

令和元年6月6日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18547

研究課題名(和文) Mibによるp120ctnのユビキチン化を介した細胞集団移動制御機構の解明

研究課題名(英文) Mib-dependent ubiquitination of p120ctn in cell migration.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：E3ユビキチンライゲースであるMibの細胞移動制御における新規基質としてp120ctnを同定した。またMibによってp120ctnの547番目のアミノ酸であるリジンがユビキチン化されること、ユビキチン化によりp120ctnのRac1活性化能が抑制的に制御されることを見出した。加えてゼブラフィッシュmib変異体では側線原基細胞の移動が方向性を失うが、p120ctnの機能阻害によりこの表現型が回復することを見出した。以上のことからMibがユビキチン化を介してp120ctnの機能を制限し、Rac1活性を一定レベルに保つことが細胞移動に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞移動は動物の発生時や創傷治癒時などにみられる普遍的な生命現象だが、どのような分子が細胞移動を制御しているかは完全にはわかっていない。我々はMibと呼ばれるタンパク質がユビキチン化(ターゲットのタンパク質にユビキチンという別のタンパク質を付加すること)によって細胞移動の制御に関わるという知見を新たに見出した。今回の成果は動物の形づくりの理解やがん転移などの細胞運動が深くかかわる疾病研究に貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：We explored novel Mib1 substrates for cell migration and found that Mib1 ubiquitinates p120ctn. Mib1-mediated ubiquitination of p120ctn K547 attenuated Rac1 activation in cultured cells. In addition, we found that posterior lateral line primordium cells in the zebrafish mib mutant showed increased random migration. Knockdown of p120ctn partially rescued posterior lateral line primordium cell migration defects in the mib mutant. Taken together, our data suggest that Mib plays an important role in cell migration.

研究分野：細胞生物学、発生生物学

キーワード：Mib p120ctn Rac1 細胞移動 ユビキチン化 ゼブラフィッシュ 側線原基

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

細胞移動は器官形成、組織修復、ガン細胞の組織浸潤などに見られる普遍的な生命現象であるが、その詳細は不明な点が多い。我々はゼブラフィッシュ変異体の側線原基(水流感知器官の前駆細胞集団で、発生時に体幹部を長距離移動する)をモデルとした解析から、E3 ユビキチンライゲースである Mind bomb (Mib)が細胞移動制御に関わることを見出した。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。しかしながら予想に反して Notch シグナルの阻害では側線原基の細胞移動に大きな影響が見られなかった。このことから Mib が Notch シグナルとは独立に細胞移動の制御を行うことが示唆された。

#### 2. 研究の目的

Mib の新規ターゲットを探索し、Mib との相互作用の可能性が報告されていた p120 catenin (p120ctn, 別名 Ctnnd1)に着目した。実際に Mib の性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。また p120ctn は small GTPase である Rac1 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ということが知られている。そのため Mib が p120ctn の機能をユビキチン化を介して制御し、細胞移動に関わるということが推測された。しかしながらその詳細な分子メカニズムは不明である。

そこで細胞移動を担う分子メカニズムの一端を明らかにすることを目的とし、本研究では培養細胞を用いてユビキチン化を介した p120ctn 機能制御分子メカニズムの解析、ゼブラフィッシュをモデルとして個体発生時の細胞移動における Mib と p120ctn の機能解析を行った。

#### 3. 研究の方法

##### (1) p120ctn のユビキチン化されるリジン残基、及びユビキチン化様式の同定

Mib によるユビキチン化は p120ctn の 541 番目から 584 番目のアミノ酸に起こることを示唆するデータを得ていた。この領域には K547, K569, K574 の3つのリジン残基が存在する。そこでこれらのリジン残基をアラニン残基に置換した変異型 p120ctn を作製し、Mib によるユビキチン化が起きるか検証を行った。

##### (2) Mib による p120ctn のユビキチン化を介した細胞移動制御メカニズムの解析

p120ctn は small GTPase である Rac1 を活性化し、細胞形態や細胞移動制御に関わることが知られている。そこで p120ctn 依存的な Rac1 の活性化が Mib によるユビキチン化により抑制されるかを検証した。

