

学位論文 Doctoral Thesis

APC/C 活性化因子 Cdh1 は p190 RhoGAP の分解を通して
細胞骨格を制御している

(The APC/C activator Cdh1 modulates actin cytoskeleton by targeting p190 RhoGAP
for degradation)

直江 秀昭

Hideaki Naoe

指 導 教 員

佐々木 裕 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻
消化器内科学

佐谷 秀行 前教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程病態制御学専攻腫瘍医学

2010年度

学 位 論 文

Doctoral Thesis

論文題名：APC/C 活性化因子 Cdh1 は p190 RhoGAP の分解を通して
細胞骨格を制御している

(The APC/C activator Cdh1 modulates actin cytoskeleton by targeting p190 RhoGAP
for degradation)

筆者名： 直江 秀昭
Hideaki Naoe

指 導 教 員 名：熊本大学大学院医学教育部博士課程医学専攻消化器内科学
佐々木 裕 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程病態制御学専攻腫瘍医学
佐谷 秀行 前教授

| | |
|-------------------|----------|
| 審査委員長：細胞情報薬理学担当教授 | 中西 宏之 教授 |
| 審査委員名：細胞医学担当教授 | 中尾 光善 教授 |
| 分子生理学担当教授 | 富澤 一仁 教授 |
| 分子遺伝学担当教授 | 尾池 雄一 教授 |

2010年度

目次

| | |
|---|----|
| 1 要旨 | 3 |
| 2 発表論文リスト | 5 |
| 3 謝辞 | 6 |
| 4 略語一覧..... | 6 |
| 5 研究の背景と目的..... | 8 |
| 5-1 Cdh1の既知の機能 | 8 |
| 5-2 細胞周期以外のCdh1の機能 | 8 |
| 5-3 Rho活性の調節機構 | 9 |
| 5-4 Rho活性の新しい調節機構 | 10 |
| 5-5 本研究の目的 | 10 |
| 6 実験方法..... | 11 |
| 6-1 マウス | 11 |
| 6-2 <i>β-geo</i> 遺伝子カセットの置換 | 11 |
| 6-3 細胞培養と形質導入 | 11 |
| 6-4 遺伝子発現の定量的解析 | 12 |
| 6-5 共焦点レーザー顕微鏡による免疫蛍光染色の観察 | 12 |
| 6-6 免疫組織学的解析 | 12 |
| 6-7 免疫沈降、ウエスタンブロットと抗体 | 13 |
| 6-8 Rho活性化アッセイ | 13 |
| 6-9 <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> ユビキチン化アッセイ | 14 |
| 6-10 細胞走化性試験 (migration assay)..... | 14 |

| | |
|--|-----------|
| 6-11 <i>Cdh1</i> ^{GT/GT} ES細胞株樹立と4倍体キメラマウスの作製..... | 14 |
| 6-12 走査型電子顕微鏡 | 15 |
| 7 実験結果..... | 16 |
| 7-1 <i>Cdh1</i> Gene Trap (GT)マウスの作製..... | 16 |
| 7-2 マウス発生における <i>Cdh1</i> の生理的役割の検討..... | 17 |
| 7-3 <i>Cdh1</i> 欠損が細胞骨格に与える影響の検討..... | 23 |
| 7-4 <i>Cdh1</i> はRhoGTPaseの活性を調節している | 25 |
| 7-5 <i>Cdh1</i> はp190 RhoGAP量を調節している | 26 |
| 7-6 APC/ <i>C^{Cdh1}</i> によるp190のユビキチン化..... | 29 |
| 7-7 <i>Cdh1</i> によるp190を介した細胞運動の調節..... | 33 |
| 7-8 <i>Cdh1</i> ^{GT/GT} マウス胎児にみられた発生異常 | 35 |
| 8 考察 | 37 |
| 8-1 様々な経路によるRhoの調節..... | 37 |
| 8-2 <i>Cdh1</i> によるp190の量的な調節..... | 37 |
| 8-3 <i>Cdh1</i> によるp190のユビキチン化と分解 | 38 |
| 8-4 <i>Cdh1</i> ^{GT/GT} マウスと <i>ROCK</i> ノックアウトマウスの類似性..... | 38 |
| 8-5 4倍体キメラ法による <i>Cdh1</i> ^{GT/GT} マウスのレスキュー | 39 |
| 9 結語 | 40 |
| 10 参考文献..... | 41 |

1 要旨

【目的】 Cdh1 は E3 ユビキチンリガーゼである Anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C)の活性化因子であり、様々な細胞周期調節因子をプロテアソーム依存的に分解することで分裂期後期から G1 期への進行を制御している。これらの細胞周期における Cdh1 の機能は主に哺乳類の培養細胞やハエ、酵母などのモデル生物を用いた研究を通して明らかにされてきた。また、最近の研究で Cdh1 はニューロンなど分裂を終えた細胞からなる組織でも発現し、機能を持つことが報告されている。本研究は、Cdh1 のさらなる生理的機能を明らかにすることを目的とする。

【方法】 生体での Cdh1 の機能を明らかにするために *Cdh1^{+/-GT}* マウス同士を交配することにより *Cdh1^{GT/GT}* マウスの作製を試みた。しかし、*Cdh1^{GT/GT}* マウスは胎生致死であったことから胎児より線維芽細胞を樹立し、細胞骨格の解析を行った。また、線維芽細胞以外における Cdh1 の機能を調べるために HeLa 細胞に siRNA を形質導入することで Cdh1 を欠損させ同様に解析した。細胞骨格の他に、細胞運動の評価を細胞走化性試験により行った。4 倍体キメラ法にて Cdh1 のレスキューマウスを作製し、その解析を行った。

【結果】 *Cdh1^{GT/GT}* マウスの線維芽細胞および Cdh1 ノックダウン HeLa 細胞では、免疫染色学的解析においてアクチン線維と接着斑の著明な減少を認めた。この結果を裏付けるようにアクチン線維の重合と接着斑の形成を制御している RhoGTPase の活性が、Cdh1 ノックダウン細胞では有意に低下していた。Rho 関連蛋白の発現をみると、*Cdh1^{GT/GT}* マウス線維芽細胞では Rho の代表的な抑制因子である p190 RhoGAP の発現が増加していた。siRNA で Cdh1 の発現を抑制した細胞と、ドミナントネガティブに作用する Cdh1 変異体を過剰発現させた細胞を用いた実験においても同様の結果が得られた。Cdh1 を欠損した細胞にプロテアソーム阻害剤 MG132 処理すると、p190 のユビキチン化が促進され、Cdh1 を過剰発現させた状態でも p190 のユビキチン化が増強した。*in vitro* でも Cdh1 存在下に p190 はユビキチン化され、免疫沈降法では Cdh1 と p190 は共沈した。Cdh1 欠損細胞の運動能は低下しており、p190 を同時に欠損させることで運動能を回復させることが可能であった。*Cdh1^{GT/GT}* マウス胎児の解析では胎盤の血栓と閉眼の遅れという所見を呈し、これらはそれぞれ Rho のエフェクターである ROCK II と ROCK I ノックアウトマウスの表現形と類似していた。

【考察】 細胞周期調節以外の Cdh1 の機能はこれまでほとんど明らかにされていない。本研究の結果により、Cdh1 は細胞周期の進行と細胞骨格の形成という二つの現象に関与している可能性が示唆された。

【結論】 細胞周期の進行に関連する既知の蛋白質に加えて、Cdh1 は p190 RhoGAP を分解の標的としており、その結果 Rho の活性を調節することで細胞骨格を制御している可能性がある。

