

132. 1 分子の構造変化が決める細胞集団内の力学的バランス

坂根 亜由子

*徳島大学 大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 生体制御医学講座 分子病態学分野

Key words : 集団的細胞運動, 力学的バランス, JRAB の構造変化

緒言

複数の細胞が互いの細胞間接着によって1つの集団を形成してまとまって運動する集団的細胞運動は、胎生期において重要な役割を果たしており、ダイナミックな細胞集団の運動によって組織・器官は形成されていく。また、血管新生や創傷治癒の際にも集団的細胞運動が認められる。その一方で、ある種のがん細胞も同様の運動様式を利用することで周辺組織への浸潤・転移を引き起こすことが知られている。この集団的細胞運動では、先頭の一部の細胞が集団を進行方向に引っ張る牽引力を発揮し、後ろの大部分の細胞が細胞間接着を介して先頭からの指令(牽引力)を隣接する細胞に伝搬して共有するといった力学的バランスが重要であると考えられる。しかし、このような「集団内の力学的バランス」の実体を従来の生物学的研究手法のみで捉えることは難しく、そのバランスを生み出す分子の同定やしくみの解明は立ち遅れている。

これまで、我々は、上皮細胞において接着分子の細胞膜への輸送を制御する分子として、代表的な小胞輸送の制御系として知られる Rab ファミリー低分子量 G 蛋白質のメンバーである Rab13 に注目した研究を進めてきており、Rab13 の標的蛋白質として JRAB を同定し、Rab13-JRAB 系が接着分子群の小胞輸送を介して細胞間接着形成を制御することを証明している¹⁾。さらに、我々は、上皮細胞集団において JRAB はまだ接着ができていない細胞自由縁では太いアクチン線維の束の形成を促進し、成熟した細胞間接着部位ではアクチン線維の安定化を制御していることを見出した²⁾。また、これまでの生化学的解析から、JRAB は Rab13 との相互作用によって closed form から open form へと構造変化を引き起こすことが示唆され³⁾、上述したような上皮細胞集団内におけるアクチン細胞骨格の再編成の時空間的な制御は JRAB の構造変化に基づく可能性が出てきた。実際に、我々は、JRAB の構造変化を模倣する変異体 (open form: JRAB Δ CC, closed form: JRAB Δ CT) を発現させた細胞は、それぞれ異なる形態を示し、集団的細胞運動にも異常をきたすことをライブイメージングとコンピュータサイエンスを組み合わせた解析によって明らかにしつつあった。これらの解析結果を基に、JRAB は集団的細胞運動に必要な「統率力」を生み出しており、まさに JRAB の構造変化こそが力学的バランスの制御機構の本体であるという着想に至った。そこで、本研究では、この仮説を証明するため、その基盤となる JRAB の構造変化の実体をバイオインフォマティクスによる構造変化予測や構造生物学を中心とした生化学的解析によって明らかにするとともに、ライブイメージングとコンピュータサイエンスさらにバイオメカニクスを融合したアプローチによって JRAB が制御する「集団内の力学的バランス」を可視化および定量化することを試みた。

方法、結果および考察

1. JRAB の Rab13 依存的な構造変化モデルの完成

JRAB の Rab13 依存的な構造変化は、主に生化学的解析から提唱したモデルであったため³⁾、その実体を明らかにするために JRAB 単独および Rab13-JRAB 複合体の構造解析を試みた。しかし、JRAB 全長のリコンビナント蛋白質は結晶化解析の条件を満たす精度・濃度の調製が非常に困難であり、また、調製できた一部の必要領域のみのリコンビナント蛋白質は、結晶化しなかった。そこで、医薬基盤研の水口賢司博士のグループとの共同研究で、バイオインフォマティクスの手法を用いた JRAB の構造モデリングを試みた。*in silico* の立体構造モデリングの各過程で、検証のために生化学的実験を行うことでモデリングに修正を加えるという作業を繰り返し、Rab13-JRAB 複合体の構造モデリン

グを完成させた。その結果、JRAB の立体構造における Rab13 の結合領域が明らかになるとともに、JRAB の分子内結合が Rab13 との相互作用により解除されて構造変化 (closed form から open form) が引き起こされることを証明することができた (図 1)。