##### (3) 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 による制御の解析

ゼブラフィッシュの側線原基は 100 個ほどの細胞からなる細胞集団で、観察が容易であることから個体内における細胞移動を観察する有用なモデルとなっている。我々は *mib* 変異体において側線原基の移動が遅延することを見出した。側線原基において p120ctn が発現していることは、*in situ* hybridization、抗体染色により確認しており、Mib による p120ctn の機能制御が側線原基の移動に関与していることが推察された。そこで p120ctn 特異的なモルフォリノアンチセンスオリゴによる機能阻害実験を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) Mib は p120ctn の K547 をモノユビキチン化する。

p120ctn の 547 番目のアミノ酸であるリジン(K547)をアラニンに置換した変異型 p120ctn K547A 及び 569、574 番目のリジンをアラニンに置換した変異型 p120ctn 2KA を作製し、Mib によるユビキチン化がみられるか検討した。その結果、p120ctn 2KA は野生型 p120ctn と同程度のユビキチン化を受けるのに対して、p120ctn K547A は著しくユビキチン化量が低下した。この結果より Mib は p120ctn の K547 をユビキチン化することが示された。また分子量の変化より、p120ctn の Mib によるユビキチン化はモノユビキチン化であることが強く示唆された。

##### (2) Mib によるユビキチン化により p120ctn の Rac1 活性化能が低下する。

p120ctn は Rac1 の活性化を介して細胞形態や細胞移動制御に関わり、Rac1 の過剰発現は異所的な細胞突起の伸長を誘導する。HeLa 細胞において Mib1 をノックダウンすると Rac1 の過剰発現と同様に異所的な細胞突起の伸長が観察された。さらにこの異所的な細胞突起の伸長はドミナントネガティブ型の Rac1 の発現により抑制された。この結果から Mib が p120ctn を介して Rac1 活性を負に制御している可能性が示唆された。

そこで活性化型 Rac1 の pull down 実験により、Rac1 活性に対する Mib の機能を検討した。その結果、p120ctn により誘導される Rac1 の活性化は Mib のユビキチンライゲース活性依存的に抑制されることが示された。

これらの結果より Mib が p120ctn をユビキチン化することで p120ctn の Rac1 活性化能を抑制し、細胞移動を制御するという新たな分子メカニズムが明らかとなった。

### (3) ゼブラフィッシュ側線原基の移動において Mib 依存的な p120ctn の制御が重要である。

トランスジェニックラインを利用したライブイメージングによる解析により、*mib* 変異体の側線原基では方向性を欠いた細胞移動が増加し、結果として原基としての移動が阻害されていることが明らかとなった。培養細胞から得られた知見から *mib* 変異体では p120ctn のユビキチン化による抑制的な制御が起こらず p120ctn の機能亢進が起きていることが推察された。そこで低濃度のモルフォリノアンチセンスオリゴを用いて p120ctn 機能の部分的な阻害を行った。その結果 *mib* 変異体の側線原基の移動遅延の回復がみられた。以上のことから、個体の器官形成における細胞移動においても Mib による p120ctn の機能制御が重要な働きをしていることが示された。

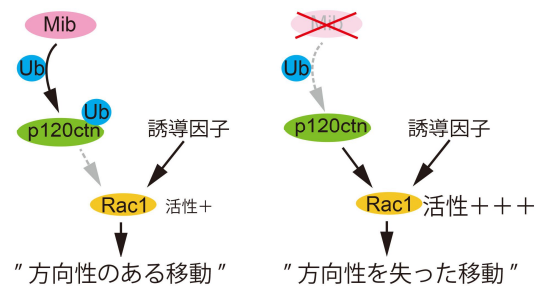


図 Mibによる細胞移動制御モデル

通常の細胞ではMibによるユビキチン化により p120ctnの機能は抑制されている。細胞の移動方向を決める誘導因子により局所的にRac1が活性化され、細胞は方向性のある運動を行う。Mib1の機能が失われると誘導因子以外にp120ctnによっても Rac1が活性化され、細胞全体でRac1活性が上昇し、細胞は方向性を失った移動を行う。

Rac1 の過剰活性化は細胞移動の方向性を失わせることが知られていることから、Mib による p120ctn のユビキチン化は Rac1 活性を一定のレベルに保つことで方向性を持った細胞移動に寄与していると考えられる (モデル図)。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

- (1) **Mizoguchi T**, Ikeda S, Watanabe S, Sugawara M, Itoh M. Mib1 contributes to persistent directional cell migration by regulating the Ctnnd1-Rac1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Oct 31;114(44):E9280-E9289. doi: 10.1073/pnas.1712560114. 査読あり
- (2) Miles LB, **Mizoguchi T**, Kikuchi Y, Verkade H.. A role for planar cell polarity during early endoderm morphogenesis *Biol Open*. 2017 May 15;6(5):531-539. doi: 10.1242/bio.021899. 査読あり
- (3) **Mizoguchi T**, Kawakami K, Itoh M. Zebrafish lines expressing UAS-driven red probes for monitoring cytoskeletal dynamics. *Genesis*. 2016 Sep;54(9):483-9. doi: 10.1002/dvg.22955. 査読あり