Abstract

Cdh1 is an activator of the anaphase-promoting complex/cyclosome and contributes to mitotic exit and G1 maintenance by targeting cell-cycle proteins for degradation. The role of Cdh1 as a regulator of the cell cycle has been investigated mainly using mammalian cultured cells or model organisms, such as flies and yeast. However, Cdh1 is expressed and active in postmitotic or quiescent cells, suggesting its functions other than cell-cycle control. To further elucidate the physiological functions of Cdh1, we generate *Cdh1* gene-trapped (*Cdh1*^{G^T/G^T}) mouse, which loss the function of Cdh1. *Cdh1*^{G^T/G^T} mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and *Cdh1*-depleted HeLa cells reduced stress-fiber formation significantly. The GTP-bound active Rho protein was apparently decreased in the *Cdh1*-depleted cells. The p190 protein, a major GAP for Rho, accumulated both in *Cdh1*^{G^T/G^T} MEFs and in *Cdh1*-knockdown HeLa cells. Cdh1 formed a physical complex with p190 and stimulated the efficient ubiquitination of p190, both *in vitro* and *in vivo*. These results indicate that p190 is the target protein of Cdh1 for degradation. As the coordinated regulation of Rho activity is important for cell migration, we investigated whether Cdh1 deficiency affected cellular movement. The motility of *Cdh1*-depleted HeLa cells was impaired; however, co-depletion of p190 rescued the migration activity of these cells. Moreover, *Cdh1*^{G^T/G^T} embryos exhibited similar phenotypes to those observed for Rho-associated kinase I and II knockout mice: eyelid closure delay and disruptive architecture with frequent thrombus formation in the placental labyrinth layer, respectively. Furthermore, the p190 protein accumulated in the *Cdh1*^{G^T/G^T} embryonic tissues. These data revealed a novel function for Cdh1 as a regulator of Rho and provided insights into the role of Cdh1 in cell cytoskeleton organization and cell motility.

2 発表論文

関連論文

Naoe H, Araki K, Nagano O, Kobayashi Y, Ishizawa J, Chiyoda T, Shimizu T, Yamamura K, Sasaki Y, Saya H, Kuninaka S
The APC/C activator Cdh1 modulates RhoGTPase by targeting p190 RhoGAP for degradation.

Mol Cell Biol. 30: 3994-4005, 2010.

その他の論文

Kuninaka S, Iida S, Hara T, Nomura M, Naoe H, Morisaki T, Nitta M, Arima Y, Mimori T, Yonehara S, Saya H.

Serine protease Omi/HtrA2 targets WARTS kinase to control cell proliferation.

Oncogene 26: 2395-2406, 2007.

3 謝辞

本研究を行うにあたり御指導、御支援くださいました熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻消化器内科学 佐々木 裕教授ならびに慶應大学医学部先端医科学研究所遺伝子制御研究部門 佐谷秀行教授に深く感謝いたします。また、研究の方向性について日々御指導を頂いた國仲慎治助教、永野 修助教に深く感謝いたします。本研究の一部をサポートしていただきました実験助手の石松幾予さん、口輪野照子さん、鈴木菜穂子さん、伊藤嘉祐さんに感謝いたします。また、事務的な支援をいただきました新井邦子さんに合わせて御礼申し上げます。研究を遂行するにあたり、Cdh1 Gene-trap mouse、Cdh1 knock-in mouse、Cdh1 rescue mouse を作製していただいた熊本大学発生生物研 荒木喜美先生、アクチンの定量的解析を行っていただいたリンクジェノミクス株式会社 篠田 剛さん、p190 発現ベクター pEGFP-p190 RhoGAP を御供与いただいた大阪バイオサイエンス研究所 佐邊壽孝教授、pWZL-hyg-SV40 large T レトロウイルスベクターを御供与いただいた前田高宏博士、P.P. Pandolfi 博士に深く感謝いたします。また多方面にわたりご協力いただきました慶應義塾大学医学部先端医科学研究所遺伝子制御研究部門の皆さまに心から感謝申し上げます。最後に、本研究を論文投稿中に亡くなった父に捧げます。

4 略語一覽

APC ; anaphase promoting complex

Cdh1 ; cdc20 homolog 1

GAP ; GTPase activating protein

GEF ; guanine nucleotide exchanging factor

GDI ; guanine dissociation inhibitor

ROCK ; Rho-associated kinase

LPA ; lysophosphatidic acid

MEF ; mouse embryonic fibroblast

dpc ; days post coitum

ES ; embryonic stem cell

RT-PCR ; reverse transcript –polymerase chain reaction

IP ; immunoprecipitation

MD ; mid domain

FBS ; fetal bovine serum

TGC ; trophoblast giant cell

RNAi ; RNA interference

5 研究の背景と目的

5-1 Cdh1 の既知の機能

分裂期促進因子複合体 (APC/C) は様々な細胞周期関連の蛋白質を分解する E3 ユビキチンリガーゼとして働く複合体である(19, 46)。APC/C によってユビキチン化された蛋白質は 26S プロテアソームによって認識、分解され、細胞周期を進行させる。APC/C の活性は細胞周期の時期特異的に APC/C と結合する活性化因子に強く依存する。Cdh1(Fzr, Hct1, Srw とも言う)は分裂期の前中期から G1 期の終わりにかけて APC/C の活性を維持している活性化因子の 1 つである(43) (53)。

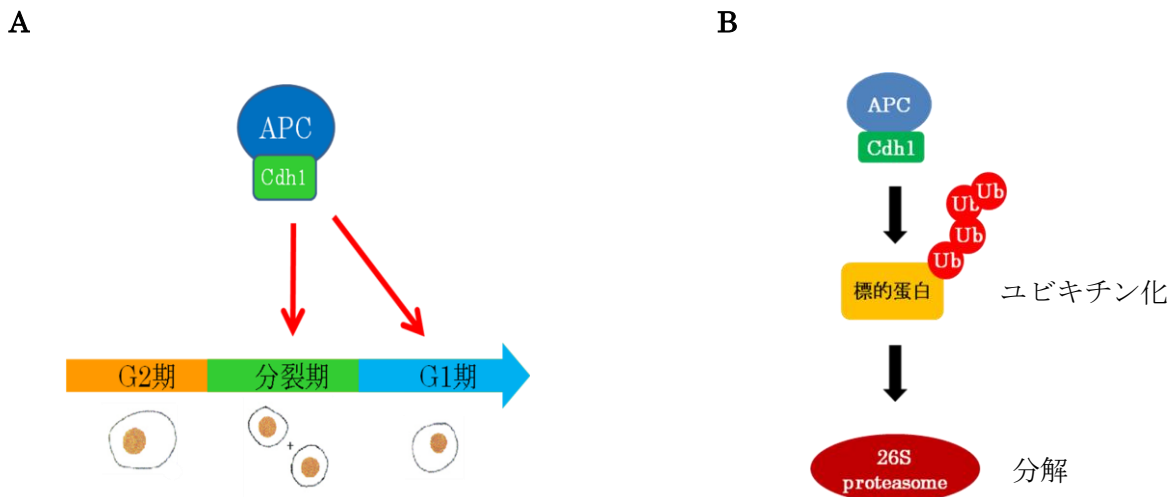


図 1 ; Cdh1 は分裂期後期~G1 期にかけて活性をもつ

(A)Cdh1 は細胞分裂の分裂期後期~G1 期にかけて活性を持つ。(B)分裂期に関わる様々な蛋白質をユビキチン-プロテアソーム系依存的に分解することで細胞周期の進行を厳密に制御している。

