



Regulation by Afadin of Cyclical Activation and Inactivation of Rap1, Rac1, and RhoA Small G Proteins at Leading Edges of Moving NIH3T3 Cells

宮田, 宗明

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2010-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4804

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004804>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	宮田 宗明
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 4804 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 22 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Regulation by Afadin of Cyclical Activation and Inactivation of Rap1, Rac1, and RhoA Small G Proteins at Leading Edges of Moving NIH3T3 Cells （アフアディンによる NIH3T3 細胞の運動先端での低分子量 G タンパク質 Rap1、Rac1、RhoA の周期的な活性化、不活性化の制御）

審 査 委 員

主 査	教 授	南 康博
	教 授	匂坂 敏朗
	教 授	片岡 徹

学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Regulation by Afadin of Cyclical Activation and Inactivation of Rap1, Rac1, and RhoA Small G Proteins at Leading Edges of Moving NIH3T3 Cells

アフアディンによる NIH3T3 細胞の運動先端端での低分子量 G タンパク質 Rap1、
Rac1、RhoA の周期的な活性化、不活性化の制御

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

分子細胞生物学

(指導教員：高井 義美 教授)

宮 田 宗 明

細胞運動時には Rho、Rac、Cdc42 などの Rho ファミリー低分子量 G タンパク質は外界からの刺激に応じて周期的に活性化、不活性化され、連続的な運動先端端の形成と細胞運動を調節しているが、運動先端端におけるこれら Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の活性制御機構はまだ十分には解明されていない。今回、私はアクチン結合タンパク質のアファディンによる Rap1、Rac1、RhoA の活性調節機構と細胞運動の制御機構について検討した。

野生型の NIH3T3 細胞においては PDGF 刺激により Rap1 と Rac1 は活性化され、逆に RhoA は不活性化されて運動先端端が形成されたが、アフアディンノックダウン NIH3T3 細胞では Rap1 と Rac1 の活性化と RhoA の不活性化が抑制され、運動先端端の形成も阻害された。また、野生型に比べてアフアディンノックダウン NIH3T3 では運動能も低下していた。アフアディンノックダウン NIH3T3 細胞に恒常活性型の Rap1 (Rap1-CA) を発現させると、Rac1 の活性化は回復し、RhoA の不活性化も回復した。これにともなって運動先端端の形成は回復したが、運動能は回復しなかった。Rap1-CA を発現させたアフアディンノックダウン NIH3T3 細胞では細胞全体で Rap1-CA が発現しており、細胞の運動能には運動先端端で局所的に Rap1 が活性化されることが重要であると推測された。これらの結果から、アフアディンは Rap1 の活性化を介して Rac1 の活性化と RhoA の不活性化に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

次に、NIH3T3 細胞でアフアディンが Rap1 の活性化を制御する分子機構を明らかにするために、アフアディンと相互作用する Rap GTPase-activating protein (RapGAP) である SPA-1 に着目した。アフアディンノックダウン NIH3T3 細胞において SPA-1 をノックダウンすると、PDGF 刺激による Rap1 と Rac1 の活性化および RhoA の不活性化が回復するとともに、再び運動先端端が形成され、運動能が回復した。また、アフアディンと SPA-1 をダブルノックダウンした NIH3T3 細胞に再び SPA-1 を発現させるとアフアディンノックダウン NIH3T3 細胞と同様の表現型を示したが、RapGAP 領域を欠失した変異型の

SPA-1 を発現させても表現型は回復しなかった。これらの結果から、アフアディンは SPA-1 もしくは Rap1 と相互作用することで、SPA-1 による Rap1 の不活性化を抑制していることが明らかとなった。SPA-1 非存在下においてアフアディンは Rap1 の活性を上昇させていることや、Rap1 との相互作用領域を欠失した変異型のアフアディンは SPA-1 とは相互作用するものの、Rap1 の活性を上昇させなかったことから、Rap1 の活性化にはアフアディンと SPA-1 との相互作用よりもアフアディンと Rap1 との相互作用が重要であることが明らかとなった。さらに、NIH3T3 細胞に Rap1-CA を発現させ、アフアディンと SPA-1 との相互作用について検討したところ、アフアディンと SPA-1 との相互作用が減少しており、活性化した Rap1 がこの相互作用に対して抑制的に働いていることも明らかとなった。

