

# Coordinated changes in cell membrane and cytoplasm during maturation of apoptotic bleb

青木, 佳南

<https://hdl.handle.net/2324/4110395>

---

出版情報 : Kyushu University, 2020, 博士 (理学), 課程博士  
バージョン :  
権利関係 :

氏 名 : 青木佳南

論 文 名 : Coordinated changes in cell membrane and cytoplasm during  
maturation of apoptotic bleb  
(アポトーシス進行中の Bleb における形質膜と細胞質の協調的な変化)

区 分 : 甲

## 論 文 内 容 の 要 旨

細胞の形質膜は常にアクチン細胞骨格により裏打ちされている。一時的にアクチン細胞骨格の裏打ちが失われることにより生じる形質膜の球状突起構造は **Bleb** と呼ばれ、アポトーシスを始めとして発生初期における始原生殖細胞の遊走や 3 次元環境下におけるがん細胞の浸潤・転移時など、幅広い生物種・細胞現象において観察される。アクチンの裏打ち構造を持たない **Bleb** は、細胞内圧により拡大を続けるが、急速なアクチン骨格の再集積が起こることによりやがて退縮に転じることが分かっている。しかしながら、**Bleb** 形質膜直下へのアクチン骨格の再集積を引き起こし、**Bleb** の退縮を開始させる分子メカニズムについては、ほとんど明らかになっていない。

先行研究において私は、**Bleb** の形成・退縮過程においてアクチンの再集積を制御するシグナル経路の同定を目的とし、ヒト大腸がん細胞株である **DLD1** 細胞の遊走の際に形成される **Bleb** をモデルとしたライブイメージング解析を行った。まず、**Bleb** におけるアクチン関連分子の局在のスクリーニングを行った結果、アクチン結合タンパク質である **Eps8** が **Bleb** 退縮時にのみ形質膜直下へ局所的に集積することを見出した。また、**Eps8** の結合相手であり、アクチンと形質膜を繋ぐ分子である **Ezrin** も、**Eps8** の集積部位で局所的に活性化していることが分かった。**Ezrin** と **Eps8** が **Bleb** の制御に関与していることを確認するため、**Ezrin** をノックアウトした **DLD1** 細胞を作成し、**Bleb** 形態の変化を定量的に検証した。その結果、**Ezrin** のノックアウトにより **Eps8** の形質膜への集積は阻害され、アクチンの再集積速度や **Bleb** の退縮速度が大きく減少することが明らかとなった。

次に、**Ezrin**-**Eps8** 経路の上流分子の探索を行い、**Ezrin** を活性化することが知られる **ROCK** とその上流分子である活性化型 **RhoA** が、**Eps8** と同様に **Bleb** 退縮時に形質膜へ局所的に集積することを見出した。このことから、**Bleb** 退縮時には **RhoA**-**ROCK** 経路が活性化することにより、**Ezrin** の活性化や **Eps8** の集積を促進していると考えられる。さらに、**RhoA** を抑制する分子である **p190BRhoGAP** とその上流分子である **Rnd3** が、**Bleb** 形成時には形質膜直下へ集積する一方で、**Bleb** 退縮時には形質膜から排除されることを見出した。**Rnd3** は **RhoA**-**ROCK** 経路を抑制する機能を持つが、**ROCK** により **S240** 部位がリン酸化を受けることで形質膜から排除され、その機能が抑制されることが分かっている。そこで、**ROCK** によるリン酸化を受けない常時活性化型変異体である **Rnd3 S240A** 変異体を **DLD1** 細胞で過剰発現させると、**Ezrin** ノックアウト細胞と同様に **Eps8** の集積が起こらず、アクチンの再集積速度や **Bleb** 退縮速度は減少することが分かった。

以上の結果より、**Bleb** 形質膜直下において、**Rnd3**-**p190BRhoGAP** 経路が優位な状態から **RhoA**-**ROCK** 経路が優位な状態へと急速に切り替わることが分かった。そして、この **Rnd3** と **RhoA** の相互拮抗的なフィードバック機構が、**Ezrin** の活性化と **Eps8** の集積を制御し、最終的にアクチンの再集積を促進することで **Bleb** の退縮を開始させることが先行研究において明らかとなった。

