

## 論文の内容の要旨

論文題目 細胞運動を制御する新規 RhoA 活性化調節タンパク質の同定

指導教員名 清木元治

専攻名 病因・病理学専攻

入進学年 平成16年4月1日入学

氏名 星野 大輔

Rho GTPase は、様々な細胞機能の調節に関与するため、その活性は時空間的に厳密に制御される必要がある。このため Rho 活性化は guanine nucleotide exchange factors (GEFs)、GTPase activating proteins (GAPs) により厳密に調節されている。Rho と GEFs の結合は Rho guanine nucleotide dissociation inhibitors (RhoGDI) により負に制御されている。さらに、細胞周期調節タンパク質である p27<sup>kip1</sup> も RhoA と結合することで GEFs との結合を阻害することが報告されているが、p27<sup>kip1</sup> による RhoA 活性化抑制メカニズムは不明である。本研究では、新規 RhoA 活性化調節タンパク質 P27RF-Rho に注目し機能解析した。P27RF-Rho を発現させると cdc42、Rac の活性化には影響を及ぼさないが RhoA 特異的に活性化が亢進した。さらに P27RF-Rho は RhoGDI とは結合しないが、p27<sup>kip1</sup> と直接結合し RhoA を p27<sup>kip1</sup> から解離させることを見出し、p27<sup>kip1</sup> 非結合型 RhoA は GEFs が結合可能となり活性化が亢進する。shRNA を用いて内在性 P27RF-Rho をノックダウンしたところ、p27<sup>kip1</sup> と RhoA 複合体が増加し、LPA、PMA 刺激による RhoA 活性化が減少した。一方、siRNA により内在性 p27<sup>kip1</sup> をノックダウンすると RhoA 活性化が亢進し、この際 P27RF-Rho を発現させても RhoA 活性化はこれ以上増加しなかった。このことから、P27RF-Rho は p27<sup>kip1</sup> 経路を介して RhoA 活性化を制御していることが明らか

になった。内在性 P27RF-Rho はベシクル様局在を呈し、アクチン凝集体と共局在することを見出した。このアクチン凝集体は浸潤突起と呼ばれ浸潤の際に形成される突起であり、浸潤装置として浸潤に重要な役割を果たすことが多数報告されている。実際に、P27RF-Rho は浸潤突起マーカーであるコルタクチン及びアクチンと共局在することを確認し、さらに P27RF-Rho と MT1-MMP が共局在することも明らかにした。P27RF-Rho は RhoA 活性化を制御すること、浸潤突起に局在することから、P27RF-Rho のマトリゲル浸潤への影響を調べた。P27RF-Rho を発現させた細胞は、マトリゲル浸潤能が増加し、ROCK 阻害剤を加えることで P27RF-Rho による浸潤亢進が抑制された。一方、内在性 P27RF-Rho を発現抑制するとマトリゲル浸潤能が減少した。以上のことから、P27RF-Rho は MT1-MMP の近傍に局在し p27<sup>kip1</sup> と直接結合することによって p27<sup>kip1</sup> 非結合型 RhoA を増加させる。つまり、MT1-MMP 近傍で RhoA 活性化の場を用意することで、アクチンストレスファイバーによる細胞極性制御を制御しているモデルが考えられる。RhoA は、癌を含む様々な病気に関与することが知られているため、P27RF-Rho がこれらの病気の治療に大いに貢献する可能性がある。