

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590315

研究課題名(和文)

APC 活性化因子 *cdh1* を介した細胞移動・浸潤制御の可能性に関する研究研究課題名(英文) The role of Anaphase-Promoting Complex (APC) Activator *Cdh1* on cell motility

研究代表者

國仲 慎治 (KUNINAKA SHINJI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：10404336

研究成果の概要(和文): 細胞周期や分化への関与が知られていたユビキチンリガーゼ複合体 APC の活性化因子 *Cdh1* が *Rho* を介した細胞骨格並びに細胞移動制御にも関与することを明らかにした。*Cdh1* は *Rho* GAP である *p190* を分解することで *Rho* 活性を正に制御していた。また *Cdh1* 欠失マウスは *Rho* の重要な下流因子である *Rho* キナーゼ欠失マウスと類似した表現形を呈することから、個体レベルでも *Cdh1* と *Rho* の機能相関が示唆された。

研究成果の概要(英文): *Cdh1* is an activator of the anaphase promoting complex/cyclosome and contributes to mitotic exit and  $G_1$  maintenance by targeting cell cycle proteins for degradation. Here, we found a novel function for *Cdh1* as a regulator of *Rho*. The GTP-bound active *Rho* protein was apparently decreased in the *Cdh1*-depleted cells. *Cdh1* formed a physical complex with the *p190* protein, a major GAP for *Rho*, and stimulated the efficient ubiquitination of *p190*, both in *in vitro* and *in vivo*. The motility of *Cdh1*-depleted cells was impaired; however, co-depletion of *p190* rescued the migration activity of these cells. Moreover, homozygous *Cdh1* gene-trapped mouse embryos exhibited similar phenotypes to those observed for *Rho*-associated kinase I and II knockout mice, suggesting the *in vivo* significance of *Cdh1/p190/Rho* axis.

交付決定額

(金額単位:円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,200,000 | 360,000   | 1,560,000 |
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000   | 1,430,000 |
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000   | 1,560,000 |
| 総計     | 3,500,000 | 1,050,000 | 4,550,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態医化学

キーワード：*Cdh1*, APC, *Rho*, *p190*

## 1. 研究開始当初の背景

1) 癌転移に関して：転移は癌進展の非常に重大な成因であると共に癌死の最も大きな原因でもある。転移は癌細胞が周囲組織に浸潤して、血管・リンパ管内へ進入して遠隔部に移動した後、再び組織内へ浸潤して新しい病巣を形成するといった非常に多くの過程を経て成立する。その各々の段階では、癌細

胞のみならず周囲の間葉系細胞なども複雑に相互作用していると考えられ、関与する様々な分子が同定されている。その中でも細胞の移動・浸潤には細胞骨格の制御が重要であり、それには *Rho* GTPase family が大きく関与していることは良く知られている。*RhoA* はアクチン線維束や接着班形成を正に制御しており、その細胞内での時空間制御は癌細

胞の移動・浸潤に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。その RhoA の活性化制御は GEF や GAP だけではなく RhoA 自身のユビキチン化によることが報告された。すなわち RhoA は、polarity complex (PAR6-aPKC) によって細胞の進行方向先端 (leading edge) にリクルートされてきた E3 ubiquitin ligase である Smurf1 によって分解に導かれ、その結果、移動・浸潤に必要な細胞突起が伸張する。さらに、癌細胞においても同様に Smurf1 が RhoA を細胞の辺縁部分で分解することで、細胞移動・浸潤を制御していることが最近明らかになっている。この様に、細胞骨格制御因子のユビキチン化は細胞の移動・浸潤のプロセスに重要な役割を果たしている。

2) APC/cdh1 に関して: cdh1 は細胞分裂後期より G1 期まで APC を活性化し、cyclin B などの M 期サイクリンをユビキチン化させ分解に導くことで CDK1 活性の調整を介して細胞分裂を制御していることが知られている。また最近、ロックアウトマウスなどを用いた解析より、哺乳類動物細胞でも酵母と同様に単一の CDK(cyclin dependent kinase; この場合 CDK1) のみで細胞周期進行を制御することが報告された。この細胞周期制御の基本的なキナーゼである CDK1 活性を制御することから APC/cdh1 の重要性が明らかになりつつある。これまでの cdh1 の機能解析は主に酵母、ショウジョウバエなどの無脊椎動物やアフリカツメガエル卵抽出物を用いた系で解析されていた。申請者の所属する研究室ではニワトリ B リンパ球 DT40 を用い、高等脊椎動物細胞による cdh1 研究を世界に先駆け行い、cdh1 の間期チェックポイントへの関与を明らかにした。また cdh1 は細胞骨格がダイナミックに再構築され、invitro において 2 次元上平坦な細胞が球状に変化する細胞分裂期に機能している。細胞分裂での細胞形態変化においても RhoA が関与していることが知られている。しかしながら、その際の RhoA 活性制御は CDK1 による Rho-GEF または Rho-GAP を介する間接的なものといわれ、上記の細胞移動におけるような RhoA 自身への直接的な修飾の関与は報告されていない。また、アクチン収縮環形成がみられる細胞質分裂期には RhoA が活性化していることが知られているが、分裂した 2 つの細胞が再び培養皿に付着するには、その活性が阻害されなければならない。その活性抑制機構はまだ明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

