

主論文の要旨

**Silencing of TBC1D15 promotes  
RhoA activation and membrane blebbing**

〔 TBC1D15のサイレンシングはRhoA活性及び  
細胞膜のblebbing形成を促進する 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 細胞情報医学専攻  
腫瘍病態学講座 腫瘍生物学分野

(指導：千賀 威 准教授)

高原 悠子

## 【緒言】

細胞は様々な生理的条件下において、blebbing と呼ばれるダイナミックに突出と退縮を繰り返さず細胞膜突起を形成する。細胞膜の blebbing は主に RhoA を介したアクチン細胞骨格の再構築によって制御されている。RhoA 及びそのエフェクターキナーゼである ROCK の活性化はアクチンミオシンの収縮を誘発するミオシン軽鎖のリン酸化を促進しており、これまでの研究から RhoA-ROCK 経路は細胞膜の blebbing に重要であり、この経路の阻害により細胞膜の突出が抑制されることが報告されているが、詳細なメカニズムはいまだ不明である。

Tre2-Bub2-Cdc16 (TBC) ドメイン保有タンパク質は低分子量 GTP 結合タンパク質のひとつである Rab 特異的な GTPase 活性タンパク質であることが知られており、TBC ドメインのアルギニン残基が GAP 活性に不可欠であることが報告されている。Rab タンパクとそのエフェクターとの結合・遊離は GDP-GTP の交換（活性化）及び GTP の加水分解（不活化）によって厳格に制御されている。ヒトでは 50 以上の TBC ドメインを保有するタンパク質が同定されているが、その機能は明らかとなっていないものが多い。TBC ドメインを保有する TBC1D15 は GTP Rab7、Rab11 の加水分解を促進するタンパク質である。TBC1D15 はミトコンドリアの形態制御や幹細胞の再生に関与することが報告されているが、その機能は不明な点が多い。今回、我々は TBC1D15 が RhoA の活性及び細胞膜の blebbing 形成に関与していることを報告する。

## 【方法】

2 種類の TBC1D15siRNA を HeLa 細胞に導入し、細胞形態の変化を観察した。各種変異型細胞株は各 cDNA をコードした pQCXIP ベクターをレトロウイルスの感染によって作成した。Rho GTPase 活性は GST-Rhotekin-RBD 融合蛋白質を用いた pull down assay によって検出した。他の実験は一般的な方法に則って行った。

## 【結果】

Control siRNA を導入した場合には blebbing が生じた細胞数の割合が 5%以下であったのに対し、TBC1D15 siRNA を導入することにより約 30%に増加した (Fig1a, b)。siRNA の非特異的効果でないことを確認するため、siRNA 耐性の TBC1D15 を用いて相補実験を行った結果、blebbing の増加は観察されなかった (Fig2b, c) ことから、TBC1D15 は blebbing の抑制に必要であることが示唆された。

一方、RhoA の活性化は blebbing の促進に重要であることが報告されている。そこで、TBC1D15 siRNA を導入した際の RhoA の活性化の有無を検討したところ、TBC1D15 の発現を抑制した細胞で RhoA の活性化が検出された (Fig3a)。さらに、TBC1D15siRNA を導入した細胞に、Rho により活性化される ROCK の阻害剤を作用させ、time-lapse 顕微鏡で細胞形態の経時的観察を行った。TBC1D15siRNA 導入により約 30%の細胞で観察された blebbing が ROCK 阻害剤の投与により、コントロールと同程度の 5%以下にまで顕著に抑制された (Fig3b)。このことから、TBC1D15 発現抑制による blebbing 形成に

RhoA-ROCK 活性化は不可欠であることが示唆された。

また、TBC1D15 の TBC ドメインは Rab7、Rab11 の GTP 加水分解を促進し、不活化することが報告されていることから、TBC1D15 を抑制することによって Rab7、Rab11 が活性化されると推測された。そこで、活性型の Rab7 及び Rab11 を HeLa 細胞に発現させたが、blebbing の増加は観察されなかった。

次に、TBC1D15 の GAP 活性が blebbing に関与するかを検討した。GAP 活性を保持もしくは欠損した siRNA 耐性の TBC1D15 を発現した細胞を作成し、TBC1D15siRNA を導入したが、GAP 活性のある細胞株と活性のない細胞株において blebbing の抑制程度に差はみられなかったことから TBC ドメインの GAP 活性の有無と blebbing の関連性は認められなかった (Fig3d)。さらに、siRNA 耐性の TBC1D15 の TBC ドメインを欠損あるいは TBC ドメインのみを発現した細胞株を作成し、TBC1D15siRNA を導入し、blebbing が生じている細胞数をカウントした。TBC ドメインを欠損した細胞では blebbing の抑制がみられたが、TBC ドメインを保持した細胞では抑制されなかった (Fig3d)。このことから、TBC1D15 発現抑制により生じる細胞膜の blebbing には TBC1D15 の TBC ドメインは以外の部分に関与していることが示唆された。

blebbing の形成促進に加え、TBC1D15siRNA の導入により多核細胞が観察された。コントロールでは多核細胞数が全体の約 2%であったのに対し、TBC1D15siRNA を導入すると 10%以上で多核細胞がみられた (Fig4a)。細胞分裂のどの段階に異常が起きているか調べるために time-lapse 顕微鏡で観察した。TBC1D15 siRNA を導入した細胞では分裂後期において、細胞分裂溝の異常な形成が認められた (Fig4c)。これらの細胞は正確な分裂溝の形成ができず、その結果多核となると考えられる。また、RhoA は細胞分裂溝の形成に重要な因子であり、分裂後期において赤道面に局在し、細胞分裂溝の形成と陥入を促進する。そこで、TBC1D15 siRNA を挿入した細胞で分裂後期の RhoA の局在を免疫染色にて観察したところ、赤道面に RhoA の局在がみられないあるいは赤道面の一方でしかみられないものが観察された (Fig4d)。これらのことから TBC1D15 は細胞分裂溝の形成において分裂後期での RhoA の適切な局在に必要であることが示唆された。

## 【考察】

今回、我々は TBC1D15 が細胞膜の blebbing の形成及び細胞分裂に関与していることを明らかにした。これまで、RhoA 及び ROCK の活性化は blebbing の促進において重要な役割を担うことが報告されているが、今回の研究において TBC1D15 の発現抑制により、RhoA の活性化が検出されたこと、及び、生じた blebbing が ROCK 阻害剤投与により消失したことから TBC1D15 が関与する blebbing は RhoA を介して生じていることが示唆された。

一方、RhoA は ROCK や MLCK を活性化し、それに続いてミオシン II を活性化することによって細胞分裂を促進している。TBC1D15 発現抑制によって生じた多核細胞は細胞分裂後期に分裂異常がみられ、細胞分裂溝への RhoA の局在異常が一因であることが示

唆された。

以上のことより、TBC1D15 は正常な細胞形態の維持において役割を担うことが新たに示された。

#### **【結語】**

今回の研究から、TBC1D15は細胞膜の blebbing の抑制に不可欠な役割を担っており、TBC1D15 発現抑制により生じる blebbing は RhoA の活性化によることが示された。今後、TBC1D15 が RhoA を制御するメカニズムをさらに検証することで RhoA 活性及び細胞膜の blebbing の新たな制御機構、RhoA を介した細胞分裂制御機構が明らかになると考えられる。