

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25840068

研究課題名(和文)細胞集団移動を制御するユビキチンシステムの解明

研究課題名(英文)The mechanism of ubiquitination system in collective cell migration.

研究代表者

溝口 貴正 (MIZOGUCHI, TAKAMASA)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：10645419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々はNotchシグナルの制御因子として知られているMind Bomb(Mib)がNotchシグナルとは独立にゼブラフィッシュの側線原基の細胞集団移動に関わることを見出した。我々はMibの新規基質としてp120ctnを同定し、Mibがp120ctnのRac1活性化能を負に制御していることを明らかにした。またmib変異体における側線原基の移動遅延がp120ctnの機能亢進にあるという仮定の下、p120ctnの機能阻害実験をmib変異体で行ったところ、側線原基の移動が回復した。以上のことからMibはp120ctnの機能を負に制御することにより細胞移動を制御しているものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We found that the posterior lateral line primordium (pLLP) migration was delayed in mind bomb (mib) mutants. Mib is an E3 ubiquitin ligase and a positive regulator of Notch signal. We also found that Mib could potentially control cell migration via Notch signaling independent pathway. We showed that Mib interacted with and ubiquitinated p120 catenin (p120ctn), which controls cell migration. It is known that p120ctn overexpression induces activation of Rac1. We found that Mib suppressed p120ctn dependent Rac1 activation. These data indicate that Mib controls cell migration via negative regulation of p120ctn activity.

Finally, we tested the hypothesis that exaggerated p120ctn activity in mib mutant causes the delay in pLLP migration. Morpholino knockdown of p120ctn rescued pLLP migration defects in mib mutants. Taken together, our data suggest that Mib is involved in pLLP migration through ubiquitination of p120ctn.

研究分野：発生生物学

キーワード：Mib p120ctn Rac1 細胞集団移動 ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物の個体発生において、三次元的に複雑な器官の形態形成には細胞が移動することが必要不可欠である。多くの器官形成において細胞は隣接する細胞と接着を保ったまま移動する。このような互いに接着を保ったまま移動する移動形式は“細胞集団移動”と呼ばれるが、白血球や神経細胞のように“単独で移動する細胞移動”と比較し、知見は限られており、不明な点が多い。また細胞集団移動は発生過程のみならず、組織修復やガン細胞の組織浸潤などにおいても見られる現象であることから、その分子メカニズムを知ることが、非常に重要な課題となっている。

100個ほどの細胞からなるゼブラフィッシュの側線原基はその観察が容易であることなどから、細胞集団移動を解析するために非常に有用かつ強力なモデルとなっている。申請者は、E3 ユビキチンライゲースをコードする *mib* の変異体では側線原基の移動が遅延することを見出した Mib は Notch シグナルのリガンドである Delta や Jagged のユビキチン化を介して Notch シグナルを正に制御していることが知られている。そのため Notch シグナルが側線原基の移動に重要であるのではないかと推察し解析を行ったところ、予想に反して Notch シグナルの阻害では移動に大きな影響が見られなかった。以上のことから側線原基の移動において Mib が Notch シグナルとは独立に細胞の移動を制御していることが示唆された。

そこで Mib の新規ターゲットを探索した結果、Mib が複合体を形成すると報告されている p120ctn に着目した。実際に Mib の基質となり得るか、培養細胞を用いて検討したところ、p120ctn は Mib と相互作用すること、また Mib によってライゲース活性依存的にユビキチン化されることが示された。p120ctn は Cadherin の膜局在の安定化を介して細胞接着を制御すること、また Rho や Rac などの small GTPase を介した細胞骨格の制御を行うことで細胞移動に関わることが知られている。このことから、Mib が p120ctn のユビキチン化を介して細胞集団移動に関わることが推測された。しかしながらその分子メカニズムは不明であり、これを明らかにすることで細胞集団移動を制御する新たな分子システムについて知見が得られると着想した。

2. 研究の目的

本研究では Mib によるユビキチン化を介した p120ctn の活性制御機構を明らかにするとともに細胞集団移動における Mib と p120ctn の機能について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)p120ctn のユビキチン化されるリジン残基の同定。

ユビキチン化はタンパク質中のリジン残

基にユビキチンが付加する現象である。p120ctn は Mib によりユビキチン化されるが、どのリジン残基にユビキチンが付加されるのかは不明であった。そこで断片化 p120ctn コンストラクトを作製し、Mib のユビキチンライゲース活性依存的なユビキチン化がみられるか培養細胞を用いた生化学的手法により検討した。

(2)ユビキチン化された p120ctn はどのような制御を受けるのか。

タンパク質のユビキチン化は分解や局在に関与している。そこでユビキチン化された p120ctn がどのような制御を受けるか、培養細胞を用いた生化学的な解析、およびゼブラフィッシュを用いた抗体染色で検討した。