5-2 細胞周期制御以外の Cdh1 の機能

APC/C^{Cdh1} の細胞周期進行における機能についてはよく研究が進んでいる。しかし、最近の研究が Cdh1 の機能の新たな一面を明らかにしつつある。例えば、Cdh1 の発現は細胞周期に限ったことではない。APC/C^{Cdh1} は静止期の培養細胞においても発現し、その活性を持

っている(9)。さらにニューロンなど分裂を終えた細胞が大部分を占める多くの組織でも Cdh1 が発現していることが免疫組織染色学的解析から明らかになっている(1, 16)。さらに APC/C^{Cdh1} は軸索の伸長とパターン化を促進すること(20)、また、ニューロンの生存に必要であること(1)が報告されている(図 2)。これらの結果は APC/C の活性化因子である Cdh1 のニューロンにおける重要性を物語っており、その他、Cdh1 は筋組織の分化にも関わっていることが示されている(25)。Cdh1 が静止期の細胞を含む器官に広く発現していることを合わせて考えると、他にも Cdh1 の機能として未知なものが存在する可能性が十分に考えられる。

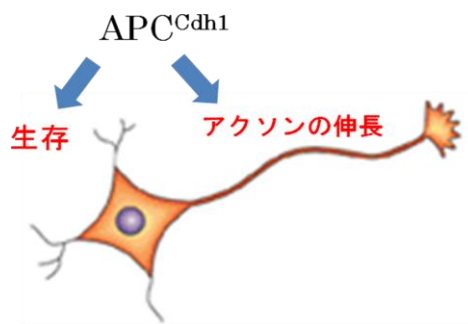
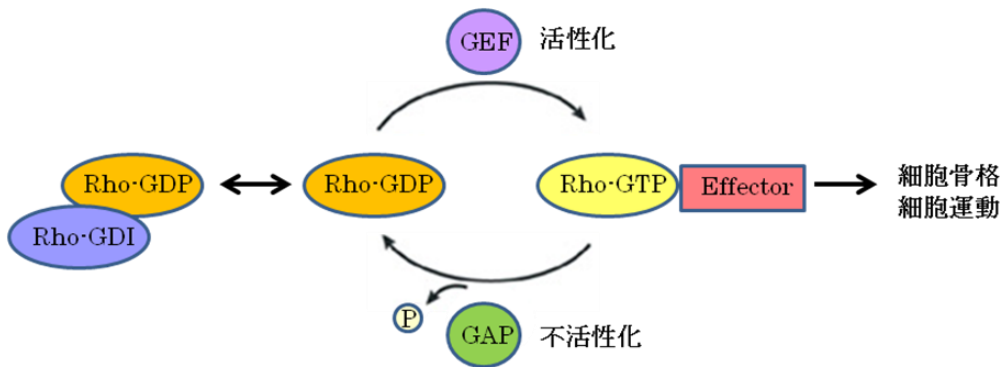


図 2 ; 細胞周期制御以外の Cdh1 の機能

近年、ニューロンのように分裂を終えた細胞においても Cdh1 が発現し、機能を持っていることが報告されている。

5-3 Rho 活性の調節機構

RhoGTPase は細胞の形態や極性、アクチン重合による運動、アクトミオシン収縮、接着、微小管動力などの調節において中心的な役割を果たしている(13)。Rho を含む small G 蛋白質は不活性型の GDP 結合状態と活性型の GTP 結合状態を繰り返す分子スイッチとして働いている。後者が ROCK 等の下流の分子と結合しそれらを活性化させる。RhoGTPase の活性は 3 つの重要な調節因子によって制御されている。(a)GDP と GTP の交換を触媒し、RhoGTPase を活性化させるグアニンヌクレオチド変換因子(GEF) (41)、(b)RhoGTPase の内因性 GTPase 活性を刺激し不活性化させる GTPase 活性化蛋白(GAPs)(8)、(c) GDP 結合型 RhoGTPase と結合し、細胞質に留めておくことで GDP と GTP の交換を阻害するグアニンヌクレオチド解離阻害因子(GDIs)である(33)。



(Nature Reviews Cancer, 2002 を一部改変)

図 3 ; Rho 活性の調節機構

Rho は不活性型の GDP 結合状態と活性型の GTP 結合状態を繰り返す分子スイッチとして働いており、GEF、GAP、Rho-GDI の 3 つの重要な調節因子によって制御されている。

5-4 Rho 活性の新しい制御機構

これらの確立された調節に加えて、最近の研究で Rho の活性調節にユビキチン経路が関与していることが示された。HECT ドメイン型 E3 ユビキチンリガーゼである Smurf1 が細胞の辺縁で Rho を分解し、局所での蛋白量を調節しているというものである(40, 55)。これらの研究により RhoGTPase 活性の調節機構は従来考えられていたものよりはるかに複雑であると思われる。

5-5 本研究の目的

これまで Cdh1 の研究は培養細胞やモデル生物を使った細胞周期における機能に関するものが主であった。しかし、前述の通り Cdh1 は神経など分裂を終えた組織にも広く分布しており、細胞周期以外の機能をもつことが指摘されている。また、Cdh1 は様々な癌との関連も報告されており、Cdh1 が持つ機能の解明は疾患を含め幅広い現象への応用へとつながる可能性を持つことが予想される。本研究は未だその詳細について不明である細胞周期調節以外の Cdh1 の生理的な役割を明らかにする目的で、*Cdh1*^{GT/GT} マウス胎児およびその胎児より樹立した線維芽細胞を中心に解析を行った。

6 実験方法

6-1 マウス

Cdh1^{+/GT} マウス(C57BL/6)は *Cdh1* の遺伝子座に pU-17 転換 GT ベクター(48)を導入した TT2 ES 細胞株(57)より作製された。これらのマウスは TransGenic 社 (熊本) より購入した。ベクター挿入部位は 5'-RACE およびプラスミドレスキュー法で評価した。変異マウスの遺伝子型は Gs4 (5'-CCTCCACTACAGCAGCACG-3'), Gas7 (5'-CTCCAAGGCCTTTGTGAGGC-3'), SA6as (5'-CCGGCTAAAACCTTGAGACCTTC-3') プライマーによる PCR で確認した。*Cdh1*- β -ガラクトシダーゼ/ネオマイシン耐性遺伝子 (β -geo) 融合 mRNA は変異型マウスより得られた cDNA を 5NC-S (5'-TGTTCTGGGACCGGCCGGGAAC-3') および LZUS-3 (5'-CGCATCGTAACCGTGCATCT-3')プライマーを用いた PCR により決定した。

6-2 β -geo 遺伝子カセットの置換

Cdh1^{+/GT} マウス細胞の β -geo 遺伝子カセットを *Cdh1* cDNA で置換した ES 細胞を作り出すために、P17/*Cdh1* 置換ベクターを pCAGGS-Cre (Cre リコンビナーゼをコードする) (3) とともに *Cdh1*^{+/GT} ES 細胞に電気穿孔法で導入した。置換を起こした細胞のみを選び取るために puromycin を含む培地で 1 日培養した。puromycin による選別は 2 日置きに 2 度行った。ノックイン (KI) された *Cdh1*^{KI} 遺伝子の確認には 5NC-s2(5'-TCGAACAGGCGCGGCGTGTT-3') と FzrAS2(5'-ATAGTCCTGGTCCATGGTGGAG-3')プライマーを用いた RT-PCR を行った。PCR 産物は pGEM-T easy ベクター(Promega 社)にクローニングし、配列を確認した。