癌細胞の周囲組織への浸潤は癌転移の最初のステップであり、その制御機構を理解することは、癌転移メカニズムの解明に重要な意義を与えるものと考えられる。一方、受精卵

の子宮への着床は胎盤を介して行われ、その際には子宮壁への胎盤組織の浸潤が見られる。この母体にとっては異物ともいえる受精卵由来である胎盤の子宮筋層への浸潤は、生体にとっての異物である癌の局所浸潤と様々な面で相関する機構によるものであるという、大変興味深い指摘がある。申請者は細胞周期進行において重要な役割を果たすユビキチンリガーゼ複合体 APC (Anaphase promoting complex) の活性化因子 cdh1 の機能を哺乳類個体レベルで明らかにする目的で cdh1 gene trap (GT) マウスを解析してきた。その結果、Homo-trap (Cdh1<sup>GT/GT</sup>) マウスは胎生 13.5 日齢までに全例死亡することが明らかになった。さらに解析を進めていくと胎生致死の原因が、胎児自身の異常ではなく胎盤に由来するものであり、Homo-trap 胎盤では子宮筋層浸潤への重要な役割を果たすと考えられている trophoblast giant cell (TGC) が胎生 12.5~13.5 日齢では消失していることを見出した。この結果は、胎児とは異なる系列で胎盤へと分化していく trophoblast 細胞の発生とその機能の維持に cdh1 が重要な役割を果たしていることを示唆するものと考えられる。また、申請者は Homo-trap cdh1 由来の胎生線維芽細胞 (MEF) の 2 次元培養上での動態を time-laps microscopy で観察する予備的実験で、Homo-trap MEF では正常対照にくらべ、細胞の運動性が著明に減少している結果を得た。またこれらの細胞は、移動方向後端 (rear end) の運動性が低下し、RhoA を介した細胞後端の退縮に影響があることが予想された。すなわち、TGC の子宮筋層への浸潤に係わる細胞運動能に cdh1 は細胞骨格制御を介して関与している可能性があると考えられる。そこで本研究はその仮説を検証し、細胞周期進行制御の鍵分子である cdh1 の新たな機能を明らかにすることを目的として立案した。

## 3. 研究の方法

Cdh1<sup>GT/GT</sup> マウスやその MEF、RNAi を用いた Cdh1 ノックダウン細胞などを用いて、以下の 5 点の解明を中心に研究を行った。

- 1) Cdh1<sup>GT/GT</sup> MEF の細胞骨格の変化
- 2) 細胞骨格変化に伴う small G 蛋白活性化の有無
- 3) 細胞骨格変化を招来する Cdh1 基質の同定
- 4) Cdh1 が細胞移動能に及ぼす影響の解析
- 5) Cdh1<sup>GT/GT</sup> マウスの発生異常解析

## 4. 研究成果

1) Cdh1<sup>GT/GT</sup> MEF の細胞骨格の変化  
野生型と Cdh1<sup>GT/GT</sup> の MEF 細胞骨格を rhodamin-palloidin 染色を行い観察してみた。非常に興味深いことに、Cdh1<sup>GT/GT</sup> MEF で

は野生型細胞に比べ actin stress fiber の形成が抑制されていることが分かった。また RNAi で Cdh1 の発現を抑制した HeLa 細胞でも同様な stress fiber の減少が認められたことから、Cdh1 が上皮細胞を含む様々な細胞の骨格制御に関与する可能性が示唆された (図 1)。

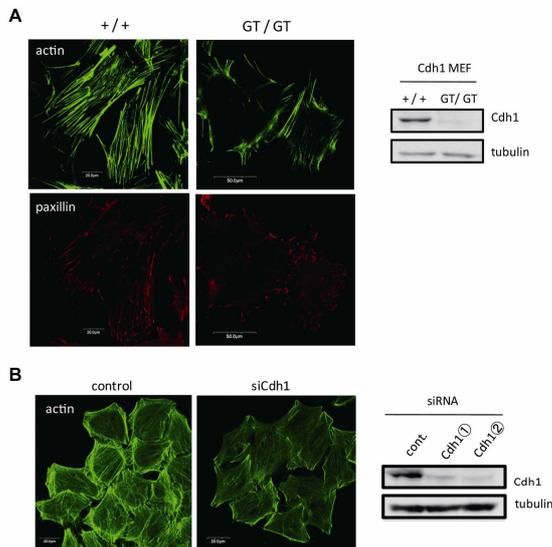


図 1 A. Cdh1 GT MEF におけるストレスファイバーおよび接着斑の減少  
B. RNAi で Cdh1 発現抑制した HeLa 細胞でのストレスファイバー

