いいたします。