本研究において私は、これらの分子ネットワークに基づいて数理モデルを構築し、Bleb の挙動や各分子の活性化レベルのシミュレーションを行った。その結果、数理モデルにより Bleb のダイナミクスを記述することができ、Rnd3 と RhoA の相互拮抗的なフィードバック機構が Bleb の制御において中心的な役割を果たしていることが示唆された。

次に、生体内で観察される他の Bleb においても同様の分子機構が機能しているかを明らかにする目的で、アポトーシスの際に観察される Bleb に着目し、その形成退縮のメカニズムを解析した。

細胞遊走時に形成される Bleb は、そのサイズが一定であるのに対し、アポトーシスの際に形成される Bleb は、初期には小型の Bleb が形成されるが、アポトーシスの進行に伴い大型化するという形態学的な特徴を示す。アポトーシス時の Bleb における Rnd3 と RhoA の局在を確認したところ、細胞遊走時の Bleb と同様に、拡大時には Rnd3 が、退縮時には活性化型 RhoA が形質膜に集積しており、アポトーシス時の Bleb においても Rnd3 と RhoA のフィードバック機構が機能していることが確認できた。

また、アポトーシスの初期に観察される Bleb が小型化するメカニズムとして、アポトーシスの際に活性化されるカスパーゼによって ROCK1 が切断され、常時活性化型をとることが重要な役割を果たすことを明らかにした。ROCK1 の常時活性化型変異体を過剰発現させると、アポトーシス初期の Bleb と同様に小型化した Bleb が形成されることを見出した。また、先に構築した数理モデルにおいて、カスパーゼによる ROCK1 の活性化を考慮したシミュレーションを行った結果、アポトーシスの初期に観察される Bleb の小型化を再現できた。

最後に、アポトーシス後期における Bleb の大型化の制御機構について検討した。アポトーシス進行に伴い大型化した Bleb 内には、断片化した核内成分であるダメージ関連分子パターン (Damage-associated molecular patterns : DAMPs) が集積するようになる。これにより、炎症の誘導因子として機能する DAMPs が細胞外へ拡散するのを抑制して炎症を防ぐ他、Bleb 内に突起状にため込まれた DAMPs が食細胞により認識されることで、アポトーシス細胞の速やかな排除が可能になる。このことから、アポトーシスの過程で Bleb が大型化することには生理的に重要な意義があると考えられている。アポトーシス時の Bleb が大型化する様子を経時的に観察した結果、形質膜直下のアクチンと、主に形質膜内層に局在する脂質であるホスファチジルイノシトール(4,5)ビスリン酸 (PtdIns(4,5)P2) が、アポトーシスの進行に伴い減少することを見出した。一方、形質膜外層の PtdIns(4,5)P2 は、アポトーシス後期において増加していた。PtdIns(4,5)P2 には、前述した Ezrin などのアクチン係留タンパク質が結合することが知られているため、アポトーシス進行時に内層の PtdIns(4,5)P2 が外層へ移行することで、形質膜直下におけるアクチンの減少とそれに伴う Bleb の大型化を引き起こしていると考えた。そこで、形質膜内層・外層の脂質を移動させる分子であるスクランブラーゼの関与について検討したところ、カスパーゼにより活性化を受けるスクランブラーゼの一種である Xkr8 の常時活性化型変異体を過剰発現することで、アポトーシス後期と同様に PtdIns(4,5)P2 の形質膜外層への移行と Bleb の大型化が起こることを見出した。これらの結果から、アポトーシス後期において、カスパーゼにより Xkr8 が切断されて活性化することで、PtdIns(4,5)P2 が内層から外層へ移行し、形質膜直下のアクチンの減少と Bleb の大型化を引き起こすことが明らかになった。

以上の結果から、私が見出した RhoA と Rnd3 によるフィードバック機構は、細胞遊走やアポトーシスの際に形成される Bleb を制御する普遍的な分子機構であることが明らかとなった。また、アポトーシス時の Bleb においては、RhoA-Rnd3 による制御に加えて、カスパーゼによる ROCK1 や Xkr8 の活性化が並行して起こることにより、Bleb の経時的なダイナミクスの変化が引き起こされていることが分かった。