## 2) 細胞骨格変化に伴う small G 蛋白活性化の有無

Cdh1 欠失による細胞骨格変化のメカニズムを明らかにする目的で、stress fiber 形成に重要な役割を果たすことが知られる small G 蛋白の Rho を中心に解析を進めた。Cdh1 欠失細胞において Rho 並びに RhoGDI の発現は対照細胞とほぼ同様であったものの、rhotekin(7-89)-GST を用いた pull down アッセイでは活性化型 Rho が有意に減少していることが明らかになった (図 2)。

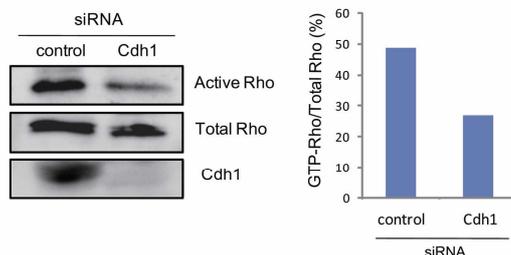


図 2 Rhotekin-GST pull down アッセイ  
活性化型 Rho は Cdh1 ノックダウン細胞で有意に低下している

## 3) 細胞骨格変化を招来する Cdh1 基質の同定

Cdh1 を介した Rho 活性制御機構を明らかにするため、Cdh1<sup>GT/GT</sup> MEF における Rho や RhoGDI などの蛋白量をウェスタンブロットで検討してみたが大きな変化は認められなかった。

そこで Rho 活性を負に制御する RhoGAP のうち、その活性の 60% までを占めると云われる major GAP である p190 を解析してみたところ、Cdh1<sup>GT/GT</sup> MEF ではその蛋白量が増加していることが明らかになった。この細胞での p190 mRNA 発現は正常対照と同レベルであったことから、APC<sup>Cdh1</sup> がユビキチン・プロテアソームを介し p190 の蛋白量を制御している可能性が示唆された。

そこで p190 の APC<sup>Cdh1</sup> によるユビキチン化の有無を免疫沈降精製した APC とリコンビナント Cdh1 を用いた in vitro ubiquitination アッセイなどにより解析したところ、p190 が APC<sup>Cdh1</sup> の新規基質となり得ることが解った。

## 4) Cdh1 が細胞移動能に及ぼす影響の解析

Cdh1 欠失の細胞骨格に与える影響が、細胞移動能におよぼす効果を検討するために trans-well chamber assay を行った。HeLa 細胞を用い RNAi で Cdh1 の発現を抑制させると、対照に比べ明らかに細胞移動の低下が見られた。しかし、Cdh1 と同時に p190RhoGAP もノックダウンすると、その低下を正常レベルまで改善出来たことから、Cdh1 が p190 を介して細胞骨格と細胞移動の制御に影響を与えていることが強く示唆された。これまで p190 の活性制御として src キナーゼによるリン酸化がよく知られているが、上記研究から p190 の蛋白量自身も活性調整のために重要である可能性が考えられた。そこで、HeLa 細胞において p190 の RNAi ノックダウンを行い経時的に p190 蛋白量の減少をモニターしつつ、それらの細胞における p190 の活性をストレスファイバー形成能より検討してみた。その結果、p190 の減少と共にストレスファイバーの形成が増加することが解った。さらに GFP-p190 を一過性に強制発現させると、GFP 陽性細胞において非陽性細胞に比べ顕著なストレスファイバー形成の減弱が認められた。これらの所見から、p190 の活性制御に自身の蛋白量が重要な役割を果たしていることが示唆された。

## 5) Cdh1<sup>GT/GT</sup> マウスの発生異常解析

Cdh1 の p190 を介した Rho 活性制御の生体における意義を検討する目的で、Cdh1<sup>GT/GT</sup> マウスの発生異常を詳細に観察してみたところ、胎盤の血栓形成や胎児の眼瞼閉鎖遅延など Rho の重要な下流因子である Rho kinase ノックアウトマウスと非常に似た表現型を呈していることが分かった (図 3)。また Cdh1<sup>GT/GT</sup> マウスでは中枢神経系を中心に p190 蛋白が蓄積していることも見出した。これらの結果を総合して、Cdh1 が Rho の新しい制御因子であることが強く示唆されるものとする。

