

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月22日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23650595

研究課題名（和文） Wnt5a-Ror2 シグナルによる

がん細胞の細胞膜・核膜の形態制御機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of structural regulation of plasma and nuclear membranes in cancer cells by Wnt5a-Ror2 signaling

研究代表者

南 康博 (YASUHIRO MINAMI)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70229772

研究成果の概要（和文）：

本研究により、Wnt5a-Ror2 シグナルによるがん細胞の細胞膜形態・核膜形態の制御において、Rhoファミリー低分子量Gタンパク質であるRifと核膜（内膜）タンパク質であるエメリンの物理的・機能的な共役が重要な役割を担うことが示唆された。また、がん細胞における糸状突起の形成に関わるRifとその上流の制御分子Rap1GDS1は、がん細胞の細胞増殖にも関与することが見出された。

研究成果の概要（英文）：

In this study it has been found that Rif, a member of the Rho-family of small G-proteins, and emerin, an integral nuclear membrane protein, play a critical role in the morphological regulation of plasma membrane and nuclear membrane by Wnt5a-Ror2 signaling. Furthermore, it has been indicated that Rif and its putative upstream regulator, Rap1GDS1, are involved in cancer cell proliferation in addition to their role in filopodia formation of cancer cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・腫瘍生物学

キーワード：Wnt5a・Ror2・低分子量Gタンパク質・核膜形態・がん細胞の浸潤

 1. 研究開始当初の背景  
 がん細胞が浸潤する際や発生過

 程の脳皮質において神経幹前駆  
 細胞がエレベーター運動 (INM:

interkinetic nuclear migration)を行う際には、細胞膜と核膜が巧妙に連関して形態を制御する必要がある。我々は液性分子 Wnt5a とその受容体である Ror2 受容体チロシンキナーゼによるシグナル (Wnt5a-Ror2 シグナル) が、アクチン細胞骨格再編等を介して糸状突起・葉状突起の形成を制御したり、がん細胞の浸潤突起の形成を制御することを明らかにしていた。また、本研究開始当初においては、Wnt5a-Ror2 シグナルによる糸状突起形成において Rho ファミリー低分子量 G タンパク質である Rif (Rho in filopodia) が関与すること、及び Rif が核膜 (内膜) タンパク質であるエメリンと結合することを見出していた。

## 2. 研究の目的

がん細胞が基底膜を破壊・浸潤する際や神経幹前駆細胞が脳皮質においてエレベーター運動 (INM) をする際には、細胞膜と核膜が巧妙に連関して細胞・核形態を制御する必要がある。本研究では、Rif やエメリンを糸口として、Wnt5a-Ror2 シグナルによるがんの浸潤や増殖過程における細胞膜・核膜の形態変化の分子機構の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、培養細胞株を用いて、まず Rif と共役するシグナル分子を免疫沈降・質量分析法を用いて探索・同定した。次に、Rif 及び同定に成功した Rif 会合分子である Rap1GDS1、エメリンなどの分子群について、培養細胞株やがん細胞株を用いてそれぞれの分子の過剰発現実験・発現抑制実験を行い、それらの細胞膜・核膜形態や細胞増殖能に与える影響を細胞生物学的手法により解析した。また、Rif とエメリンの機能的連関については、優性阻害性 Rif 変異体の過剰発現実験等により検討を加えた。その結果、優性阻害性 Rif 変異体や GDP 結合型 Rif によりエメリンの発現が減弱することが観察されたので、ユビキチン・プロテアソーム系に着目し、エメリンの分解制御機構を生化学的・分子

細胞生物学的手法により解析した。

## 4. 研究成果

Wnt5a-Ror2 シグナルによる糸状突起の形成は、Rho ファミリー低分子量 G タンパク質である Rif の優性阻害性変異体の過剰発現に抑制されたが、Cdc42 の優性阻害性変異体の過剰発現によっては影響を受けなかったことから、Rif によって制御されると考えられる。次に、Rif と共役する分子群を免疫沈降法・質量分析法を用いて探索・同定を試みたところ、Rif の上流の制御分子として Rap1GDS1 を、Rif と共役する分子として核膜 (内膜) タンパク質であるエメリンを同定することに成功した。また、Rif の下流のエフェクター分子として mDia2 を同定した (未発表)。一方、優性阻害性 Rif 変異体、あるいは GDP 結合型 Rif によるエメリンの発現減弱 (抑制) がユビキチン・プロテアソーム系を介することを見出した。このエメリンの分解制御には、Rif と会合する CUL4、DDB1、ROC1 からなる核内ユビキチンリガーゼ複合体が重要な役割を担うことを明らかにした (未発表)。さらに最近では、肺がん細胞において、Rap1GDS1 の発現抑制ならびに Rif の発現抑制によって、がん細胞での糸状突起の形成促進のみならず、細胞増殖も抑制されることが明らかとなった (未発表)。今後、がん細胞の形態変化や細胞増殖におけるこれらの分子群の局在・機能の時空間的制御機構の解明が期待される。

