

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 29 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460367

研究課題名(和文) Rifによるエメリンの分解制御とその核膜動態における役割

研究課題名(英文) Role of Rif in dynamics of nuclear membrane protein emerin

研究代表者

西田 満(Nishita, Michiru)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30379359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞核の変形は様々な生理的・病理的状況下において認められるが、その分子基盤については不明な点が多い。私たちは、細胞膜糸状突起形成に関わる細胞内タンパク質Rifが不活性状態において核膜タンパク質エメリンの分解と核変形を誘導することを見出し、その分子機構と病態における意義の解明を目的に研究を行った。不活性型Rifはユビキチン化・分解制御を受けることでエメリンを分解に導く可能性が示唆された。また、Rifの活性化がハッチンソン・ギルフォード早老症候群の病態に関連したエメリンの異常局在や分解を抑制できることを見出した。さらに、Rifがヒト肺腺がん細胞の増殖や浸潤に関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Although the shape of the cell nucleus changes depending on physiological and pathological conditions, its underlying mechanisms remain unclear. We have found that inactive form of Rif, an intracellular protein involved in filopodia formation, induces degradation of the nuclear membrane protein, emerin, and nuclear deformation. In this study, we studied the mechanism of Rif-mediated emerin degradation and its role in pathological conditions. Our results suggest that inactive form of Rif itself is ubiquitinated and degraded, leading to degradation of emerin. We have also found that active form of Rif can suppress mislocalization and degradation of emerin, associated with Hutchinson-Gilford progeria syndrome. We have further shown that Rif is involved in growth and invasion of human lung adenocarcinoma cells.

研究分野：細胞生物学

キーワード：Rhoファミリー 核膜 ユビキチン化

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の形態変化は、細胞-細胞間、細胞-細胞外基質間の接着部位を介して細胞内に内因性のメカニカルストレス(力学的負荷)を発生させ、その力は核膜に作用することで核の移動や歪みをもたらす。また、がん細胞は浸潤突起によって分解した基底膜の小さい穴を細胞膜と核膜を柔軟に変形させることで通過し浸潤する。細胞移動に伴って核膜は柔軟に変形する一方、ゲノムの損傷を引き起こすような核の断片化や不可逆的な変形が起こらないように細胞は核膜の恒常性を維持する必要がある。そのような恒常性維持機構の破綻は、ゲノムの恒常性の喪失によるがん化や細胞死をもたらすと考えられる。核膜の恒常性維持機構についてはほとんど解明されていないが、核膜内膜に存在するエメリンと核ラミナを構成するラミン A/C がメカニカルストレスによる核の恒常性維持に重要な役割を担っていることが示唆されている。申請者は、受容体型チロシンキナーゼ Ror2 が分泌性シグナルタンパク質 Wnt5a の受容体として細胞の極性・移動・浸潤を制御していることを明らかにしてきた。また、Rho ファミリー低分子量 G タンパク質 Rif (Rho in filopodia) が Ror1 および Ror2 による糸状突起形成に関与していることを見出した。興味深いことに、Rif の不活性型変異体 (GDP 結合型 Rif) を強制発現させた細胞では、糸状突起が形成されないだけでなく、エメリンがプロテアソーム依存的に分解されることを見出した。また、Rif の会合分子を免疫沈降と質量分析によって探索した結果、Rif がエメリンおよび E3 ユビキチンリガーゼ DDB1 と結合することを見出した。さらに、DDB1 の過剰発現がエメリンのプロテアソーム依存的な分解を引き起こすことも見出した。

### 2. 研究の目的

本研究では、Rif によるエメリンの分解制御機構とその病理的意義を明らかにすることを目的とする。また、がん細胞の悪性進展における Ror1 と Rif の機能を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

各種細胞内タンパク質の局在は、免疫蛍光染色した後、共焦点レーザー顕微鏡によって解析した。ユビキチン化の生化学的検出のため、Flag-Rif の野生型、GTP 結合型、GDP 結合型をそれぞれ HA-Ubiquitin と共に培養細胞に発現させ、抗 Flag 抗体で免疫沈降した後、HA 抗体によって Western blot 解析を行った。Rif と DDB1 またはエメリンとの結合実験は、免疫沈降と Western blot によって行った。糸状突起の定量は、phalloidin 染色した細胞を共焦点レーザー顕微鏡観察することによって行った。細胞増殖能と浸潤能は、それぞれ WST-8 アッセイと *in vitro* マトリゲル浸潤アッセイによって解析した。

