

令和4年度 共同研究報告書

|                                    |       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |             |             |
|------------------------------------|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|-------------|
| 研究区分                               |       | 一般共同研究                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |             |             |
| 研究課題名                              |       | 癌細胞及び正常細胞におけるホスファチジルイノシトールによる FiiGAP の機能制御機構の解析                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |             |             |
| 新規・継続の別                            |       | 新規 ・ <span style="border: 1px solid black;">継続</span>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |             |             |
| 研究代表者                              | 所属    | 北里大学理学部<br>生物科学科                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | 40 歳<br>以下○ | 35 歳<br>以下○ |
|                                    | 職名・氏名 | 講師・斉藤 康二                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |             |             |
| 研究分担者<br>(適宜行を追加し<br>て下さい)         | 所属    | 北里大学大学院理学研究科                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <div></div> | <div></div> |
|                                    | 職名・氏名 | 大学院生・小澤 咲乃                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |             | ○           |
|                                    | 所属    | 北里大学大学院理学研究科                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      | <div></div> | <div></div> |
|                                    | 職名・氏名 | 大学院生・竹村 衣咲                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |             | ○           |
| 受け入れ教員                             | 職名・氏名 | 教授・田中 一馬                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |             |             |
| 概要<br>(100～150 字程度)                |       | 本研究は、癌細胞および正常細胞(腎糸球体上皮細胞:ポドサイト)における細胞膜ホスファチジルイノシトール(PI)による FilGAP の機能制御機構の解明を目的とする。本年度は、癌細胞の浸潤突起およびポドサイトの突起構造における FilGAP の局在観察を共通実験装置(共焦点顕微鏡)を用いて行なった。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |             |             |
| 研究目的<br>(300 字程度)                  |       | 研究代表者は、細胞の形態維持・変化や細胞運動に関わる Rac 1 の不活化因子である FilGAP に着目して研究を行なっている。これまでに、FilGAP がその Pleckstrin-homology (PH) ドメインを介して細胞膜リン脂質であるホスファチジルイノシトール(PI)三リン酸 PI (3, 4, 5)P <sub>3</sub> や二リン酸 PI (3, 4)P <sub>2</sub> と結合すること、その結合が細胞膜への局在化に関与することを明らかにしている(Saito et al., <i>FASEB J</i> , 2021; Kawaguchi et al., <i>J Bio Chem</i> , 2014)。しかし FilGAP とこれら PI の結合が癌細胞や正常細胞で時空間的にどのように制御され、その機能が調節されているかは不明な点が多い。本研究は、1) 癌細胞が組織内に浸潤するときに形成する浸潤突起、2) 正常細胞である腎糸球体上皮細胞(ポドサイト)の濾過機能に必須の突起構造における FilGAP と細胞膜 PI 分布の局在関係に焦点を当てた。 |             |             |
| 研究内容・成果<br>(1000 字程度・Web 会議の回数も記載) |       | 2022 年 7 月 27-29 日に研究所を訪問し、共通実験装置を用いて以下の成果を得た。また、訪問に先立ち、Web 会議を 1 回実施した。<br>1) 癌細胞の浸潤突起の観察<br>乳癌などのある種の上皮由来癌細胞が組織内を運動するとき、FilGAP は PI (3, 4, 5)P <sub>3</sub> が分布する細胞先端の突起に局在する(Saito et al., <i>FASEB J</i> , 2021)。研究代表者は、FilGAP が癌細胞の先端突起に局在する上で PI (3, 4, 5)P <sub>3</sub> との結合が重要であることを明らかにしている(Saito et al., <i>FASEB J</i> , 2021)。一方、癌細胞は組織                                                                                                                                                               |             |             |

