

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～ 2012

課題番号：22501011

研究課題名（和文）癌化における Rho 標的蛋白質 mDia の機能

研究課題名（英文）The role of mDia, a Rho effector molecule, in tumorigenesis

研究代表者：石崎 敏理 (Ishizaki Toshimasa)

京都大学大学院医学研究科・准教授

研究者番号：70293876

研究成果の概要（和文）：

多く臨床のがんで、Rho の過剰発現が報告されているが、Rho のがん化における役割は不明である。本研究では、Rho の下流標的蛋白質 mDia に焦点をあて、がん化における Rho-mDia 経路の役割について解析を行った。加えて、Rho-mDia 経路の生理的役割の解析、新規調節経路の見出したことで、将来的に発ガンでの Rho-mDia 経路の寄与と機構を解明できると期待される。

研究成果の概要（英文）：

Although it has been reported that the small GTPase Rho is overexpressed in various clinical cancers, the role of Rho in tumorigenesis is still unknown. In this study, we dissected the contribution and function of mDia, a Rho effector molecule, in tumorigenesis. Furthermore, we analyzed physiological roles of Rho-mDia signaling and identified a novel regulatory mechanism of mDia-mediated actin polymerization. These studies are expected to elucidate the molecular mechanism and influence of Rho-mDia signaling in tumorigenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|-------|---------|---------|---------|
| 22 年度 | 1800000 | 540000 | 2340000 |
| 23 年度 | 1000000 | 300000 | 1300000 |
| 24 年度 | 600000 | 180000 | 780000 |
| 総 計 | 3400000 | 1020000 | 4420000 |

研究分野：腫瘍学

科研費の分科・細目：腫瘍生物学

キーワード：Rho、mDia、アクチン細胞骨格、細胞悪性化、Ras、Src

1. 研究開始当初の背景

1970 年代の後半から現在まで、多くの癌原遺伝子が発見され、その後の分子細胞生物学的手法の飛躍的な発展に伴い、癌原遺伝子による細胞増殖の情報伝達機構が次々と明らかにされた。このように癌原遺伝子は通常、厳格な調節の下で細胞増殖を制御している。

しかし、変異や欠失によりその遺伝子産物は調節を受けることなく情報を伝達もしくは遮断し、その結果、細胞は秩序なく増殖を繰り返すこととなる。このように増殖している細胞は、足場非依存性増殖、接触阻害の回避など共通の性質を有していることに加え、アクチンストレス線維の消失に伴う細胞形態

の球状化が観察される。このような性質はアクチン細胞骨格との密接な関係があると考えられ、その制御蛋白質である低分子量G蛋白質 Rho シグナリングも強く関与している。

これまでは、Rho はアクチン細胞骨格制御因子であることから運動・接着という観点から、癌細胞での役割を論じられることが多い。しかしながら、臨床癌の多くで、Rho の発現レベルが亢進している。Rho family GTPase の GEF (Guaninenucleotide exchange factor) は細胞に過剰発現させることにより、foci を形成することから、癌原遺伝子と考えられている。また、RhoGAP (GTPase activating protein) の DLC-1(Deleted in liver cancer-1)は多くの臨床癌で欠失が確認されており、がん抑制遺伝子と考えられている。欠失によりこの蛋白質はGAP活性が消失することから、Rho は活性化されていると考えられる。これらのことを併せると、Rho の活性は細胞増殖・悪性化に必要であることが示唆される。

Rho が活性化されると、その情報は下流分子に伝達される。これまでの研究から、Rho によるアクチン細胞骨格の再編成には標的蛋白質 mDia と ROCK(Rho-associated kinase)が協調して機能することが明らかになっており、mDiaにより直鎖状のアクチン線維が重合され、ROCKはミオシンの活性化を介し、それらを束化する。これまで ROCK と細胞悪性化との関係については、特異的阻害薬 Y-27632 を用いた解析から、肝癌細胞 MM1 を用いた腹膜播種モデルにおいて、浸潤・転移に寄与することが明らかになっている(Itoh K. et al (1999) Nat Med. 5 221-225)。しかし、Y-27632 は多くの培養細胞株において著明な細胞増殖抑制効果や細胞周期の遅延を認めず(Ishizaki T et al., Mol Pharmacol. (2000) 57:976-983)、ROCK と細胞悪性化との

