

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：34506

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26890024

研究課題名(和文) Rasによるアクチン細胞骨格の再構成におけるNF- $\kappa$ Bの役割研究課題名(英文) The role of NF- $\kappa$ B in Ras-modulated remodeling of the actin cytoskeleton

研究代表者

川内 敬子 (KAWAUCHI, KEIKO)

甲南大学・甲南大学フロンティアサイエンス学部・講師

研究者番号：40434138

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：アクチン細胞骨格は、がん細胞の浸潤能・転移能を決める重要なカギとなる。近年、がん抑制遺伝子p53は、アクチン細胞骨格を制御することでがん悪性を抑制することが明らかとなった。p53は転写因子NF- $\kappa$ Bの活性を抑制することから、p53が機能欠損すると、NF- $\kappa$ Bはアクチン細胞骨格構造を変化させて、がん悪性を促進しているのではないかと考えた。そして本研究で我々は、NF- $\kappa$ Bがミトコンドリアの恒常性を維持することで、がん遺伝子RASにより誘導されるアクチン分子の切断を抑制していることを示した。

研究成果の概要(英文)：Actin cytoskeleton plays an important role in invasion, and metastasis of cancer cells. Accumulated evidence revealed that the tumor suppressor p53 prevents aggressiveness of cancer cells via remodeling of the actin cytoskeleton although the molecular mechanism has not been well studied. Since p53 is known to suppress NF- $\kappa$ B activity, we thought that NF- $\kappa$ B is involved in remodeling of the actin cytoskeleton modulated by dysfunction of p53. In this study, we showed that NF- $\kappa$ B prevented RAS-induced cleavage of b-actin through maintain mitochondria integrity, which might lead to invasion of cancer cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：がん NF- $\kappa$ B p53 アクチン ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

p53はがん抑制因子としてよく知られるが、遺伝子変異による不活性化が観察されるのはヒトのがんの約50%である。p53の遺伝子変異とがんの進行度には相関性があることから、何らかの理由でp53の典型的ながん抑制作用が欠如したときに、がん化は誘導されるが、それでもp53は悪性化を抑制する機能を持っていることになる。このことはがん遺伝子Rasを発現させることによりがん化を誘発させたマウスモデルでも明らかにされている(引用文献)。しかしながら、そのメカニズムはほとんど解明されにされていない。

## 2. 研究の目的

細胞のがん化に伴い、アクチン細胞骨格の構造が大きく変化する。そして、どのようにアクチン細胞骨格が再構成されるかが、がん細胞の性質を決める重要なカギとなる。我々はこれまでに、p53はアクチン細胞骨格の構造を変化させ、がん細胞の浸潤能を抑制すること(引用文献)またp53は転写因子NF- $\kappa$ Bの活性を抑制することを明らかにしてきた(引用文献)。NF- $\kappa$ Bは、がんの悪性化を促進する分子であることから、がん遺伝子Ras依存的なアクチン細胞骨格の構造の変化にNF- $\kappa$ Bが関与しているのではないかと考えて、解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) MEFの調整

p53ノックアウト(p53<sup>-/-</sup>)マウス胎児由来繊維芽細胞(MEF)は、胎生12.5日目の胎仔から調製した。細胞は、10%ウシ胎児血清(FBS)を加えたDulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)中で37℃、5%CO<sub>2</sub>存在下で培養した。

### (2) レトロウイルスの感染

293T細胞に、psi-2 helperとp65のshRNAを発現するレトロウイルスベクターを遺伝子導入し、48時間後に培地を回収し、8.0  $\mu$ g/ml polybreneを加え、p53<sup>-/-</sup>MEFに感染させた。

(3)ミトコンドリア膜電位( $\Delta\Psi_m$ )の計測  
細胞をミトコンドリア膜電位差測定プローブJC1の存在下で30分間培養し、PBS中で共焦点顕微鏡により観察を行った。ImageJにより得られた画像を解析した。

## 4. 研究成果

(1) p53を発現している不死化したマウス線維芽細胞は、がん遺伝子RASを導入すると、 $\beta$ アクチンの切断が誘導される(引用文献)。一方で、p53<sup>-/-</sup>MEFやp53変異体を発現させた細胞では、がん遺伝子RASを導入しても $\beta$ アクチンの切断は見られない。p53が機能欠損した細胞では、NF- $\kappa$ Bの活性が高いことから(引用文献)、NF- $\kappa$ BがRASにより誘導される $\beta$ アクチンの切断を抑制しているのではないかと考えた。NF- $\kappa$ Bの構成分子p65のshRNAおよびがん遺伝子RASはレトロウイルスを用いてp53<sup>-/-</sup>MEFに安定的に発現させ、 $\beta$ アクチンの切断を確認した。がん遺伝子RASを発現していない細胞では、p65をノックダウンしても、 $\beta$ アクチンの切断は確認されなかったが、がん遺伝子RASを発現した細胞では、p65のノックダウンで有意に $\beta$ アクチンの切断が誘導された。 $\beta$ アクチンの切断が誘導されると、ラメリポディアの形成が阻害される(引用文献)。この結果と一致して、p65をノックダウンしたRASを発現した細胞では、ラメリポディアの形成が抑制されていた。

(2) NF- $\kappa$ Bは主に細胞質に局在しているがミトコンドリアにも局在していることが知られている(引用文献)。そこで、ミトコンドリアに局在しているNF- $\kappa$ Bが $\beta$ アクチンの