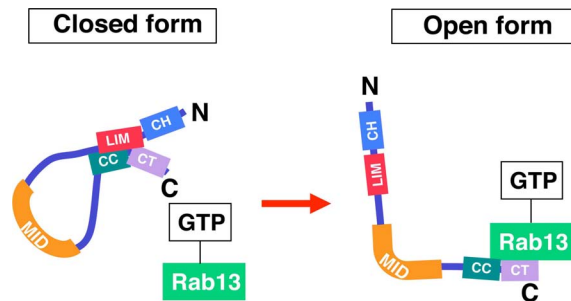


図 1. JRAB の Rab13 との相互作用に依存した構造変化

バイオインフォマティクスと生化学を組み合わせたアプローチで構築した Rab13-JRAB 複合体の構造モデリングによって、JRAB の N 末端領域と C 末端領域による分子内結合が Rab13 と JRAB の C 末端との相互作用により解除されて closed form から open form へと構造が変化することを証明した。JRAB の C 末端にある JRAB の N 末端結合部位と Rab13 結合部位は一部重複している。

2. 細胞集団内での JRAB の時空間構造変化の証明

実際に細胞集団内で JRAB が構造変化を起こしているかを明らかにするため、N 末端側と C 末端側の結合・非結合を感知することで、open form と closed form 間の構造変化を捉えることができる JRAB の FRET プローブを徳島大学総合研究支援センターバイオイメージング研究部門の堀川一樹教授の指導の下作製した。この FRET プローブは、JRAB の N 末端側に Venus を、C 末端側に CFP を連結させ、closed form では、433 nm の励起光で隣接する Venus の蛍光が、open form では、CFP の蛍光が検出される (図 2)。その FRET プローブを恒常的に発現させた上皮細胞株を樹立して創傷治癒アッセイを行い、細胞集団の先頭の一部の細胞では JRAB は closed form であり、後方の大多数の細胞では open form であることを見出した。さらに、細胞集団の先頭では、決まった細胞で JRAB が closed form または open form をとるわけではなく、状況に依存して流動的であることが明らかになり、細胞集団内での JRAB の構造の時空間変化を証明することができた。

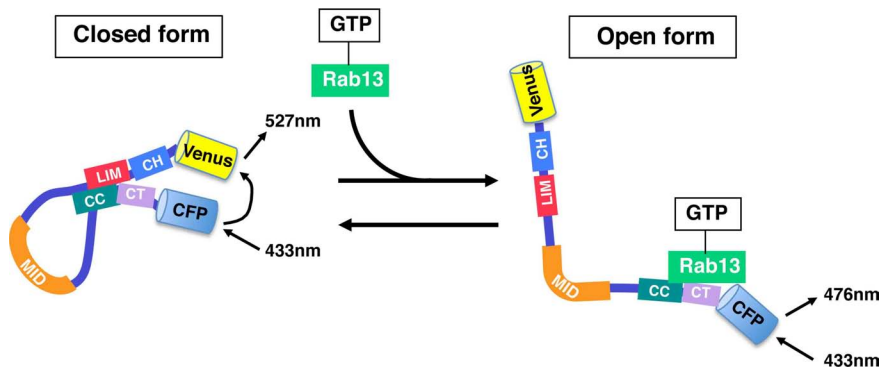


図 2. JRAB の FRET プローブ

Closed form の JRAB では、433 nm の励起光で隣接する Venus の蛍光が、Rab13 との相互作用によって open form に構造を変化させた JRAB では、FRET が解除されて CFP の蛍光が検出される。

3. 集団的細胞運動において JRAB の構造変化が制御する力学的バランスの証明

我々は、すでに JRAB が open form や closed form に固定された変異体を発現した上皮細胞株を用いて創傷治癒アッセイを行い、各構造変異体に特徴的なライブイメージング像を捉えていたが²⁾、その動きの複雑さから特徴を抽出することは困難であった。そこで、理化学研究所の横田秀夫博士のグループとともに得られたライブイメージング像をコンピュータサイエンスの手法を用いて分析し、すでに XY-T の三次元データのボリュームレンダリングによる解析を行って構造変異体を発現させた細胞が示す集団移動の野生型とは異なった特徴を抽出・可視化することに成功していた。

本研究では、さらにオプティカルフローを用いて細胞集団の動きの自動定量化を行い、JRAB Δ CC や JRAB Δ CT と比較して構造を自由に変えることができる JRAB の野生型は、細胞集団の効率の良い、バランスのとれた動きを可能にすることを証明した。さらに、大阪大学の出口真次教授との共同研究で、バイオメカニクスの手法を用いた力学的解析を行ったところ、closed form の JRAB を発現させた細胞集団の先頭で基質面に対して大きな力がかかっているが、open form の JRAB を発現させた細胞集団の先頭では基質面に対する力を全く検出できなかった。このように、JRAB の構造変化が細胞集団の先頭で生み出される牽引力を可逆的に調節していることを明らかにした。