6-3 細胞培養と形質導入

マウス線維芽細胞 (MEF) は以下の方法で樹立した。*Cdh1*^{+/GT} マウス同士を交配し、雌マウスを交配後 11.5 日目に開腹し摘出した子宮を PBS で洗浄した。卵黄嚢を遺伝子型決定用に取り分け、胎児は PBS で洗浄した。顕微鏡下に胎児の内臓を除去し、残りを PBS 洗浄後、TrypLE Express (Invitrogen 社)で 37°C、20 分間インキュベートした。数回ピペティング後、滅菌したセルストレイナー(100 μ m)を通して組織塊を除去した。細胞懸濁液を 10%ウシ胎児血清 (FBS)メEDIUMで洗浄し、100 mm 培養ディッシュで培養した。MEF の不死化は、plat-E 細胞に pWZL-hyg-SV40 large T 抗原(28)を形質導入して得られたウイルス液を MEF に形質導入した。細胞は hygromycin 入りメEDIUMで 1 週間培養することで選別した。HeLa 細胞と 293T 細胞の培養と形質導入は 6 穴プレートで各種プラス

ミドを FuGene HD 試薬 (Roche 社) を用いて行った。すべての培養細胞は DMEM/F-12 培地 (Sigma 社) に最終濃度 10% 牛胎児血清を加えたもので 37°C、5% CO₂ 培養器にて継代培養した。pEGFP-c/full-length p190 は佐邊壽孝教授より御供与いただいた(51)。siRNA の配列は以下の通りである。siEmi1, 5'-GAGAAUUUCGGUGACAGUCUA-3' (27)、sip190, 5'-UUGACAUCGUGGAAGUGAAGA-3'

6-4 遺伝子発現の定量的解析

MEF より RNeasy Minikit (Quiagen 社) を用いて総 RNA を抽出し、PrimeScript (Takara 社) で逆転写反応を行った。SYBR Premix Ex Taq (Takara 社) で Thermal Cycler Dice 機 (Takara 社) により Real-time PCR を行った。これらの反応に用いたマウス p190A と GAPDH のプライマーは TAKARA 社より購入した。相対的 mRNA 量は p190A 遺伝子のサイクル閾値(C)を GAPDH で補正して算出した。

6-5 共焦点レーザー顕微鏡による免疫蛍光染色の観察

解析の前日に MEF または HeLa 細胞を 35mm ディッシュに播いた (5×10^4 個/ディッシュ)。細胞を 4% パラホルムアルデヒド/PBS で 15 分間固定し、PBS にて洗浄した後、0.2% TritonX-100/PBS で 5 分間処理した。細胞はアクチンを Alexa Fluor 488 標識 phalloidin 500 倍希釈で 1 時間染色した。パキシリンは抗パキシリン抗体 500 倍希釈で一晩染色した後、Alexa Fluor 555 標識抗マウス抗体 (Molecular Probes 社) 500 倍希釈で 1 時間インキュベートした。染色した細胞は 1,4-diazabicyclo-[2,2,2]-octane/glycerol で封入し、Olympus 社共焦点レーザー顕微鏡 (FV300; Olympus) にて観察した。FITC-phalloidin で標識された細胞の蛍光強度解析には MetaXpress software (Molecular Devices 社) を使用した。

6-6 免疫組織学的解析

組織を 4% パラホルムアルデヒド/PBS で一晩固定した後パラフィン包埋し、切片を H-E 染色した。眼瞼の免疫組織学的解析では 18.5 日目の胎児より切り出した 4 μ m 切片を、抗原を露出させるために電子レンジを用いて 20 分間クエン酸バッファー (pH7.0) 中で沸騰させた。非特異的部位は M.O.M. kit (Vector laboratories 社) で 1 時間ブロックした。切片を抗 p190A 抗体 (BD 社, 1:50) で一晩インキュベートし、PBS で 3 回洗浄した。その後、ビオチン化 MOM 希釈液中の抗マウス IgG で 10 分間インキュベートした。染色には Elite ABC 試薬 (Vector Laboratories 社) と DAB 基質 (Wako 社) を用いた。胎児の免疫染色には 12.5 日目の胎児を Tissue-Tek OCT compound medium (Sakura 社) に包埋し、アセトン/ドライアイス内で凍結した。凍結切片は上記のように染色した。

6-7 免疫沈降、ウエスタンブロットと抗体

0.5% NP40 lysis バッファーにて調整した等量の細胞抽出液を 5-15% ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、その後ニトロセルロースメンブレンに 140mA、70 分で転写した。転写後のメンブレンは 5% スキムミルクを含む PBS で室温、30 分間ブロッキングした後、各種 1 次抗体 (0.03% Tween/PBS にて 500 倍~1000 倍希釈) を 4°C で一晩反応させた。メンブレンを 0.3% Tween/PBS にて 3 回洗浄し、2 次抗体 (すべて 0.03% Tween/PBS にて 20,000 倍希釈) を室温、40 分間反応させた後、0.3% Tween/PBS にて 3 回洗浄し、ECL 化学蛍光発色システムで蛋白発現を検討した。免疫沈降、ユビキチン反応ではアガロースビーズの代わりに磁気 Dynal ビーズ (Invitrogen 社) を使用した。いくつかの実験ではウエスタンブロット後に得られたバンドの強弱を MacBAS2000 (Fuji Film 社) 用いて計測後、定量化して解析した。実験には以下の抗体を用いた。抗 myc 抗体 (9E10; Santa Cruz Biotechnology 社), 1:1000、抗 HA 抗体 (12CA5; Santa Cruz Biotechnology 社), 1:1000、抗 GFP 抗体 (FL; Santa Cruz Biotechnology 社), 1:500、抗 Cdh1 抗体 (DH01; Abcom 社), 1:500、抗 p190A 抗体 (BD 社), 1:1000、抗 α -tubulin 抗体 (B-5-1-2; Sigma 社), 1:50,000、抗 Rho 抗体 (-A, -B, -C; Cell Signaling 社), 1:1000、抗 Rac 抗体 (Upstate Biotechnology 社), 1:1000、抗 RhoGDI 抗体 (Millipore 社), 1:500、抗 Skp2 抗体 (Zymed 社), 1:250、抗 cyclin B 抗体 (GNS1, Santa Cruz Biotechnology 社), 1:200、抗 Emi 1 抗体 (Zymed 社), 1:200 Cdh1 の免疫沈降に用いた抗 Cdh1 ラビットポリクローナル抗体は合成ペプチド (MDQDYERRLLLRQII、マウス Cdh1 1-14 アミノ酸に一致) でラビットを免疫することにより作成した。

6-8 Rho 活性化アッセイ

Cdh1 もしくはコントロールに対する siRNA oligo を HEK293 細胞に形質導入した。形質導入 48 時間後、回収前に 10 分間 LPA (10 μ M; Sigma 社) 処理した。25mM フッ化ナトリウム, 1mM ナトリウムオルトバナジウム酸塩, 20 μ M MG132, プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche 社) で飽和したマグネシウム含有バッファー (25mM HEPES, pH7.5, 150mM NaCl, 1% Igepal CA-630, 10mM MgCl₂, 1mM EDTA, 2% glycerol) で細胞を溶解した。溶解液を 4°C で 14,000g, 5 分間遠心分離し、上澄をグルタチオンセファロースビーズ (GH healthcare) に結合した 25 μ g の GST-RBD (Rhotekin の Rho-binding domain [7-89 アミノ酸]) と 4°C で 30 分間インキュベートした。ビーズはその後マグネシウムを含むバッファーで 3 回洗浄し、抗 Rho (-A, -B, -C) ポリクローナル抗体 (Upstate Biotechnology 社) を用いたウエスタンブロット法で解析した。対照として全細胞溶解液の一部をウエスタンブロットに用いた。