### 4. 研究成果

(1) Rif を介したエメリンの分解制御機構と病態との関連

Rif の不活性型変異体 (RifTN) を強制発現させた HeLa 細胞において、核膜タンパク質エメリンがプロテアソーム依存的に分解されることをこれまでに明らかにしたが、本研究ではエメリン自体がユビキチン化され、プロテアソームによって分解されるのか検討した。まず、抗ユビキチン抗体を用いた免疫染色を行った結果、RifTN 発現 HeLa 細胞において抗ユビキチン抗体による顕著な染色が認められた。その局在の大部分は RifTN の局在と一致し、エメリンとの共局在はわずかに認められた。次に抗 p62 抗体を用いて同様の解析を行った。p62 はユビキチン結合領域と LC3 結合領域を持ち、ユビキチン化されたタンパク質をオートファゴソームへと運ぶ役割を果たすユビキチン結合タンパク質である。解析の結果、p62 はユビキチンと同様に RifTN 発現 HeLa 細胞に蓄積していることが観察され、RifTN との共局在が認められた。しかし、エメリンと p62 の共局在はほとんど認められなかった。また、エメリンのユビキチン化について生化学的手法を用いた解析を行った結果、RifTN 発現細胞におけるエメリンのユビキチン化は検出されなかった。一方、RifTN は同様の方法で顕著にユビキチン化されることが示された。

次に、Rif とエメリンの結合が直接的なものか、また、Rif の GTP 結合型(活性型)、GDP 結合型(不活性型)、ヌクレオチド非結合型といった違いによって変化するのかが検討した。そのため、GST タグを付加した Rif と MBP タグを付加したエメリンをそれぞれ大腸菌から精製した。精製した GST-Rif タンパク質に GTP または GDP をロードしエメリンとの結合を *in vitro* 結合実験によって検討した。その結果、Rif の GTP 結合型と GDP 結合型が同程度にエメリンと結合し、Rif のヌクレオチド非結合型とエメリンとの結合はそれらの結合に比べて弱いことがわかった。

次に、Rif のユビキチン化が不活性型変異体に特異的に起こるのかが検討するため、野生型、活性型、不活性型 Rif をそれぞれ発現させた細胞を用いて、生化学的手法によってそれら Rif のユビキチン化状態を解析した。その結果、Rif の不活性型のみが特異的にユビキチン化されることが確認された。したがって、Rif は活性状態に関わらずエメリンと結合する一方、不活性状態でのみユビキチン化され、その結果エメリンが分解される可能性が示唆された。

私たちはこれまでに Rif の結合タンパク質としてエメリンに加えて DDB1 を同定している。DDB1 は Cul4 および Roc1 と複合体を形成することで E3 ユビキチンリガーゼとして機能するが、Rif は DDB1 だけでなく Cul4A/B と Roc1 とも結合することを確認した。したがっ

て、DDB1 が Rif のユビキチン化に関わっている可能性が考えられるため、Cul4/DDB1 E3 ユビキチンリガーゼ複合体による Rif のユビキチン化について、現在 *in vitro* ユビキチン化アッセイによって検討中である。同時に DDB1 が Rif の分解を誘導する可能性について検討するため、siRNA によって DDB1 を発現抑制し Rif のタンパク質量に与える影響を検討した。その結果、DDB1 の発現抑制によって Rif のタンパク質量が増加することを見出した。他の Rho ファミリー低分子量 G タンパク質に対する影響を検討した結果、DDB1 の発現抑制によって RhoA が減少し、Rac と Cdc42 はほとんど変化が認められなかった。したがって、DDB1 は Rho ファミリーの中では Rif 特異的に分解に関与していることが示唆された。

次に、Rif と DDB1 の結合について、Rif の野生型、活性型、不活性型のどれが DDB1 とより安定に結合するのかについて共免疫沈降法によって検討した。その結果、DDB1 は Rif の不活性型と比較的に安定に結合することが明らかになった。この結果は、Rif の不活性型が特異的にユビキチン化を受けるという上述の結果を支持する。したがって、Rif は不活性状態において DDB1 と安定に結合することでユビキチン化を受けることが示唆された。