[学会発表](計11件)

- (1) Shun Fukagawa, **Takamasa Mizoguchi**, Miku Iihama, Michi Fukada, Xuehui Song, Motoyuki Itoh.  
Precise regulation of neuron-specific Notch signal is required for neuronal differentiation and locomotive behavior.  
Joint Annual Meeting of 70th JSCB and 51st JSDB, Jun 6, 2018 Funabori Tower Hall, Tokyo.
- (2) **Takamasa Mizoguchi**, Miku Iihama, Shun Fukagawa, Xuehui Song, Mizuki Nakaura, Michi Fukada, Motoyuki Itoh.  
Transient Notch signal activation is required for V2a/V2b interneuron cell fate choice, and normal V2b differentiation and morphology.  
The24th Japanese medaka and zebrafish meeting. Aug 25-26, 2018 Nagoya University
- (3) 近藤 優衣、矢藤 まり、三上 翔平、大倉 航、**溝口 貴正**、野田 翔太、天野 剛志、廣明 秀一、伊藤 素行 ゼブラフィッシュ胚背側化誘導化合物の BMP シグナル抑制メカニズム解析  
第 62 回日本薬学会関東支部大会 2018 年 9 月 15 日、帝京平成大学 中野キャンパス
- (4) 大北 真由、南 唯菜、**溝口 貴正**、伊藤 素行  
ゼブラフィッシュ成魚における肥満や脳ストレスが脳血管に与える影響の検討  
第 4 回ゼブラフィッシュ・メダカ創薬研究会 2018 年 11 月 20 日 産総研：臨海副都心センター
- (5) **Takamasa Mizoguchi**, Shuyu Ji, Miki Chin, Motoyuki Itoh  
DeltaA dependent Notch signal is required for effective escape behavior in zebrafish

第 41 回日本分子生物学会年会 2018 年 11 月 28 - 30 日、パシフィコ横浜

- (6) **溝口 貴正** 「病態モデルとしてのゼブラフィッシュ」(招待講演)  
The 23rd Japanese Medaka and Zebrafish Meeting サテライト シンポジウム  
第 2 回 ムシ VS サカナ 2017 年 8 月 29 日 甲府市山梨県立図書館
- (7) Kengo Furukawa, Satoshi Hiura, Chunwei Hu, Mayu Ookita, Nobuhiro Nitta, Ichio Aoki,  
**Takamasa Mizoguchi**, Motoyuki Itoh  
Zebrafish CADASIL model shows reduction of radial glia and blood vessel in brain  
第 23 回 小型魚類研究会 2017 年 8 月 30 - 31 日 山梨県立図書館
- (8) **溝口 貴正**、大北 真由、伊藤素行  
ゼブラフィッシュ成魚の血管・血流のライブイメージングおよび脳梗塞モデルの作出  
第 3 回ゼブラフィッシュ創薬研究会 2017 年 11 月 2 日 京都大学大学院薬学研究科 医薬  
系総合研究棟
- (9) **Takamasa Mizoguchi**, Miku Iihama, Xuehui Song, Mizuki Nakaura, Michi Fukada, Miki Chin,  
Koichi Kawakami, Motoyuki Itoh.  
The 22th Japanese medaka aThe spatiotemporally appropriate regulation of the Notch signaling  
activity is required for V2a/V2b interneuron cell fate decision and the neurite outgrowth of V2b  
interneuron  
The 22th Japanese medaka and zebrafish meeting (NBRP-medaka and zebrafish joint international  
meeting) 2016 年 8 月 20-21 日 岡崎カンファレンスセンター
- (10) **溝口 貴正**、胡 純璋、楊 鵬、伊藤 素行  
加齢や遺伝性疾患に起因する認知機能障害の解明に向けたゼブラフィッシュ成魚の  
血管イメージングおよび学習・記憶行動解析  
第 2 回ゼブラフィッシュ創薬研究会 2016 年 11 月 4 日 みんなの森 ぎふメディアコスモ  
ス
- (11) **Takamasa Mizoguchi**, Shoko Ikeda, Saori Watanabe, Motoyuki Ito  
Mib1 controls regulates cell migration via ubiquitination of Ctnnd1.  
第 39 回日本分子生物学会年会 2016 年 11 月 30 日 - 12 月 2 日パシフィコ横浜

[ その他 ]

千葉大学 本研究成果に関して論文発表を行った際のプレスリリース

<http://www.chiba-u.ac.jp/general/publicity/press/files/2017/20171017bunshiundo.pdf>

研究室 HP

<http://www.p.chiba-u.jp/lab/seika/index.html>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。