切断を抑制しているのかを調べるために、がん遺伝子 RAS を発現した細胞にミトコンドリア局在シグナルを付加した p65 を発現させた。その結果、RAS で誘導されたβアクチンの切断は、ミトコンドリアに局在する p65 を過剰発現させることで減少した。したがって、ミトコンドリアに局在している NF-κB が、βアクチンの切断を抑制していることが推察された。

(3) βアクチンの切断が起こるためには、細胞質に局在している p38MAPK がミトコンドリアに移行し、アクチンのプロテアーゼとして機能する HtrA2/Omi を活性化することが重要である(引用文献)。そこで、ミトコンドリアと細胞質のタンパク質を分画し、p38MAPK のミトコンドリア移行を調べた。その結果、RAS を発現させた細胞において、p65 のノックダウンをすると p38MAPK のミトコンドリア移行が亢進することが確認された。

(4)ミトコンドリア膜電位( )が低下すると p38MAPK のミトコンドリア移行が誘導される。そこで、JC1 を用いて の計測を行ったところ、がん遺伝子 RAS を発現した細胞において p65 をノックダウンすると が低下していた。以上のことから、NF-κB は、ミトコンドリアの恒常性を維持し、p38MAPK のミトコンドリア移行を阻害することで HtrA2/Omi の活性化を抑制しているものと考えられた。βアクチンの切断が誘導されないことでラメリポディアの形成は促進され、細胞の浸潤能は亢進しているものと考えられた。

#### <引用文献>

Feldser, D.M., Kostova K.K., Winslow M.M., Taylor S.E., Cashman C., Whittaker C.A., Sanchez-Rivera F.J., Resnick

R., Bronson R., Hemann M.T., Jacks T. Stage-specific sensitivity to p53 restoration during lung cancer progression. **Nature** 468, pp572-576

Yamauchi, S., Hou, Y.Y., Guo, K. A., Hirata, H., Nakajima, W., Yap. A.K., Yu, CH., Harada, I., Chaim, KW., Sawada, Y., Kawauchi, K. p53-mediated activation of the mitochondrial protease HtrA2/Omi prevents cell invasion **J. Cell Biology** 204 pp1191-1207 (2014)

Kawauchi, K., Araki, K., Tobiume, K., Tanaka, N. Loss of p53 enhances catalytic activity of IKKβ through O-linked β-N-acetyl glucosamine modification. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** 106 pp3431-3436 (2009)

Kawauchi, K., Araki, K., Tobiume, K., Tanaka, N. Activated p53 induces NF-κB DNA-binding but suppresses its transcriptional activation.

**Biochem. Biophys. Res. Commun.** 372 pp137-141 (2008)

Kawauchi, K., Araki, K., Tobiume, K., Tanaka, N. p53 regulates glucose metabolism through IKK-NF-κB pathway and inhibits cell transformation. **Nature Cell Biol.** 10 pp611-618 (2008)

Cogswell, P.C., Kashatus, D.F., Keifer, J.A., Guttridge, D.C., Reuther, J.Y., Bristow, C., Roy, S., Nicholson, D.W., Baldwin, A.S. Jr. NF-kappa B and I kappa B alpha are found in the mitochondria. Evidence for regulation of mitochondrial gene expression by NF-kappa B. **J. Biol. Chem.** 278, pp 2963-2968 (2003)

#### 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 2件)

1. NF-κB prevents oncogenic Ras-induced β-actin cleavage in p53-deficient cells. Sugimoto W, Itoh K, Kotari T, Guo K A, Ebata T, Hirata H, Kawauchi K. **Int J Cancer Cell Biol Res.** 2, pp14-18 (2017) <http://scireslit.com/Cancer/IJC>

CR-ID15.pdf

2. p53 regulates cytoskeleton remodeling to suppress tumor progression. Araki K, Ebata T, Guo K A, Tobiume K, Wolf JS, Kawauchi K. **Cellular and Molecular Life Sciences** 72 pp4077-4094 (2015) doi: 10.1007/s00018-015-1989-9.

〔学会発表〕(計 3件)

1. 神足俊也、川内敬子  
Ras 誘導性浸潤に対する NF-κB の役割  
第 6 回 生命機能研究会 2015 年 9 月 12 日 「龍谷大学大阪梅田キャンパス(大阪・大阪)」
2. 川内敬子:「アクチン分子が細胞の形質を決定するメカニズム」  
第 35 回 JASS セミナー, 2015 年 8 月 28 日 「シンガポール(シンガポール)」
3. Toshiya Kotari, Shota Yamauchi, Yan Yan Hou, Alvin Kunyao Guo, Hiroaki Hirata, Wataru Nakajima, Nobuyuki Tanaka, Keiko Kawauchi  
The role of p53 and NF-κB in remodeling of the actin skeleton following Ras-induced transformation  
第 37 回 日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25 日 パシフィコ横浜「横浜(神奈川県)」

〔図書〕(計 1件)

1. 大野茂男、千葉奈津子、川内敬子、駒田雅之、山本陽一朗、宮川隆、小原英幹、野島博、芳賀永、下野洋平、上野博夫、北爪しのぶ、佐谷秀行 **がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動総括支援活動班編 がん研究読本** 6 2016 年 p29-37

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

〔その他〕  
アウトリーチ活動

一般市民向け講演会

1. 川内敬子:「形を変えるがん細胞」  
甲南大学先端生命工学研究所, 生命科学の未来を熱く語る, 2014 年 6 月 28 日 甲南大学岡本キャンパス「神戸(兵庫)」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川内 敬子 (KAWAUCHI, Keiko)

甲南大学・フロンティアサイエンス学部・講師

研究者番号: 40434138