6-9 In vitro、in vivo ユビキチン化アッセイ

Cdh1 精製蛋白はマウス Cdh1 cDNA を penta-His-tag に一致する oligolinker で pFASTBAC1(Invitrogen 社)にサブクローニングした。バキュロウイルスを手引き(Invitrogen 社)に従って準備した。sf9 細胞に MOI=5 のバキュロウイルスを 48 時間形質導入した。精製 Cdh1 蛋白は Ni-NTA spin kit (Qiagen 社)で精製した。In vitro ユビキチン化実験は以前報告されている方法に準じた(22) (47)。APC/C を HeLa 細胞から抗 cdc27 抗体(Santa Cruz Biotechnology 社)で免疫沈降した。免疫精製した APC/C を精製 Cdh1 蛋白と結合させ、ユビキチン化反応に用いた。APC/C 結合抗体ビーズは精製 E1 (80 µg/ml)、UbcX(50 µg/ml)、ユビキチン(1.25 mg/ml)、ATP 再合成システム(7.5 mM creatine phosphate, 1 mM ATP, 1 mM MgCl₂, 0.1 mM EGTA, and 39 U/ml rabbit creatine phosphokinase type I)、基質と混和した(22)。基質として用いた全長もしくは欠損変異型 p190 は TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System(Promega 社)とピオチン化リシン(Promega Transcend tRNA)を用いて手引きに従って作製した。In vivo ユビキチン化反応は HA 標識ヒトユビキチンと pEGFP-c/full-length p190 を形質導入した 293T 細胞を 24 時間培養後に 10 µM MG132 で 6 時間処理した。細胞を回収し、抗 GFP 抗体を用いた免疫沈降を行った。試料はポリユビキチン化を認識するための抗 HA 抗体によるウェスタンブロット法に用いた。

6-10 細胞走化性試験 (Migration assay)

走化性試験は、Becton Dickinson 社の 8.0 µm ポアサイズのポリカーボネート・メンブレンフィルターを用いて以下のように行った。まず、HeLa 細胞にコントロールおよび Cdh1, Cdh1 と p190 の siRNA oligo を形質導入した。48 時間培養後、0.5 ml の無血清培地中の 5 × 10⁴ 個の細胞を、血清入り培地 1 ml に浸した上部チャンバーに注入した。その後 37°C、5% CO₂ 培養器にて 24 時間培養したのち、メンブレン下面に存在する遊走細胞を 100%メタノール固定し、50% Giemsa 染色液で染色した。遊走した細胞数は光学顕微鏡にて 100 倍で無作為に選択した視野内の細胞数を計測し、3 視野の平均を計算した。有意差は student の t 検定 (p<0.01) にて評価した。

6-11 Cdh1^{GT/GT} ES 細胞株樹立と 4 倍体キメラの作製

Cdh1^{GT/GT} ES 細胞株を樹立するために以前報告されている方法により、体外受精で 2 細胞期まで発生した胎児を胚盤胞期まで培養し ES 細胞株を樹立した(4) (31)。得られた細胞株は前述した方法で遺伝子型を決定した。4 倍体キメラ実験には BDF1 雌と ICA;CAG-EGFP-IRES-puromycin 雄の交配から得られた 2 細胞期胎児を KSOM 培地(ARK

Resource 社, 熊本)で回収した。胎児は融合バッファー(0.3M mannitol, 0.1mM MGSO₄, polyvinyl alcohol(0.1mg/ml), ウシ胎児血清アルブミン F-V (3mg/ml, Sigma 社)で平衡化し、電気融合チャンバー(1mm gap)の電極間に挿入した。電気融合は pulse generator (ECM2001; BTX, San Diego, CA)を用いて 80 V/cm、40 μsec 刺激を 2 回行った。融合胎児は KSOM 培地で 37°C、40 時間培養した。*Cdh1*^{GT/GT} もしくは野生型 ES 細胞はその後 4 倍体胎児と凝集し、偽妊娠マウスに移植した(29, 31)。

6-12 走査型電子顕微鏡

14.5-18.5 日目の胎児眼球を倒立顕微鏡下に切除し、2% グルタルアルデヒド、2%フォルムアルデヒドを含んだ 0.1M ナトリウムリン酸バッファー (pH7.4) で固定した。サンプルは洗浄後、段階的エタノールにより脱水した。その後、乾燥させスタンダード法により走査型電子顕微鏡で撮影した。

7 実験結果

7-1 Cdh1 Gene Trap (GT) マウスの作製

細胞周期の調節因子としての *Cdh1* の機能は主に哺乳類の培養細胞かショウジョウバエや酵母等のモデル生物を用いた研究で明らかにされてきた(35)。*Cdh1* の生理的な機能をさらに明らかにするために、 β -ガラクトシダーゼ・ネオマイシン耐性融合遺伝子(*β -geo*)をコードする可変式pU-17ベクターを用いて *Cdh1* gene-trap (GT)マウスを作製し解析した(図4)。Gene trap (GT)は遺伝子の機能を損失する1手法であり、この方法の原理はm-RNA スプライシングを途中で捕捉することである(図4上段)。*Cdh1* は14個のエクソンを持つが、gene trap 法によりGTベクターを1番目のイントロンに挿入した。また、ES細胞のRNAからRT-PCRした産物の直接シーケンスを行い、非コード第1エクソンと *β -geo* 遺伝子のmRNAが融合していることを確認した(図4下段)。

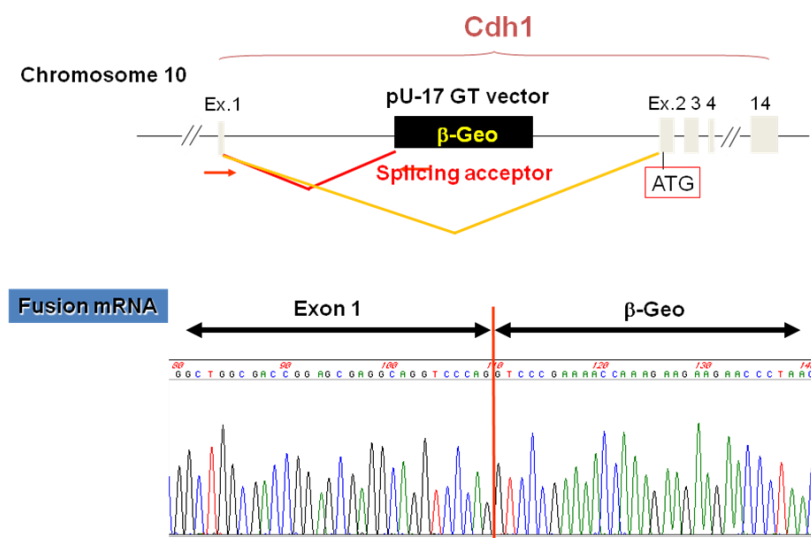


図4 ; Gene Trap (GT)法による *Cdh1* GT マウスの作製

(上段) 通常のエクソン1からエクソン2へのスプライシングは gene trap ベクターのスプライシングアクセプター配列によってトラップされる。これによりこの遺伝子は *Cdh1* の代わりに *β -geo* 遺伝子を発現する。(下段) RT-PCR 産物の直接シーケンスによる第1エクソンと *β -geo* 遺伝子融合の確認。

さらに gene trap の効果を確認するために *Cdh1* 野生型(*Cdh1*^{+/+})マウスとホモ接合の *Cdh1* GT (*Cdh1*^{GT/GT})マウスから樹立した線維芽細胞で *Cdh1* の発現レベルを比較した。メッセンジャーRNA レベル (野生型の 2%以下)、蛋白質レベルともに *Cdh1*^{GT/GT} マウス由来の線維芽細胞で有意に低下していた (図 5)。この結果は gene trap による *Cdh1* 遺伝子の発現抑制が効果的に機能することを示している。