以上の本研究成果から JRAB の構造の可塑性が効率の良い集団的細胞運動を可能にする力学的バランスを生み出していることを証明することができた (図 3)。

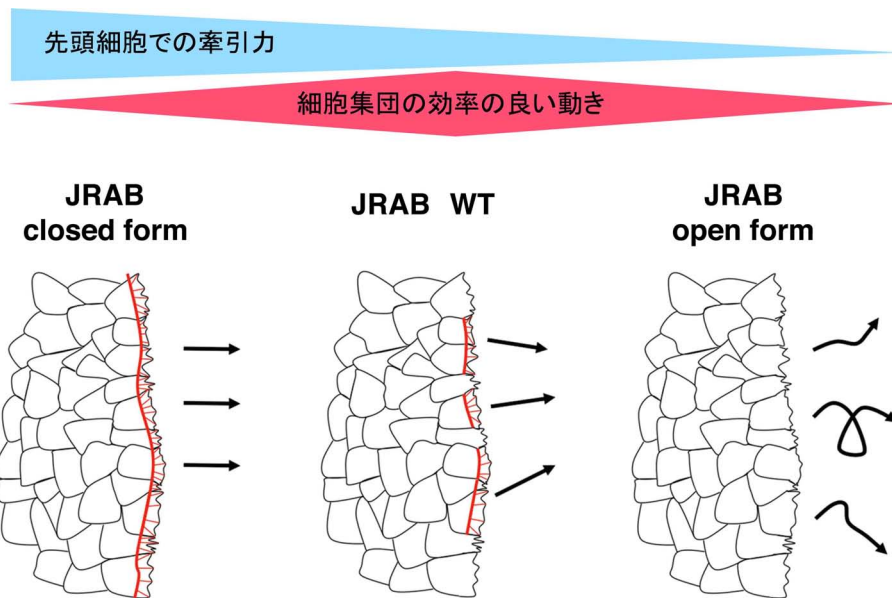


図 3. JRAB の構造変化が制御する集団的細胞運動における力学的バランス

Closed form の JRAB によって細胞集団の牽引に必要な大きな力が生み出されるが、自由に構造を変化させることのできる野生型の JRAB の方が効率の良い集団的細胞運動を可能にしている。

なお、本研究成果は、Molecular Biology of the Cell (2016 年 10 月 15 日号) に掲載され⁴⁾、さらに、科学新聞 (2016 年 11 月 18 日号) にとりあげられました。

共同研究者

本研究の共同研究者は、理化学研究所光量子工学研究領域画像情報処理研究チームの横田秀夫博士、吉澤信博士、西村将臣博士、医薬基盤・健康・栄養研究所の水口賢司博士、大阪大学蛋白質研究所の土屋裕子博士、大阪大学大学院基礎工学研究科の出口真次教授、徳島大学総合研究支援センターバイオイメージング研究部門の堀川一樹教授である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Sakane, A. and Sasaki, T. : Roles of Rab family small G proteins in formation of the apical junctional complex in epithelial cells. In *Cell Polarity 1: Biological Role and Basic Mechanisms* ed. by Ebnet, K., Springer, Germany, pp 349-374, 2015.
- 2) Sakane A, Abdallah AA, Nakano K, Honda K, Ikeda W, Nishikawa Y, Matsumoto M, Matsushita N, Kitamura T, Sasaki T. Rab13 small G protein and junctional Rab13-binding protein (JRAB) orchestrate actin cytoskeletal organization during epithelial junctional development. *J Biol Chem.* 2012 Dec 14;287(51):42455-68. doi: 10.1074/jbc.M112.383653. PMID: 23100251.
- 3) Sakane A, Honda K, Sasaki T. Rab13 regulates neurite outgrowth in PC12 cells through its effector protein, JRAB/MICAL-L2. *Mol Cell Biol.* 2010 Feb;30(4):1077-87. doi: 10.1128/MCB.01067-09. PMID: 20008558.
- 4) Sakane A, Yoshizawa S, Nishimura M, Tsuchiya Y, Matsushita N, Miyake K, Horikawa K, Imoto I, Mizuguchi C, Saito H, Ueno T, Matsushita S, Haga H, Deguchi S, Mizuguchi K, Yokota H, Sasaki T. Conformational plasticity of JRAB/MICAL-L2 provides "law and order" in collective cell migration. *Mol Biol Cell.* 2016 Oct 15;27(20):3095-3108. PubMed PMID: 27582384; PubMed Central PMCID: PMC5063617.