

Wnt5a とその受容体 Ror2 を介するシグナルによる細胞膜と核膜の形態・機能の制御機構解析

神戸大学大学院 医学研究科
生理学・細胞生物学講座 細胞生理学分野
南 康博

1. はじめに

液性因子Wnt5aは、その受容体であるRor2受容体型チロシンキナーゼを介するシグナル伝達により細胞極性・細胞運動を制御し、形態形成過程において重要な役割を担っている（文献1）。これまでに我々は、Wnt5a-Ror2シグナルが糸状突起、葉状突起や浸潤突起の形成を制御し、核膜の形態変化を伴うような細胞運動にも関与することを明らかにした（文献2-4）。最近我々は、Wnt5a-Ror2シグナルにより形成される糸状突起が、Rhoファミリー低分子量Gタンパク質であるRif (Rho in filopodia)により形成される糸状突起と細胞生物学的特性がきわめて類似することを見出した（文献5, 6参照、未発表）。また、免疫沈降法/質量分析法による解析から、Rif結合分子としてグアニンヌクレオチド交換因子であるRap1GDS1（文献7）や核膜タンパク質でありEmery-Dreifuss筋ジストロフィーの原因遺伝子産物として知られるエメリン（文献8, 9）などを同定することに成功した（未発表）。エメリンについては、その核膜での局在に加えて、核膜形態・機能と密接に関連することが知られている（文献10）。そこで、このような研究成果や研究背景を踏まえて、本研究においては「Wnt5a-Ror2シグナルは、Rifを介して、細胞膜形態・機能を制御するとともに、核膜形態・機能を制御する」という作業仮説を立て、その検証を試みた。

2. 方法

まずRor2を発現していないL細胞を用いて、この細胞にRor2、活性化型Rif [Rif(QL)変異体]を発現させ、形成される糸状突起の性状を細胞生物学的に比較検討した。また、Ror2（またはWnt5a-Ror2シグナル）による糸状突起形成について、Rif及びCdc42の優性阻害性変異体 [それぞれRif(TN)、Cdc42(TN)変異体] の発現が与える影響を解析した。また、NIH3T3細胞ではRor2による糸状突起形成が観察されなかったが、NIH3T3細胞ではRifの下流で機能するエフェクター分子であるmDia2 (mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous) の発現が殆ど検出されず、このことがこの細胞でRor2による糸状突起の形成が認められない理由と考え、この細胞にmDia2を発現させるという再構成実験を行った。次に、免疫沈降法/質量分析法によるRif会合候補分子として同定したRap1GDS1、エメリン、DDB1 (damage-specific DNA binding protein 1)（文献11, 12）について、これらが実際に細胞内でRifと結合するかどうかを確認するために、培養細胞にRifとともにこれらの各分子を発現させ、共免疫沈降法/免疫ブロット法により分子間の結合を解析した。また、Rifとエメリンの機能的連関を解析する目的で、両分子を内在性に発現している培養細胞に、優性阻害性Rif変異体[Rif(TN)]を発現させ、エメリンタンパク質の発現や局在に与える影響を検討した。その結果見出された“Rif(TN)によるエメリンタンパク質の発現抑制”について、薬理学的手法によりその機序解析を行った。

3. 結果 研究成果

L細胞においてRor2あるいは活性化型Rif [Rif(QL)]の発現による糸状突起の形成部位や形状等を詳細に比較したところ、両者が非常に類似することが示された。Ror2の発現により誘導される糸状突起形成は、Rifの優性阻害性変異体 [Rif(TN)]の発現により抑制されたものの、Cdc42の優性阻害性変異体 [Cdc42(TN)]の発現によっては影響を受けず、Ror2はRifを介して糸状突起形成を誘導することが示唆された。また、NIH3T3細胞ではRifの下流のエフェクター分子であるmDia2の発現が欠失しており、Ror2による糸状突起形成は観察されないが、mDia2を発現させることにより糸状突起形成が回復することから、(Wnt5a-)Ror2-Rif-mDia2経路がこの糸状突起形成に重要な役割を担うと

考えられる。

次に、免疫沈降法／質量分析法により同定したRif会合候補分子であるRap1GDS1、エメリン、DDB1が、それぞれRifと結合するかどうかについて免疫沈降法／免疫ブロット法により解析したところ、RifはそれぞれRap1GDS1、エメリン、DDB1に特異的に結合することが明らかになった。興味深いことに、野生型または活性化型Rif [Rif(QL)]を発現させても、エメリンの発現や核膜（内膜）での局在には影響が認められなかったが、優性阻害性Rif変異体 [Rif(TN)]を発現させると、エメリンの発現が顕著に消失するとともに、核膜（内膜）での局在が消失することが見出された。また、Rif(TN)の発現によるエメリンの発現消失と核膜での局在の消失は、プロテアゾーム阻害剤であるMG132を添加することにより顕著に抑制された。これらの知見から、不活化型のRif、すなわちGDP結合型Rifはエメリンと結合し、エメリンの分解に作用すると考えられる。