(3)Mib による p120ctn のユビキチン化を介した細胞接着や細胞移動制御メカニズム。

p120ctn は Cadherin の局在制御を介した細胞接着や small GTPase 活性を介した細胞移動制御に関わることが知られている。Mib がユビキチンライゲース活性依存的にこれらの p120ctn の機能を制御するのか培養細胞を用いた生化学的な解析、およびゼブラフィッシュを用いた抗体染色で検討した。

(4)ゼブラフィッシュ側線原基の移動における p120ctn の機能と Mib による制御。

ゼブラフィッシュの側線原基の移動に p120ctn の機能が重要であるか、また *mib* 変異体で見られる表現型が p120ctn の機能と関連するのかをゼブラフィッシュを用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1)Mib による p120ctn のユビキチン化は K547 に起こる。

p120ctn のユビキチン化部位を同定するために p120ctn の N 末断片と C 末断片の発現コンストラクトを用いてユビキチン化を検討した。その結果 Mib による p120ctn のユビキチン化は C 末に起こることが明らかとなった。次に C 末から徐々に短くした p120ctn743, p120ctn648, p120ctn584, p120ctn540 を作製し Mib によるユビキチン化を検討したところ、p120ctn743, p120ctn648, p120ctn584 は Mib によってライゲース活性依存的にユビキチン化されたものの、p120ctn540 はユビキチン化されなかった。このことから Mib による p120ctn のユビキチン化は 541 番目から 584 番目の間のアミノ酸に起こることが想定された。この領域には 3 つのリジン残基が存在するが、547 番目のリジンをアラニンに置換した場合に限り、著しく Mib による p120ctn のユビキチン化が低下した。以上のことから K547 が Mib による p120ctn のユビキチン化のターゲットサイトであると考えられる。

(2)p120ctn のユビキチン化はタンパク質の安定性や局在には影響しない。

ユビキチン化がプロテアソームを介したタンパク質の分解に関与することから、培養細胞において Mib のノックダウンを行い、

p120ctn のタンパク質の量に変化があるか検討した。その結果 Mib のノックダウンは p120ctn のタンパク質の量に何ら影響しなかった。このことから Mib による p120ctn のユビキチン化は p120ctn タンパク質の分解には影響しないと考えられる。またゼブラフィッシュの野生型と *mib* 変異体の側線原基において p120ctn の局在は変化しないことが抗体染色より明らかとなった。このことから、p120ctn のユビキチン化はその局在には影響しないと推察される。

(3) Mib によるユビキチン化は p120ctn による Rac1 の活性化を阻害する。

p120ctn は Cadherin の局在に関与していることが報告されている。そこで側線原基に発現している E-Cadherin と N-Cadherin の抗体染色を行ったところ、野生型と *mib* 変異体において E-Cadherin と N-Cadherin の局在に影響は見られなかった。このことから Mib によるユビキチン化は Caddherin の局在に影響を及ぼさないと考えられる。

p120ctn は small GTPase の一つである Rac1 を活性化することが知られている。そこで Mib によるユビキチン化が p120ctn による Rac1 の活性化に影響するか検討した。その結果 Mib はライゲース活性依存的に p120ctn による Rac1 の活性化を抑制することが示された。このことは Mib がユビキチン化を介して p120ctn の機能調節を行っていることを強く示唆している。

(4) *mib* の表現型は p120ctn の機能阻害により、レスキューされる。

側線原基の移動における p120ctn の機能を明らかにするためにゼブラフィッシュにおいて morpholino アンチセンスオリゴによる p120ctn の機能阻害実験を行った。その結果野生型において p120ctn の機能阻害は側線原基の移動に影響を及ぼさなかった。しかしながら *mib* 変異体において p120ctn の機能阻害を行うと側線原基の移動遅延が回復した。このことから Mib は p120ctn の機能を抑制することにより側線原基の移動制御に関わっており、*mib* 変異体で見られる移動の遅延は p120ctn の機能亢進が一因である可能性が示された。

以上の研究成果は論文投稿中

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 5 件)

1. Mikami S., Nakaura M., Kawahara A., Mizoguchi T. and Itoh M.
Mind bomb2 is dispensable for embryonic development and Notch signalling in Zebrafish.
Biol. Open. (2105) in press. 査読有
2. Mizoguchi T. and Itoh M.,

Notch signal.

生体の科学 66, 440-441 (2105) review 査読無.

3. Ohishi K, Toume K, Arai MA, Koyano T, Kowithayakorn T, Mizoguchi T., Itoh M and Ishibashi M
9-Hydroxycanthin-6-one, a β -Carboline Alkaloid from *Eurycoma longifolia*, Is the First Wnt Signal Inhibitor through Activation of Glycogen Synthase Kinase 3 β without Depending on Casein Kinase 1 α
J. Nat. Prod., 78 (5), 1139–1146 (2015) 査読有
4. Okikawa S, Mizoguchi T., Okano M, Tanaka H, Isoda M, Jiang Y, Suster M, Higashijima S, Kawakami K and Itoh M
Different combinations of Notch ligands and receptors regulate V2 interneuron progenitor proliferation and V2a/V2b cell fate determination
Developmental Biology, 391(2):196-206 (2014) 査読有
5. Ohishi K, Toume K, Arai MA, Sadhu SK, Ahmed F, Mizoguchi T., Itoh M and Ishibashi M
Ricinine: A pyridone alkaloid from *Ricinus communis* that activates the Wnt signaling pathway through casein kinase 1 α
Bioorganic & Medicinal Chemistry, 22(17):4597-4601 (2014) 査読有