関係は不明な部分多い。一方、現在までに mDia と細胞悪性化への関与を示した報告はない。

2. 研究の目的

低分子量GTP結合蛋白質 Rho は細胞悪性化との関連が示されているが、その分子メカニズムや個体を用いた解析はほとんどない。申請者らは、Src および Ras による細胞悪性化・癌化への Rho 標的蛋白質 mDia の関与を見出しており、本課題では、Rho-mDia シグナリングが細胞悪性化に果たす役割についての分子機序の解明を目的とする。

3. 研究の方法

oncogenic Src や Ras により細胞悪性化・癌化が報告されているモデル・方法を用い、Rho-mDia シグナリングの細胞悪性化・癌化への役割と分子メカニズムの解明を目指す。

(1) Src による細胞悪性化への mDia の寄与: mDia に Src の細胞内局在を変化させることを見出しており、ライブイメージングにより、Src の細胞内局在化分子機序の解明を行う。また、その分子機序の解明のため、Src によりリン酸化される蛋白質の同定に加え、近年 Src のリン酸化基質の1つである Caveolin-1 が足場依存性増殖への関与が示唆されていることから、mDiaによる caveola 形成、Src の caveola への局在について検討する。

(2) Rasによる細胞悪性化へのmDiaの寄与:

(A) 皮膚二段階発癌モデルを用いた解析により Ras による細胞癌化に mDia1 が強く関与していることから、ノックアウトマウスから MEF あるいはケラチノサイトを単離し、Ras を介する情報伝達経路 (MAPK-, PI3K-, RalGDS-pathway)のうち、mDia1により制御を受けている情報伝達経路の同定を行う。加え

て、この系における mDia-*Src* シグナリングの重要性について解析を *Src* の局在化を指標に検討する。

(3) 上記の研究に加え、*Rho* シグナリングの新たな情報伝達経路およびその細胞・個体での生理的な意義を解析することにより、本研究の進展を目指す。

4. 研究成果

(1) *Rho* シグナリングと細胞悪性化

野生型および mDia1 欠損マウス (mDia1KO) より得た MEF 細胞に温度感受性 v-*Src* を感染させ、mDia1 が v-*Src* の細胞辺縁への集積に寄与すること、またこの集積が *Src* による細胞悪性化、細胞浸潤、個体での腫瘍形成に必須であることを明らかにした (発表文献 1)。また、mDia1KO に DMBA/TPA を塗布したところ、mDia1KO では 1 匹当たりの背部に発生するパピローマの数を WT マウスと比較すると著しく減少し、またパピローマの発生した時期も WT マウスに比べ顕著な遅延を認めた。しかし、DMBA/TPA によるパピローマ形成はマウスの遺伝背景に大きく依存する。そこでマウス遺伝背景を FVB にするために戻し交配し、DMBA/TPA 塗布実験を行っている。また、mDia1KO マウスから単離した MEF 細胞に活性化型 *Ras* を恒常的に発現させ、軟寒天培地で培養したところ、mDia1KO MEF 細胞では著しく増殖能が低下していた。現在 ERK、PI3K などの *Ras* の下流分子のリン酸化レベルの検討している。

(2) mDia1/3 による神経上皮の極性維持

神経上皮は、神経幹細胞として中枢神経系の各種細胞の前駆体を産み出す。神経幹細胞のこの働きは時間空間的に厳密に制御されているが、これを保障しているのが神経上皮の極性 (apical basal polarity) であり、これは頭頂部の細胞間接着 (apical adherens

junction) で保持されている。mDia1/3 二重欠損 (DKO) マウスの脳では、神経上皮の apical adherens junction とそれを連ねるアクチンベルトが消失、この結果神経上皮極性が破綻して神経幹細胞の増殖制御が外れ、脳室内へ向かっての異常増殖が起こり、これによる脳室閉鎖と水頭症の発症が見られた。この結果は、*Rho*-mDia 経路が神経上皮で誘導するアクチン細胞骨格が apical adherens junction の形成と維持を介して神経上皮極性と幹細胞制御に必須の働きを行っていることを示したものである (発表論文 6)。