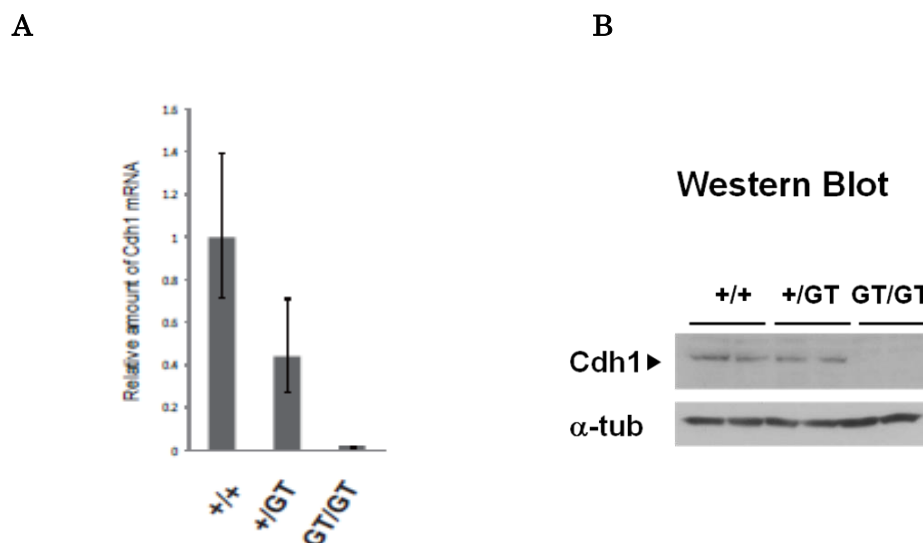


図 5 ; gene trap が *Cdh1* 発現に与える効果の確認

(A) *Cdh1*^{+/+}, *Cdh1*^{+/GT}, *Cdh1*^{GT/GT} MEF を用いて *Cdh1* mRNA の発現量を調べ GAPDH で補正した。(B) *Cdh1*^{+/+}, *Cdh1*^{+/GT}, *Cdh1*^{GT/GT} MEF 間で *Cdh1* 蛋白質の発現量をウエスタンブロットで比較した。

7-2 マウス発生における *Cdh1* の生理的役割の検討

生体内における *Cdh1* の重要性を調べるために *Cdh1*^{GT/GT} マウスを解析した。*Cdh1*^{+/GT} マウスの交配で得られた 152 匹のマウス中に、出生時 *Cdh1*^{GT/GT} マウスは見られず(表 1)、*Cdh1* GT のホモ接合マウスは胎生致死であることが確認された(15) (24)。胎生致死の時期と原因を明らかにするために、*Cdh1*^{+/GT} マウスの交配で得られた胎児の形態と生存を調べた。胎生 11.5~13.5 日齢の胎児の生存は心拍を指標とした。発生が進むにつれて生きた胎児は減少し、13.5 日齢にはすべて死亡した(表 1)。これらの結果により胎生致死は 10.5 日~12.5 日の期間に起こると思われた。

| Stage | No. of animals | | | |
|---------|----------------|------|-----------|----|
| | +/+ | +/GT | GT/GT | ND |
| E9.5 | 24 | 38 | 26 | 3 |
| E10.5 | 8 | 30 | 15 | |
| E11.5 | 22 | 58 | 24 (75) | |
| E12.5 | 32 | 95 | 32 (37.5) | |
| E13.5 | 20 | 32 | 21 (0) | |
| Weaning | 61 | 91 | 0 | |

表 1; *Cdh1*^{GT/GT} マウス胎児

()内は生存していた胎児の割合を示す。11.5日目~13.5日目の胎児について心拍の確認により生存を判定した。NDは未確認。

次に、*Cdh1*^{GT/GT}胎児の胎生致死の原因が*Cdh1* GTによるものであることを確かめるためにノックイン(KI)レスキュー実験を行った(図6A)。この結果、*Cdh1*ノックインマウスは通常通り出生し(図6B)、*Cdh1*^{GT/GT}マウスの胎生致死の原因が*Cdh1* GTによるものであることが確かめられた。

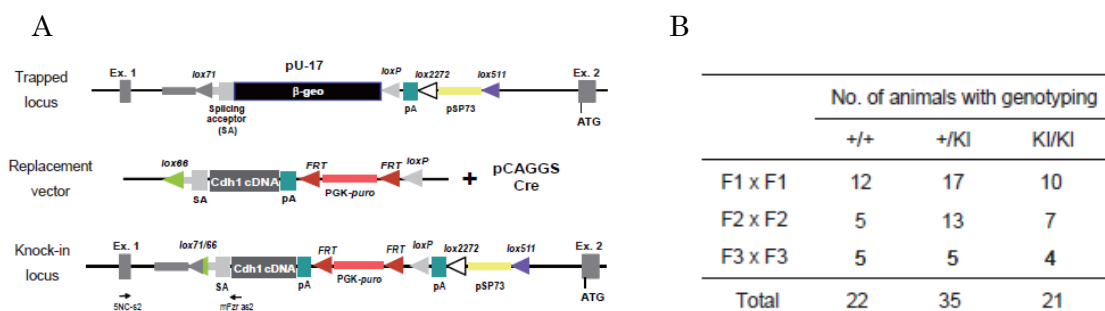


図 6: *Cdh1* KI 遺伝子の模式図と *Cdh1* KI マウス胎児

(A) *Cdh1* 置換ベクターと *Cdh1* ノックイン遺伝子。RT-PCR に使用したプライマーを矢印で示す。

(B) ノックインマウスの胎児

Cdh1^{GT} マウス胎児の外観を観察するとホモ接合の胎児はヘテロ接合または野生型の胎児と比較して小さかった (図 7)。妊娠中期の胎生致死の原因としてはいくつか考えられるが、主な原因としては造血系の異常、胎盤の機能不全、心血管系の異常などが挙げられる。解析した範囲内で造血系、心血管系には明らかな異常を認めなかった (データ提示なし)。

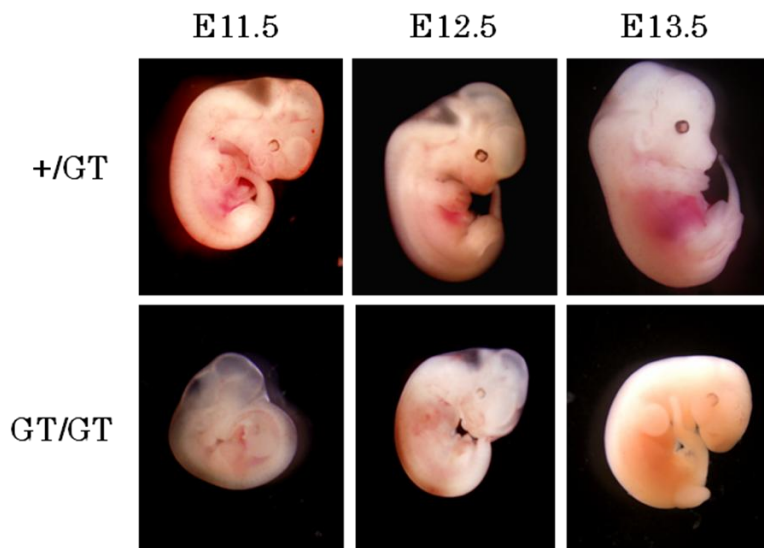


図 7 ; *Cdh1*^{GT} マウス胎児の表現形

Cdh1^{GT/GT} 胎児は *Cdh1*^{+/GT} 胎児と比較して小さく、13.5 日齢までに死亡していた。

マウスの胎盤は胎児側より迷路部層、海綿状栄養芽細胞層、栄養芽層巨大細胞(TGC)層の3層より構成される (図 8) (34)。野生型マウスの胎盤ではヘマトキシリン-エオジン染色とフォイルゲン染色で母親由来の脱落膜直下に TGC 層が薄く存在するのに対して、*Cdh1*^{GT/GT} マウスの胎盤では巨核の細胞は認められず (図 9A 下段)、*Cdh1*^{GT/GT} マウスの胎盤では TGC 細胞の多倍体化の異常をきたしていることを意味している(15) (24)。全胎盤の X-gal 染色でわかる通り *Cdh1* は *Cdh1*^{+/GT} マウス胎盤の迷路部層に発現していた (図 9B)。