4. 考察 まとめ

本研究により、Ror2（またはWnt5a-Ror2）による糸状突起形成には、Rhoファミリー低分子量Gタンパク質であるRifが重要な役割を担っており、その下流のエフェクター分子であるmDia2を介してアクチン細胞骨格の再編成を誘導すると考えられる。また、RifとRhoファミリー低分子量Gタンパク質の活性化因子であるRap1GDS1が結合することが見出されており、今後Rap1GDS1が実際にRifを活性化できるかどうかの検証が必要である。加えて、本研究により、Rifは細胞膜形態（糸状突起）の制御に加えて、核膜（内膜）に局在するタンパク質でありEmery-Dreifuss筋ジストロフィーの原因遺伝子産物であるエメリンと結合し、その分解制御に関与することが示された。Rifと結合する別の分子であるDDB1はCUL4ユビキチンリガーゼの構成要素であることが知られており（文献11、12）、今後Rifがこのユビキチンリガーゼ系とどのような関係にあるのかを明らかにすることが重要と思われる。さらに、エメリンは核膜形態やその機能に関与することが報告されており（文献10）、今回見出した知見は、Rifを介して、細胞膜形態・機能と核膜形態・機能が共役して制御されるという興味深い可能性を示唆するものと考えられる。

5. 発表論文、参考文献

- (1) Minami, Y., Oishi, I., Endo, M., Nishita, M.: The Ror-family receptor tyrosine kinases in non-canonical Wnt signaling: Their implications in developmental morphogenesis and human diseases. **Dev. Dyn.** 239 : 1-15, 2010.
- (2) Nishita, M., Yoo, S-K., Nomachi, A., Kani, S., Sougawa, N., Ohta, Y., Takada, S., Kikuchi, A., Minami, Y.: Filopodia formation mediated by receptor tyrosine kinase Ror2 is required for Wnt5a-induced cell migration. **J. Cell. Biol.** 175: 555-562, 2006.
- (3) Nomachi, A., Nishita, M., Inaba, D., Enomoto, M., Hamasaki, M., Minami, Y.: Receptor tyrosine kinase Ror2 mediates Wnt5a-induced polarized cell migration by activating c-Jun N-terminal kinase via actin-binding protein filamin A. **J. Biol. Chem.** 283: 27973-27981, 2008.
- (4) Enomoto, M., Hayakawa, S., Itsukushima, S., Dayong, R., Matsuo, M., Tamada, K., Oneyama, C., Okada, M., Takumi, T., Nishita, M., Minami, Y.: Autonomous regulation of osteosarcoma cell invasiveness by Wnt5a/Ror2 signaling. **Oncogene** 28: 3197-3208, 2009.
- (5) Ellis, S., Mellor, H.: The novel Rho-family GTPases Rif regulates coordinated actin-based membrane rearrangements. **Curr. Biol.** 10: 1387-1390, 2000.
- (6) Pellegrin, S., Mellor, H.: The Rho family GTPase Rif induces filopodia through mDia2. **Curr. Biol.** 15: 129-133, 2005.
- (7) Rebhun, J.F., Castro, A.F., Quilliam, L.A.: Identification of guanine nucleotide exchange factors (GEFs) for the Rap1GTPase. **J. Biol. Chem.** 10: 34901-34908, 2000.
- (8) Nagano, A., Koga, R., Ogawa, M., Kurano, Y., Kawada, J., Okada, R., Hayashi, Y.K., Tsukahara, T., Arahata, K/: Emerin deficiency at the nuclear membrane in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. **Nat. Genet.** 12: 254-259, 1996.
- (9) Bengtsson, L., Wilson, K.L.: Multiple and surprising new features for emerin, a nuclear membrane protein. **Curr. Opin. In Cell Biol.** 16: 73-79, 2004.
- (10) Lammerding, J.L., Hsiao, J., Schulze, P.C., Kozlov, S., Stewart, C.L., Lee, R.T.: Abnormal nuclear shape and impaired mechanotransduction in emerin-deficient cells. **J. Cell**

Biol. 170: 781-791, 2005.

(11) Sugasawa, K.: The CUL4 enigma: Culling DNA repair factors. **Mol. Cell** 34: 403-404, 2009.

(12) Lee, J., Zhou, P.: DCAFs, the missing link of the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase. **Mol. Cell** 26: 775-780, 2007