(3) mDia1/3 による抑制性神経前駆細胞の tangential migration の制御

脳の発生過程で興奮性神経細胞と抑制性神経細胞の前駆細胞は、radial migration と tangential migration という異なる移動様式を示し脳構造の形成に預かっている。mDia1/3 DKO マウス脳では、興奮性神経細胞の radial migration とそれに伴う大脳皮質層形成に異常は認められなかったが、抑制性神経細胞の大脳皮質や海馬、嗅球への tangential migration は有意に減少し、成体で顆粒細胞の減少による嗅球低形成が見られた。脳組織の in vitro 培養系での神経前駆細胞移動の観察により、mDia1/3 は中心体の先導突起方向への移動と、移動した中心体への細胞核・細胞体の移動の両方に関与していること、これらが中心体に付随したアクチン線維の先導突起方向への移動と細胞体移動時の細胞体後部での一過的なアクチン線維の集積で起こることが明らかとなった。これらの結果から、抑制性神経細胞の tangential migration とその結果としての脳構造の形成において *Rho*-mDia 経路によるアクチン形成が不可欠であることが明らかとなった (発表論文 7)。

(4) mDia2 の細胞・個体での役割

mDia2 は細胞分裂時に収縮環に集積し、そこでアクチンなど細胞質分裂時に必要な蛋白質の局在化に関与する。この mDia2 の局在化メカニズムの解析のため、mDia2 の細胞内局在化に不可欠な領域を同定し、その断片を用いて HeLa 細胞の抽出液を対象に結合蛋白質の探索を行った。その結果、mDia2 は特異的に細胞質分裂時に必須な足場蛋白質をして機能している Anillin と結合すること、またこの結合が細胞質分裂に不可欠であることを報告した (Watanabe et al 2010 MBC)。

さらに、mDia2 の個体での機能を解析する目的で、mDia2 欠損マウスを作出、解析した。mDia2 欠損マウスは胎生 12.5 日以降に致死となり、その際、貧血の表現型が観察された。また末梢血内では多核化赤芽球が増加し、造血組織である胎児肝臓内の赤芽球の細胞数減少も見られた。この赤血球産生の障害の機構解明のため、胎児肝臓由来の細胞を用いた分化誘導実験を確立し、その障害機序の解明を行っている。

(5) CitronK の細胞質分裂における役割の解析

細胞質分裂時の CitronK の機能解析を行い、細胞膜と連絡する中央体の構造が不安定化し細胞質分裂完了が失敗することが判明した。

ついで、CitronK 部分断片を用い RNAi 回復実験を行った結果、CitronK の CC (Coiled-coil) 領域のみで表現型回復を認めた。また、CitronK の CC-N 端領域で KIF14 と結合し、CitronK は中央体にリング状の局在を示すこと、一方、CC-C 端領域には、Rho 結合とともに、細胞内でのクラスター化を担う部分が存在することが見出した。以上より、Citron の CC 領域の二つの異なる領域を介した中央体への局在化とその構造の安定化に重要であることが示唆された (発表論文 10)。

(6) mDia の新規結合蛋白質の同定とその細胞内機能の解析

mDia は Rho エフェクターであり、Rho による活性制御を受けるが、この分子がその他にどのような制御を受けるかは不明であった。mDia の DID-DD domain に結合する蛋白質として Liprin- α を同定し、Liprin- α が活性化 mDia の細胞膜への移行を制御することにより mDia のアクチン核化・重合活性を負に制御していることを見出した (発表論文 8 と 9)。

(7) ROCK の胚発生における機能の解析

mDia と並ぶ Rho エフェクターである ROCK-I と ROCK-II のヘテロ・ホモマウスで卵黄囊の血管形成が障害されることを見出し、ROCK が血管形成で不可欠なことを明らかにした (発表論文 5)。

(8) mDia のアクチン重合メカニズムの解析
固定化した mDia 分子と蛍光標識したアクチンを用い、*in vitro* 再構成系において単分子蛍光偏光法により mDia によるアクチン重合メカニズムの解析を行った。その結果、mDia が螺旋状に回転しながらアクチン重合を行っていることを見出した (発表文献 4)。

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 10 件)