|    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|----|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    | <p>内に浸潤するとき、その浸潤に必須の浸潤突起と呼ばれる構造体を形成する。本年度はまず、浸潤突起を形成した癌細胞における FilGAP の細胞内局在を、研究所内で所有する共焦点顕微鏡 (Olympus FV-1000 および Zeiss LSM980 with Airyscan2) を用いて解析した。なお事前に、岸本拓磨助教 (田中研究室) と Web 会議で議論した上で、観察する免疫染色サンプルを準備した。その結果、ラット乳癌細胞株である MTnL3 において、浸潤突起に FilGAP が局在する様子が観察された。この浸潤突起の細胞膜には PI (3, 4) P<sub>2</sub> が分布していることが知られている。そこで浸潤突起における FilGAP と PI (3, 4) P<sub>2</sub> の局在を調べた。その結果、FilGAP と細胞膜 PI (3, 4) P<sub>2</sub> のプローブである GFP-TAPP1 PH ドメインとの共局在が浸潤突起で観察された。今後 (来年度)、浸潤突起における FilGAP の局在化に PI (3, 4) P<sub>2</sub> との結合が重要かどうか、PI (3, 4) P<sub>2</sub> と結合しない FilGAP の変異体 (R39C) や PI (3, 4) P<sub>2</sub> 産生を阻害する薬剤 (SHIP2 阻害剤) を用いて解析する予定である。</p> <p>2) ポドサイトの突起構造の観察</p> <p>ポドサイトは腎臓の濾過機能を担う細胞である。ポドサイトが正常に機能する上で重要なことが濾過に必須の突起構造を形成することである。研究代表者は、FilGAP がポドサイトで高発現していること、FilGAP がその突起構造の形成に重要な役割を果たしていることを <i>in vitro</i> 培養系で明らかにしている。しかし、ポドサイトの突起構造における FilGAP の局在や細胞膜 PI との関連は不明である。そこで本年度はまず、上記同様共焦点顕微鏡を用いてポドサイトにおける FilGAP の局在を調べた。その結果、突起形成を誘導したラットポドサイト C7 細胞株において、突起構造の基底面側に形成された接着斑 (細胞-基質接着に関与) に FilGAP が一部局在している様子が観察された。今後 (来年度)、未だ不明であるポドサイトの細胞膜 (特に突起構造) における PI の分布、並びに FilGAP と PI 分布の局在関係について明らかにしていく予定である。</p> |
| 成果 | <p>【学会報告】二重下線 研究代表者、下線 研究分担者</p> <p>(1) <u>小澤咲乃</u>, <u>斉藤康二</u>, 千葉陽介, 尾籠遼也, 畠山裕康, 高橋倫子, 太田安隆. RacGAP 因子 FilGAP は乳がん細胞において浸潤突起形成を制御する. 日本分子生物学会年会, 2022 年 12 月 1 日 (千葉).</p> <p>(2) <u>斉藤康二</u>, 與川正治, 水田さり, 多田奏絵, 小田萌紀, 畠山裕康, 高橋倫子, 栗原秀剛, 太田安隆. RacGAP 因子 FilGAP は腎糸球体上皮細胞の細胞-基質接着と突起形成を制御する. 日本生化学会大会, 2022 年 11 月 11 日 (名古屋).</p> <p>(3) 森真美子, <u>斉藤康二</u>, 田村杜萌, 梅川恵美, 大槻繭子, 倉野桃子, 柴垣芳夫, 服部成介, 畠山裕康, 高橋倫子, 太田安隆.</p>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |

|  |                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|--|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | <p>Septin2 は ARHGAP25 と結合し、葉状仮足形成と細胞伸展の抑制を制御する. <i>日本生化学会大会</i>, 2022 年 11 月 10 日 (名古屋).</p> <p>(4) <u>斉藤康二</u>, 與川正治, 水田さり, 多田奏絵, 小田萌紀, 畠山裕康, 高橋倫子, 栗原秀剛, 太田安隆. RacGAP 因子 FilGAP は腎ポドサイトの細胞-基質接着と突起形成を制御する. <i>日本生物物理学会年会</i>, 2022 年 9 月 28 日 (函館).</p>               |
|  | <p>【論文発表】二重下線 研究代表者</p> <p>Mamiko Mori, <u>Koji Saito</u>, Ayano Sekine, Rio Hasebe, Yasutaka Ohta. Endosomal localization of RacGAP protein ARHGAP22 regulates its GAP activity in melanoma cells <i>Anticancer Research</i>, vol.42, p5763-5771, 2022. (IF=2.435)</p> |
|  | <p>【新聞報道】</p> <p>該当なし</p>                                                                                                                                                                                                                                               |