## 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 7 件)

(1) Li, X., Yamagata, K., Nishita, M., Endo, M., Arfian, N., Rikitake, Y., Emoto, N., Hirata, K., Tanaka, Y., Minami, Y., Activation of Wnt5a-Ror2 signaling associated with epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) of tubular epithelial cells during renal fibrosis., **Genes Cells**, 査読有、

2013、掲載確定・印刷中

(2) Endo, M., Nishita, M., Minami, Y., Analysis of Wnt/Planar cell polarity pathway in cultured cells. **Methods Mol. Biol.**、査読無、Vol. 839、2012、201-214

DOI:

10.1007/978-1-61779-510-7\_16.

(3) Yamagata, K., Li, X., Ikegaki, S., Oneyama, C., Okada, M., Nishita, M., Minami, Y., Dissection of Wnt5a-Ror2 signaling leading to *matrix metalloproteinase (MMP)-13* expression. **J. Biol. Chem.**、査読有、Vol. 287、2012、1588-1599  
DOI: 10.1074/jbc.M111.315127.

(4) Endo, M., Doi, R., Nishita, M., Minami, Y., Ror-family receptor tyrosine kinases regulate maintenance of neural progenitor cells in the developing neocortex. **J. Cell Sci.**、査読有、Vol. 125、2012、2017-2029

DOI: 10.1242/jcs.097782.

(5) Maeda, K., Kobayashi, Y., Udagawa, N., Uehara, S., Ishihara, A., Mizoguchi, T., Kikuchi, Y., Takada, I., Kato, S., Kani, S., Nishita, M., Marumo, K., Martin, T. J., Minami, Y., Takahashi, N., Wnt5a-Ror2 signaling between osteoblasts and osteoclast precursors enhances osteoclastogenesis. **Nat. Med.**、査読有、Vol. 18、2012、405-412

DOI: 10.1038/nm.2653.

(6) Ren, D., Minami, Y., Nishita, M., Critical role of Wnt5a-Ror2 signaling in motility and invasiveness of epidermoid carcinoma cells following Snail-mediated epithelial-mesenchymal

transition. **Genes Cells**、査読有、Vol. 16、2011、304-315

DOI:

10.1111/j.1365-2443.2011.01487.x.

(7) Takahashi, S., Watanabe, T., Okada, M., Inoue, K., Ueda, T., Takada, I., Watabe, T., Yamamoto, Y., Fukuda, T., Nakamura, T., Akimoto, C., T., Fujimura, T., Hoshino, M., Imai, Y., Metzger, D., Miyazono, K., Minami, Y., Chambon, P., Kitamura, T., Matsumoto, T., Kato, S., Non-canonical Wnt signaling mediates androgen-dependent tumor growth in a mouse model of prostate cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**、査読有、Vol. 108、2011、4938-4943

DOI: 10.1073/pnas.1014850108

〔学会発表〕(計3件)

(1) 土井亮介、遠藤光晴、南康博、骨格筋分化・再生モデルを用いた Rorシグナルの機能解析、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月14日、福岡国際会議場・マリンメッセ

(2) 西田満、喬森、宮本真理、山田真紀子、大谷浩、Christine Hartmann、西中村隆一、南康博、マウス腎臓発生における Wnt5a-Ror2 シグナルの役割、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月14日、福岡国際会議場・マリンメッセ

(3) Kaoru Yamagata, Shunkichi Ikegaki, Xin Li, Yasuhiro Minami, Dissection of Wnt5a-Ror2 signaling leading to matrix metalloproteinase (MMP)-13 expression、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月16日、パシフィコ横浜

〔図書〕(計1件)

Endo, M., Nishita, M., Doi, R., Minami, Y., Ror receptor family. The Receptor Tyrosine Kinase Handbook., edited by Wheeler, D. L. and Yarden, Y. Springer Science、2013、掲載確定・印刷中

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/medzo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

南 康博 (MINAMI YASUHIRO)

神戸大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70229772