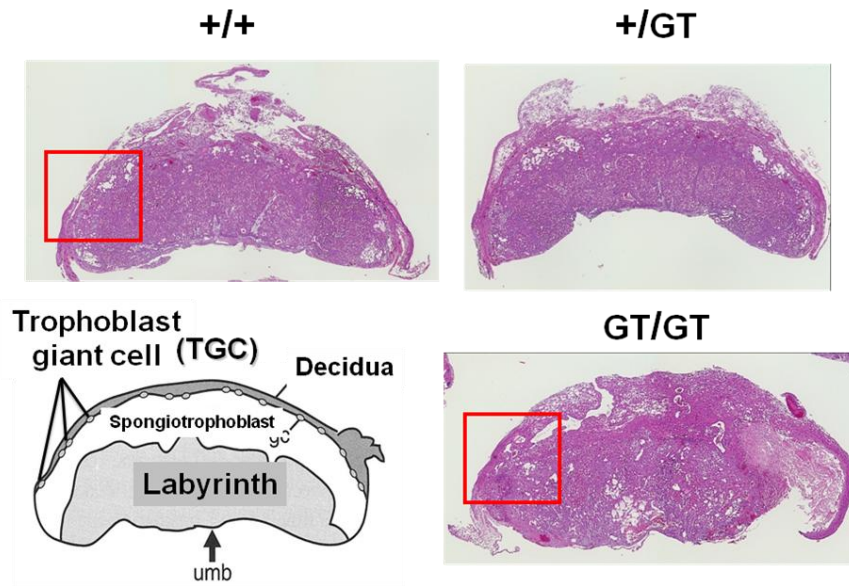


図 8; *Cdh1*^{GT} マウスの胎盤と模式図

マウスの胎盤は胎児側から順に迷路部層、海綿状栄養芽細胞層、栄養芽層巨大細胞(TGC)層の3層より構成される(左下)。赤色で囲んだ部分を拡大して図9に示した。

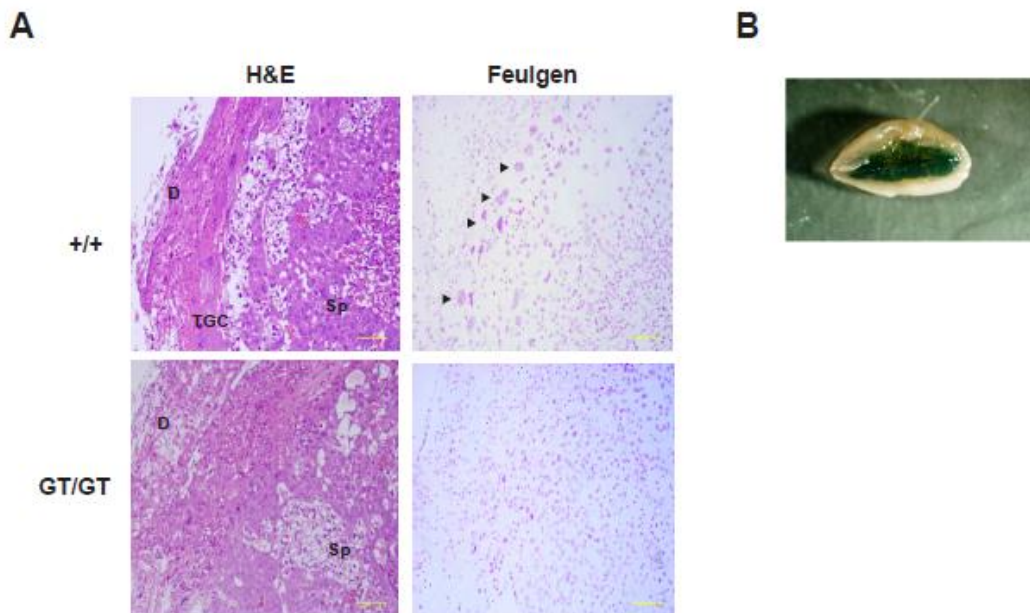


図 9; *Cdh1*^{GT/GT} マウス胎児にみられた胎盤の異常

(A)表示された遺伝子型の12.5日目の胎盤の連続切片をヘマトキシリン-エオジン染色、フォールゲン染色した。矢頭は野生型胎盤の巨核を示す。D; 母性脱落膜、Sp; 海綿状栄養芽細胞層、TGC; 栄養芽層巨大細胞層 (B) 12.5日目の*Cdh1*^{GT/GT} 胎盤全体のX-gal染色

12.5 日目、13.5 日目の *Cdh1*^{GT/GT} マウス胎盤のヘマトキシリン-エオジン染色で迷路部層に異常な血栓を認めた (図 10A 中段、10B)。これらは *ROCK II* (Rho-kinase または ROK α とも言われる) ノックアウトマウスの表現形と類似していた(41)。