一方、Rap1 が RhoA を不活性化する分子機構を明らかにするために、Rap1 により活性化される RhoGAP である ARAP1 に着目した。Rap1-CA を発現させたアフアディンノックダウン NIH3T3 細胞で ARAP1 をノックダウンすると、運動先端端は形成されなくなり、RhoA の活性も上昇した。さらに、このアフアディン、ARAP1 ダブルノックダウン NIH3T3 細胞で Rap1-CA と ARAP1 を発現させると運動先端端の形成は回復したが、Rap 結合領域または RhoGAP 領域を欠失した変異型の ARAP1 を発現させても運動先端端は形成されなかった。これらの結果より、活性化された Rap1 は ARAP1 との結合を介して RhoA を不活性化させるとともに運動先端端の形成を促進させること、および RhoA の不活性化には ARAP1 と Rap1 との結合並びに RhoGAP 活性が必要であることが明らかとなった。

このように、本研究によりアフアディンは SPA-1 や ARAP1 を介して Rap1、Rac1、RhoA の周期的な活性化、不活性化を制御することによって、連続的な運動先端端の形成と細胞運動をダイナミックに調節していることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 2 0 6 4 号	氏 名	宮 田 宗 明
論 文 題 目 Title of Dissertation	アファディンによる NIH3T3 細胞の運動先端端での低分子量 G タンパク質 Rap1, Rac1, RhoA の周期的な活性化、不活性化の制御 Regulation by Afadin of Cyclical Activation and Inactivation of Rap1, Rac1, and RhoA Small G proteins at Leading Edges of Moving NIH3T3 cells		
審 査 委 員 Examiner	主 査 南 康 博 Chief Examiner 副 査 勾 坂 敏 朗 Vice-examiner 副 査 片 岡 徹 Vice-examiner		

(要旨は1, 0 0 0 字～2, 0 0 0 字程度)

細胞運動時には Rho、Rac、Cdc42 等の Rho ファミリー低分子量 G タンパク質は外界からの刺激に応じて周期的に活性化、不活性化され、連続的な運動先端端の形成と細胞運動を調節しているが、運動先端端における Rho ファミリー低分子量 G タンパク質の活性制御機構はまだ十分には解明されていない。
今回、アクチン結合タンパク質のアファディンによる Rap1、Rac1、RhoA の活性調節機構と細胞運動の制御機構について検討した。
野生型 NIH3T3 細胞では PDGF 刺激により Rap1 と Rac1 は活性化され、逆に RhoA は不活性化されて運動先端端が形成されたが、アファディンノックダウン NIH3T3 細胞では Rap1 と Rac1 の活性化と RhoA の不活性化が抑制され、運動先端端の形成も阻害された。野生型に比べてアファディンノックダウン NIH3T3 では運動能も低下していた。アファディンノックダウン NIH3T3 細胞に恒常活性型の Rap1 (Rap1-CA) を発現させると、Rac1 の活性化も RhoA の不活性化も回復した。
これらの結果から、アファディンは Rap1 の活性化を介して Rac1 の活性化と RhoA の不活性化に重要な役割を担うことが明らかとなった。
次に、アファディンによる Rap1 の活性化制御機構を明らかにするため、アファディンと相互作用する RapGAP である SPA-1 に着目した。アファディンノックダウン NIH3T3 細胞では SPA-1 をノックダウンすると、PDGF 刺激による Rap1 と Rac1 の活性化および RhoA の不活性化が回復するとともに、再び運動先端端が形成され、運動能が回復した。また、アファディンと SPA-1 をダブルノックダウンした NIH3T3 細胞に再び SPA-1 を発現させるとアファディンノックダウン NIH3T3 細胞と同様の表現型を示したが、RapGAP 領域を欠失した変異型 SPA-1 を発現させても表現型は回復しなかった。これらから、アファディンは SPA-1 または Rap1 と相互作用し、SPA-1 による Rap1 の不活性化を抑制していると考えられる。
SPA-1 非存在下ではアファディンは Rap1 の活性を上昇させていることや Rap1 との相互作用領域を欠失した変異型のアファディンは SPA-1 とは相互作用するものの、Rap1 を活性化できなかったことから、

[illegible]