① Tanji M, Ishizaki T, Ebrahimi S, Tsuboguchi Y, Sukezane T, Akagi T, Frame MC, Hashimoto N, Miyamoto S, Narumiya S. mDia1 targets v-Src to the cell periphery and facilitates cell transformation, tumorigenesis, and invasion. *Mol Cell Biol.* 30, 4604-4615, 2010 査読あり (doi: 10.1128/MCB.00197-10)

② Ohgushi M, Matsumura M, Eiraku M, Murakami K, Aramaki T, Nishiyama A, Muguruma K, Nakano T, Suga H, Ueno M, Ishizaki T, Suemori H, Narumiya S, Niwa H, Sasai Y. Molecular pathway and cell state

responsible for dissociation-induced apoptosis in human pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 6, 225-239, 2010 査読あり (doi: 10.1016/j.stem.2010.06.018)

③Tanizaki H, Egawa G, Inaba K, Honda T, Nakajima S, Moniaga CS, Otsuka A, Ishizaki T, Tomura M, Watanabe T, Miyachi Y, Narumiya S, Okada T, Kabashima K. Rho-mDia pathway is required for adhesion, migration, and T-cell stimulation in dendritic cells. *Blood*. 116, 5875-5884, 2010 査読あり (doi: 10.1182/blood-2010-01-264150)

④Mizuno H, Higashida C, Yuan Y, Ishizaki T, Narumiya S, Watanabe N. Rotational movement of the formin mDia along the double helical strand of an actin filament. *Science*. 331, 80-83. 2011 査読あり (doi: 10.1126/science.1197692)

⑤Kamijo H, Matsumura Y, Thumkeo D, Koike S, Masu M, Shimizu Y, Ishizaki T, Narumiya S. Impaired vascular remodeling in the yolk sac of embryos deficient in ROCK-I and ROCK-II. *Genes Cells*. 16, 1012-1021. 2011 査読あり (doi: 10.1111/j.1365-2443.2011.01546.x.)

⑥ Thumkeo D, Shinohara R, Watanabe K, Takebayashi H, Toyoda Y, Tohyama K, Ishizaki T, Furuyashiki T, Narumiya S. Deficiency of mDia, an actin nucleator, disrupts integrity of neuroepithelium and causes periventricular dysplasia. *PLoS One*. 6, e25465. 2011 査読あり (doi: 10.1371/journal.pone.0025465)

⑦Shinohara R, Thumkeo D, Kamijo H, Kaneko N, Sawamoto K, Watanabe K, Takebayashi H, Kiyonari H, Ishizaki T, Furuyashiki T, Narumiya S. A role for mDia, a Rho-regulated actin nucleator, in tangential migration of interneuron precursors. *Nat Neurosci*. 15, 373-380, 2012. 査読あり (doi: 10.1038/nn.3020)

⑧ Sakamoto S, Ishizaki T, Okawa K, Watanabe S, Arakawa T, Watanabe N, Narumiya S. Liprin- α controls stress fiber formation by binding to mDia and regulating its membrane localization.

J Cell Sci. 125, 108-120. 2012. 査読あり (doi: 10.1242/jcs.087411)

⑨Sakamoto S, Narumiya S, Ishizaki T. A new role of multi scaffold protein Liprin- α : Liprin- α suppresses Rho-mDia mediated stress fiber formation. *Bioarchitecture*. 2(2), 43-49, 2012. 査読あり

⑩ Watanabe S, De Zan T, Ishizaki T, Narumiya S. Citron kinase mediates transition from constriction to abscission through its coiled-coil domain. *J Cell Sci*, in press, 査読あり (doi: 10.1242/jcs.116608.)

[学会発表] (計 2 件)

①石崎敏理

Liprin-a suppresses Rho-mDia mediated stress fiber formation.

COLD SPRING HARBOR ASIA CONFERENCES Small GTPases at Different Scales: Proteins, Membranes, Cell.

2012年09月24日～28日

Suzhou Dushu Lake Conference Center.

②石崎敏理

Roles of mDia2, an actin nucleator, in embryonic development.

第35回 日本分子生物学会年会

2012年12月11日～14日

福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www5.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石崎 敏理 (Toshimasa Ishizaki)
京都大学大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 70293876