[学会発表](計 12 件)

1. 溝口 貴正 広瀬 和也 池田 祥子 渡邊 沙織 楊 薩薩 伊藤 素行
Mib1 negatively regulates Ctnnd1 activity and controls cell migration.
BMB2015 (第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会) 2015 年 12 月 1 日-4 日
神戸ポートアイランド
2. Miku Iihama, Takamasa Mizoguchi, Mizuki Nakaura, Michi Fukada, Miki Chin, Koichi Kawakami, Motoyuki Itoh.
Notch Signaling Regulates V2 Interneuronal Differentiation and Neurite Outgrowth.
第 21 回小型魚類研究会 2015 年 9 月 19 日-20 日 大阪大学銀杏会館
3. Shohei Mikami, Mizuki Nakaura, Atsuo Kawahara, Takamasa Mizoguchi, Motoyuki Itoh.
Mind bomb2 is not essential for Notch signaling.
第 21 回小型魚類研究会 2015 年 9 月 19 日-20 日 大阪大学銀杏会館
4. Takamasa Mizoguchi, Kazuya Hirose, Shoko Ikeda, Saori Watanabe, Sasa Yang, Motoyuki Itoh.
Mib1 controls cell migration via negative regulation of Ctnnd1 activity.
第 48 回日本発生生物学会大会 (A P D

- B N共催) 2015年6月2日-5日、つくば国際会議場
5. **Takamasa Mizoguchi**, Kazuya Hirose, Shoko Ikeda, Saori Watanabe, Susa Yang, Motoyuki Itoh
The actin dynamics live imaging reveals that Mib1 controls appropriate actin rearrangements and coordinates collective cell migration.
Multi-dimensional fluorescence live imaging of cellular function and molecular activities 2015年1月26日-28日 京都国際会議場
 6. **Takamasa Mizoguchi**, Mizuki Nakaura, Michi Fukada, Mili Chin, Koichi Kawakami, Motoyuki Itoh
The appropriate regulation of the Notch signaling activity is required for various neuronal subtype differentiation and the neurite outgrowth of V2b interneuron.
2014年12月18日 Notch研究会 大阪大学
 7. 渡邊 沙織、**溝口 貴正**、池田 祥子、楊 薩薩、廣瀬 和也、伊藤 素行
Mib1によるp120ctnのコピキチン化を介した細胞移動制御の機構解析
第58回日本薬学会関東支部大会、2014年10月4日 昭和薬科大学 キャンパス
 8. **Takamasa Mizoguchi**, Mizuki Nakaura, Michi Fukada, Miki Chin, Koichi Kawakami, Motoyuki Itoh.
The appropriate control of the Notch signaling activity is required for various neuronal subtype differentiation and their functions
第20回小型魚類研究会 2014年9月20日-21日 慶應義塾大学薬学部(芝共立キャンパス)
 9. **Takamasa Mizoguchi**, Kazuya Hirose, Shoko Ikeda, Saori Watanabe, Sasa Yang, Motoyuki Itoh.
Mib1 regulates cell migration through negative control of Ctnd1 function by its ubiquitination.
11th International Conference on Zebrafish Development and Genetics 2014年6月24日-28日 Madison, WI, USA
 10. Sayumi Okigawa, **Takamasa Mizoguchi**, Makoto Okanao, Haruna Tanaka, Miho Isoda, Yun-Jin Jiang, Maximiliano Susuter, Shinichi Higashijima, Koichi Kawakami, Motoyuki Itoh
Different combinations of Notch ligands and receptors regulate V2 interneuron progenitor proliferation and V2a/V2b cell fate determination.
第47回日本発生生物学会大会 2014年5月27日-30日 WINC AICHI (Nagoya, Aichi)
 11. **Takamasa Mizoguchi**, Kazuya Hirose,

Shoko Ikeda, Saori Watanabe, Motoyuki Itoh.

Mib1 controls cell migration through negative regulation of p120ctn function by its ubiquitination.

第19回小型魚類研究会 2013年9月20-21日 仙台市情報・産業プラザ

12. **Takamasa Mizoguchi**, Kazuya Hirose, Shoko Ikeda, Saori Watanabe, Motoyuki Itoh.

Mib1 regulates cell migration via ubiquitination of p120ctn

第46回日本発生生物学会大会 (APDBN共催) 2013年5月28日-31日 くにびきメッセ 島根県

〔その他〕
研究室 HP
<http://www.p.chiba-u.jp/lab/seika/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

溝口 貴正 (MIZOGUCHI TAKAMASA)
千葉大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号：10645419