Rif を介したエメリン分解の意義について検討するため、ラミノパチーに着目した。ラミノパチーは核膜の裏打ち構造を担う細胞骨格タンパク質ラミンの異常によって起こる疾患の総称であり、ラミン A の遺伝子変異によるハッチンソン・ギルフォード早老症候群 (HGPS) を含む。HGPS の原因となる変異ラミン A は、核の変形とともにエメリンの異常な細胞内局在や分解を引き起こすことが知られている。このような異常は RifTN を発現させた細胞で見られる異常と類似している。そこで私たちは、HGPS における Rif の関与について検討するため、Rif の活性型変異体と HGPS の原因となる変異ラミン A (プロジェリン) を細胞に共発現させた。その結果、Rif の活性型はプロジェリンによるエメリンの局在異常を顕著に阻害した。

HGPS は早老症の中で最も重篤で、その患者は生後 6 ~ 24 ヶ月で発達遅滞、脱毛、骨形成異常、強皮症などを示し、通常の 5 ~ 10 倍の速度で老化が進行し、平均 13 歳で冠動脈疾患や脳卒中によって死に至る。HGPS はプロジェリンが蓄積することが原因で起こるが、その発症機序は未だ不明であり、有効な治療法は存在しない。興味深いことに、プロジェリンは健全な高齢者の皮膚線維芽細胞などでも蓄積が認められ、生理的な老化にも関与していることが示唆されている。私たちの結果は、Rif が HGPS におけるエメリンの異常な局在に関与していることを示唆しており、今後の研究によりその分子機構が解明された場合には、HGPS の病態解明が進むだけでなく、生理的な老化の分子機構の解明にも繋がる

ることが期待される。また、Rif の活性化が HGPS の病態を改善できることが判明すれば、HGPS や老化に関連した様々な疾患の治療法の開発にも繋がることを期待される。

## (2) がん細胞の悪性進展における Ror と Rif の機能の解析

Rif と Ror1、Ror2 の発現を様々な細胞腫において解析した結果、Ror2 が過剰発現しているヒト骨肉腫細胞においては Rif の発現が弱く、Ror1 が過剰発現している複数のヒト肺腺がん細胞株において Rif の発現が高いことを見出した。そこで、ヒト肺腺がん細胞株 PC-9 を用いて、Ror1 の糸状突起形成への関与について検討するため、siRNA によって Ror1 または Rif をノックダウン (KD) した PC-9 細胞を phalloidin 染色し、1 μm 以上の長さの糸状突起の数を計測した。その結果、コントロール細胞に比べ、Ror1 KD 細胞および Rif KD 細胞では糸状突起の数が減少した (図 1)。また、Rif の下流でアクチン核化因子として機能する mDia2 の KD によっても同様に糸状突起の数が減少した。次に、Rif が Ror1 の下流で機能している可能性を検討するため、Rif KD 細胞における Ror1-GFP 過剰発現の影響を検討した。その結果、Ror1-GFP の過剰発現によって促進される糸状突起形成は、Ror1 KD によって抑制されなかった。したがって、PC-9 細胞においては、Ror1 は Rif 非依存的に糸状突起形成を誘導することが示唆された。

次に Ror1、Rif の KD が細胞増殖に及ぼす影響を WST-8 アッセイにて解析した。その結果、Ror1 KD、Rif KD どちらも細胞増殖率を顕著に低下させた (図 2)。一方、mDia2 KD

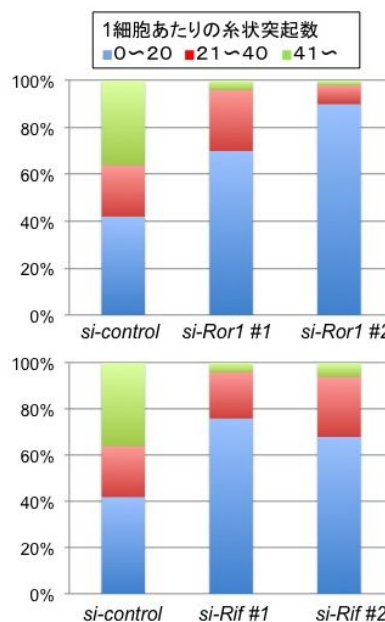


図 1. Ror1 または Rif の発現抑制による PC-9 細胞の糸状突起形成の阻害。細胞あたりの 1 μm 以上の糸状突起の数が、0~20、21~40、41~の細胞の割合を示した。