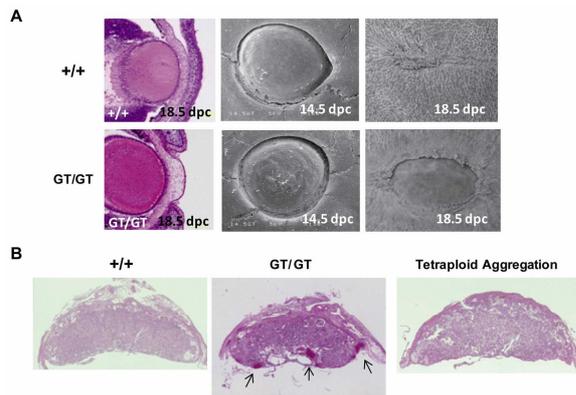


図3 A. Cdh1 GT/GT 胎児発生過程における眼瞼閉鎖の遅延 (左 H&E; 中、右 走査電顕)  
B. Cdh1 GT/GT 胎盤において増加している血栓 (H&E; 矢印)

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

- 1) Kobayashi Y, Shimizu T, Naoe H, Ueki A, Ishizawa J, Chiyoda T, Onishi N, Sugihara E, Nagano O, Banno K, Kuninaka S, Aoki D and Saya H: Establishment of a choriocarcinoma model from immortalized normal extravillous trophoblast cells transduced with HRASV12. *Am J Pathol* 2011 (in press), 査読有
- 2) Ishizawa J, Kuninaka S, Sugihara E, Naoe H, Kobayashi Y, Chiyoda T, Ueki A, Araki K, Yamamura KI, Matsuzaki Y, Nakajima H, Ikeda Y, Okamoto S, Saya H: The cell cycle regulator Cdh1 controls the pool sizes of hematopoietic stem cells and mature lineage progenitors by protecting from genotoxic stress. *Cancer Sci.* 102:1349-7006.2011, 査読有
- 3) Shimizu T, Ishikawa T, Sugihara E, Kuninaka S, Miyamoto T, Mabuchi Y, Matsuzaki Y, Tsunoda T, Miya F, Morioka H, Nakayama R, Kobayashi E, Toyama Y, Kawai A, Ichikawa H, Hasegawa T, Okada S, Ito T, Ikeda Y, Suda T, Saya H: c-MYC overexpression with loss of Ink4a/Arf transforms bone marrow stromal cells into osteosarcoma accompanied by loss of adipogenesis. *Oncogene* 29:5687-99. 2010, 査読有

- 4) Naoe H, Araki K, Nagano O, Kobayashi Y, Ishizawa J, Chiyoda T, Shimizu T, Yamamura K, Sasaki Y, Saya H, Kuninaka S: The anaphase promoting complex/cyclosome activator Cdh1 modulates Rho GTPase by targeting p190 RhoGAP for degradation. *Mol Cell Biol* 30:3994-4005. 2010, 査読有

[学会発表](計6件)

- 1) 國仲慎治, 他: APC/C 活性化因子 Cdh1/Fzr1 の Rho 制御因子としての新しい役割 第69回日本癌学会総会 平成22年9月24日、大阪)
- 2) Naoe, Kuninaka, S et al.: The APC/C activator Cdh1 modulates Rho GTPase by targeting p190 RhoGAP for degradation. EMBO Workshop: The Interface between the Ubiquitin Family and the DNA Damage Response 平成22年9月2日、Red Island, Rovinj, Croatia
- 3) 直江秀昭、國仲慎治、他: Anaphase promoting complex (APC) activator Cdh1 modulates RhoGTPase activity by targeting p190 RhoGAP for degradation 第68回日本癌学会総会 平成21年10月2日、横浜
- 4) 國仲慎治、他: APC/C activator Cdh1 coordinately regulates cell cycle and differentiation in trophoblast stem cells 第68回日本癌学会総会 平成21年10月2日、横浜
- 5) 佐谷秀行、國仲慎治、他: 胎盤から見た細胞周期因子 APC/cdh1 の機能 第31回日本分子生物学会年会/第81回日本生化学会大会合同大会 平成20年12月11日、神戸
- 6) 直江秀昭、國仲慎治、他: Anaphase promoting complex(APC)活性化因子 cdh1 は RhoGTPase の新規調節因子である 第67回日本癌学会総会 平成20年10月28日、名古屋

[図書](計1件)

- 1) 國仲慎治, 佐谷秀行、共立出版、細胞周期フロンティア (佐方功幸・稲垣昌樹・岸本健雄編) 2010 193-199

[産業財産権]

- 出願状況 (計0件)  
取得状況 (計0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

6．研究組織

(1)研究代表者

國仲慎治 (KUNINAKA SHINJI)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：10404336

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし