

論 文 内 容 要 旨

題目 Junctional Rab13-binding protein (JRAB) regulates cell spreading via
 filamins
(Rab13 結合蛋白質 JRAB は filamin を介して細胞の形態変化を制御
 する)

著者 Ayuko Sakane*, Ahmed Alamir Mahmoud Abdallah*, Kiyoshi Nakano,
 Kazufumi Honda, Toshio Kitamura, Issei Imoto, Natsuki Matsushita,
 and Takuya Sasaki

* These authors contributed equally to this work.

平成 25 年 9 月発行 Genes to Cells 第 18 巻第 9 号に掲載予定

内容要旨

代表的な膜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 とその活性型に特異的に結合する標的蛋白質 JRAB (junctional Rab13-binding protein) は、接着分子群の tight junction 領域への輸送を制御することで上皮細胞間接着形成に関与している。さらに、最近では、JRAB はアクチン細胞骨格の再編成の制御にも密接に関わっていることが明らかになっている。これまで、JRAB は分子内結合により closed form をとっているが、活性型の Rab13 との結合によってその分子内結合が解除され、open form への構造変化を引き起こすことがわかっている。上皮細胞集団内での位置によって JRAB はその構造を変化させ、そこで異なる機能を発揮することでアクチン細胞骨格の再編成の時空間制御を可能にしていると考えられる。本研究では、JRAB によるアクチン細胞骨格の再編成の制御機構の詳細を明らかにするため、アクチン細胞骨格のダイナミックな変化を容易に捉えることができるマウス線維芽細胞 NIH3T3 細胞を用いて解析を行った。

構造的に常に closed または open な JRAB の変異体を作製してそれぞれを NIH3T3 細胞に発現させたところ、各細胞は異なる形態を示した。Closed form の JRAB 変異体 (JRAB Δ CT) を発現させた細胞では、コントロールの細胞と同様にストレスファイバーの形成が認められたが、open form の JRAB 変異体 (JRAB Δ CC) を発現させた細胞では、cell spreading が引き起こされ、ストレスファイバーの形成は全く認められなかった。このような、JRAB の構造変化に依存したアクチン細胞骨格の再編成を引き起こす関連分子を同定するために、レトロウイルス発現系を用いて JRAB の野生型、JRAB Δ CT および JRAB Δ CC を

様式(8)

それぞれ恒常的に発現させた NIH3T3 細胞株を樹立した。それぞれのセルライセートを用いて免疫沈降法を行い、まず、actinin-1/-4 の抗体を用いてウエスタンブロットを行った。これまでに当研究室では、JRAB 結合蛋白質として actinin-1/-4 を見出していたが、本研究で、JRAB Δ CC に actinin-1/-4 が優位に免疫沈降することが確認できた。そこで、actinin-1/-4 との結合部位を欠損した JRAB Δ CC を作製し、NIH3T3 細胞に発現させて細胞の形態を観察したところ、cell spreading が認められた。したがって、JRAB Δ CC を発現させた NIH3T3 細胞で認められるアクチン細胞骨格の再編成は actinin-1/-4 非依存的なものであると考えられた。

次に、同じ免疫沈降の試料を用いて質量分析法により新たな結合分子の探索を試みた結果、JRAB Δ CC に優位に結合する分子として filamin を同定することに成功した。Filamin は cell spreading の制御に関わるという報告があることから、JRAB Δ CC を発現した細胞で認められる cell spreading は filamin を介したものである可能性が十分に予想された。そこで、JRAB の filamin 結合ドメインを決定し、その部位を欠損した JRAB Δ CC を作製して cell spreading への影響を検討した。Filamin と結合できない JRAB Δ CC を発現させた細胞では、ストレスファイバーが形成され、cell spreading は抑制されていた。また、filamin は ASB2 (ankyrin repeat and SOCS box protein2) によって細胞内で蛋白質分解されることが知られているが、この ASB2 を JRAB Δ CC と共に発現させた場合、JRAB Δ CC によって引き起こされる cell spreading が有意に抑制された。

以上の結果から、JRAB は open form になると、新規 JRAB 結合蛋白質である filamin を介してアクチン細胞骨格の再編成を制御し、cell spreading を引き起こすと考えられた。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 1174 号	氏名	Ahmed Alamir Mahmoud Abdallah
審査委員	主査 勢井 宏義 副査 泉 啓介 副査 松本 満		

題目 Junctional Rab13-binding protein (JRAB) regulates cell spreading via filamins
(Rab13 結合蛋白質 JRAB は filamin を介して細胞の形態変化を制御する)

著者 Ayuko Sakane*, Ahmed Alamir Mahmoud Abdallah*, Kiyoshi Nakano, Kazufumi Honda, Toshio Kitamura, Issei Imoto, Natsuki Matsushita, and Takuya Sasaki

* These authors contributed equally to this work.

平成 25 年 9 月発行 Genes to Cells 第 18 巻第 9 号に掲載予定
(主任教授 佐々木 卓也)

要旨 代表的な膜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 とその活性型に特異的に結合する標的蛋白質 JRAB (junctional Rab13-binding protein) は、接着分子群の Tight junction 領域への輸送を制御することで上皮細胞間接着形成に関与している。これまで、申請者の所属するグループは、JRAB は分子内結合により closed form をとっているが、活性型 Rab13 との結合によってその分子内結合が解除され、open form へと構造を変化させることを示している。さらに、最近、JRAB がアクチン細胞骨格の再編成に関与することも報告している。本研究では、JRAB によるアクチン細胞骨格の制御機構を明らかにするため、アクチン細胞骨格の変化を容易に捉えることができるマウス線維芽細胞 NIH3T3 細胞を用いて解析を行った。

構造的に常に closed または open な JRAB の変異体を作製して NIH3T3 細胞に発現させたところ、closed form を発現させた細胞では、コントロールの細胞と同様にストレスファイバーの形成が認められたが、open form を発現させた細胞では、cell spreading が引き起こされ、ストレスファイバーの形成は認められなかった。次に、JRAB の野生型、closed form および open form の変異体をそれぞれ恒常的に発現させた細胞株を樹立し、それぞれのセルライゼットを用いて JRAB の免疫沈降を行った。これまでに申請者の所属するグループでは、JRAB 結合蛋白質として actinin-1/-4 を見出していたが、本研究で、open form の JRAB 変異体と共に actinin-1/-4 が優位に免疫沈降することが確認できた。しかし、actinin-1/-4 との結合部位を欠損した open form の JRAB 変異体を発現させた細胞でも cell spreading が認められたことから、open form によるアクチン細胞骨格の制御は actinin-1/-4 非依存的なものであると考えられた。さらに、同じ免疫沈降物を用いて LC-MS/MS 解析を行って新たな JRAB 結合分子の探索を試みた結果、open form の変異体に優位に結合する分子として filamin を見出した。そこで、JRAB の filamin 結合ドメインを決定し、その部位を欠損した open form の変異体を細胞に発現させたところ、cell spreading は完全に抑制された。また、filamin を細胞内で蛋白質分解する ASB2 を JRAB open form と共に発現させた場合も cell spreading が抑制された。

以上の結果から JRAB は open form になると filamin に結合してアクチン細胞骨格を制御し、cell spreading を引き起こすことが明らかになった。本研究の成果は、JRAB によるアクチン細胞骨格の制御機構を明らかにしただけでなく、細胞の形態変化が支える細胞運動等の種々の細胞機能の分子基盤の理解において重要な意義を有していると考えられ、学位授与に値するものと判定した。