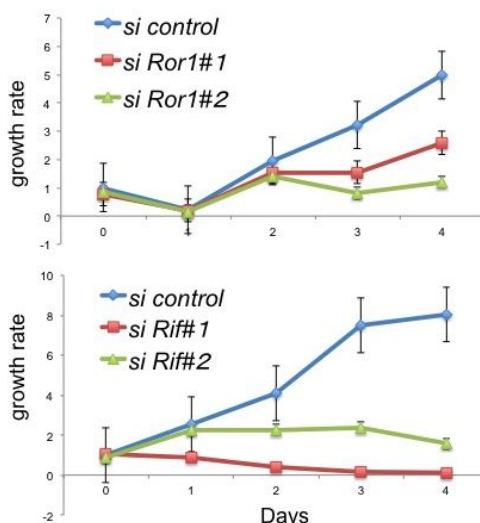


図2. *Ror1*または*Rif*の発現抑制によるPC-9細胞の増殖能の阻害。

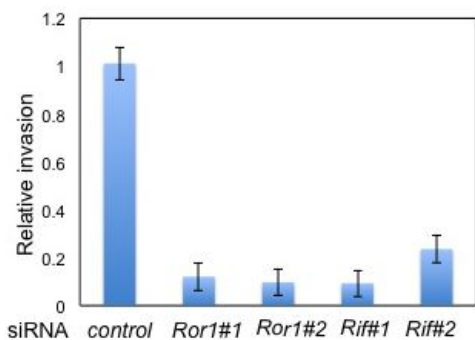


図3. *Ror1*または*Rif*の発現抑制によるPC-9細胞の浸潤能の阻害。

についてはコントロールと比べ増殖率に有意差は認められなかった。前述のように、*mDia2* KDは糸状突起形成を阻害することから、PC-9細胞の増殖には糸状突起は必要ではないと考えられる。さらに、*Ror1*や*Rif*がPC-9細胞の浸潤に与する可能性について検討するため、*in vitro*マトリゲル浸潤アッセイを行った。その結果、*Ror1* KD、*Rif* KDどちらも浸潤能を有意に抑制することが明らかになった(図3)。

以上の結果から、*Ror1*や*Rif*はPC-9細胞の糸状突起形成、増殖、浸潤をそれぞれ促進していることが示された。*Ror1*と*Rif*によるPC-9細胞の増殖や浸潤の制御とエメリン分解制御との関連について、現在解析中である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

#Takiguchi, G., #Nishita, M., Kurita, K., Kakeji, Y., and Minami, Y. Wnt5a-Ror2 signaling in mesenchymal stem cells promotes proliferation of gastric cancer cells by activating CXCL16-CXCR6 axis. *Cancer Sci.* 査読有、107: 2016, 290-297. (#: equal contribution), doi: 10.1111/cas.12871.

Endo, M., Nishita, M., Fujii, M., and Minami, Y. Insight into the role of Wnt5a-induced signaling in normal and cancer cells. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 査読無、314: 2015, 117-148. doi: 10.1016/bs.ircmb.2014.10.003.

西田満、西尾忠、南康博、Wnt5a-Ror2シグナルによるがんの浸潤制御. *実験医学*、増刊、査読無、33巻10号: 2015, 114-118.

西田満、遠藤光晴、南康博、非古典的Wntシグナルの情報伝達と細胞応答. *Clinical Calcium*、査読無、23巻6号: 2013, 23-29.

[学会発表](計2件)

Nishita, M. and Minami, Y., Novel role for Wnt5a-Ror2 signaling in regulating polarity and structure of the Golgi apparatus in osteosarcoma cells. University of Washington-Kobe University Joint Symposium on Cell Signaling. 2015.9.10、シアトル(アメリカ)

Nishita, M. and Minami, Y., Role of Wnt5a-Ror2 signaling in tumor invasion. University of Washington and Kobe University International Joint Symposium. 2014.12.15 (ポートピアホテル(兵庫県))

[図書](計1件)

Endo, M., Nishita, M., Doi, R., Hayashi, M., and Minami, Y. The Ror Receptor Family. "Receptor Tyrosine Kinases: Family and Subfamilies" Humana Press (Springer) edited by Wheeler, D. L. and Yarden, Y., Chapter 13: 2015, 593-640.

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

西田 満 (NISHITA, Michiru)

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号: 30379359