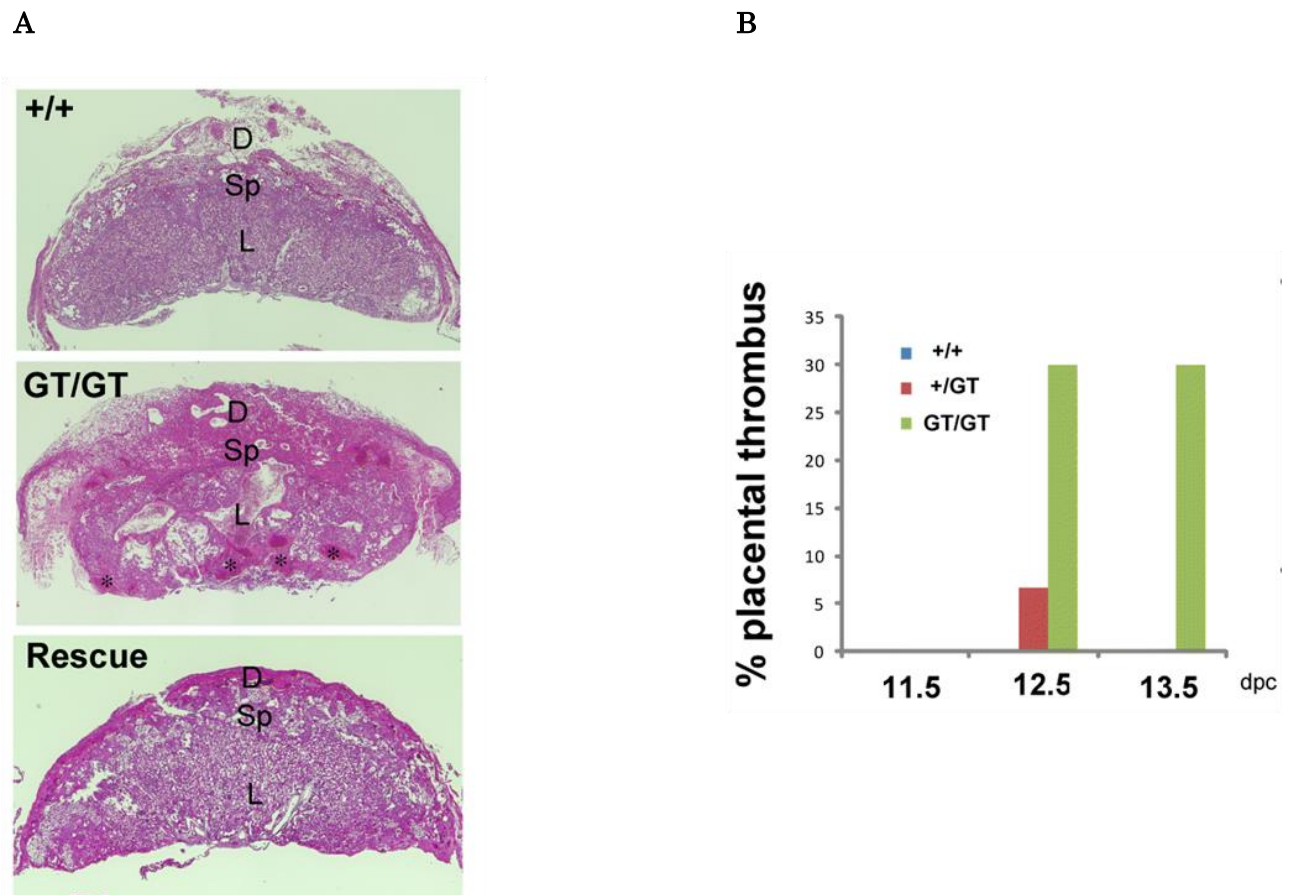


図 10 ; *Cdh1*^{GT/GT} マウス胎盤にみられた血栓

(A)12.5 日目の野生型、*Cdh1*^{GT/GT}、4 倍体キメラそれぞれの胎盤のヘマトキシリン-エオジン染色。アスタリスクは迷路部層の血栓を示す。D, 母性脱落層、Sp, 海綿状栄養芽細胞層、L, 迷路部層 (B) 表示された日数における胎盤血栓の割合。長径 500 μ m 以上の血栓を含む胎盤を陽性と判定した。解析した胎盤の数はそれぞれ以下の通りである。11.5 日目; *Cdh1*^{+/+} = 5、*Cdh1*^{GT/+} = 8、*Cdh1*^{GT/GT} = 7、12.5 日目; *Cdh1*^{+/+} = 6、*Cdh1*^{GT/+} = 15、*Cdh1*^{GT/GT} = 10、13.5 日目; *Cdh1*^{+/+} = 8、*Cdh1*^{GT/+} = 8、*Cdh1*^{GT/GT} = 10

この胎盤の異常が胎生致死の主な原因になっているかどうかを確かめるために、4倍体キメラレスキュー実験を行った(図 11A)。4倍体キメラ法は一般的に胎盤や trophoblast、yolk sac 等の胎児外組織の異常が原因で胎生致死になる胎児を救出するために用いられる方法である。この方法により ES 細胞由来の胎児と野生型の胎盤を得ることができる。*Cdh1*^{GT/GT} 胎児はこの系で器官形成期を過ぎた 18.5 日目でも生存しており(図 11B)、胎盤の異常が *Cdh1*^{GT/GT} マウスの胎生致死の原因であることが確認された。また、GFP とβ-ガラクトシダーゼがそれぞれ胎盤(図 11C)、胎児(図 11D)でのみ発現していることを確認した。胎盤のヘマトキシリン-エオジン染色では trophoblast giant cell を認めた。

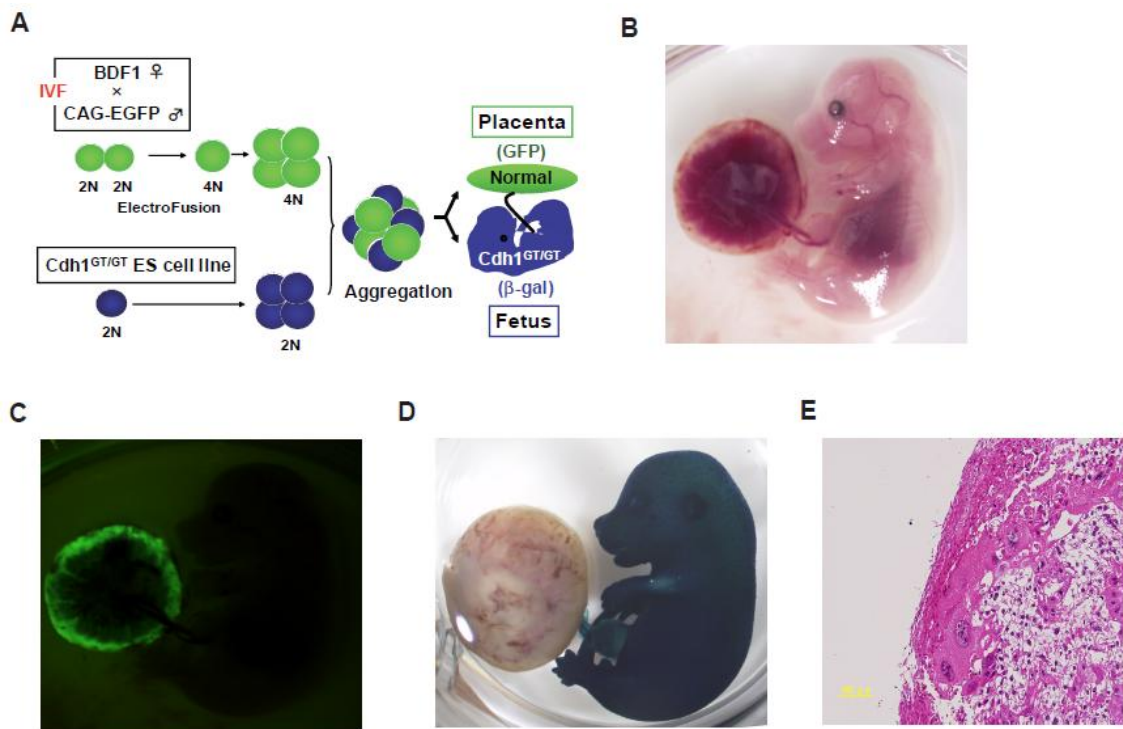


図 11 ; 4倍体キメラ法による *Cdh1*^{GT/GT} 胎児のレスキュー

(A) 4倍体キメラ法の模式図。(B)この実験により18.5日目でも生存していた胎児の代表的写真。(CとD) (B)に示された胎盤と胎児のEGFP蛍光像(C)とX-gal染色(D)。(E) (B)に示された18.5日目の胎盤のヘマトキシリン-エオジン染色。黄線は100 μm。

7-3 Cdh1 欠損が細胞骨格に与える影響の検討

Cdh1 の哺乳類細胞における役割を明らかにするために、まず *Cdh1*^{GT/GT} マウス線維芽細胞をタイムラプス顕微鏡で観察した。そして野生型マウス線維芽細胞と比較して *Cdh1*^{GT/GT} マウス線維芽細胞の運動性が若干低下していることを見出した（データ提示なし）。この違いは *Cdh1*^{GT/GT} マウス線維芽細胞の増殖の低下を反映している可能性があった。しかし、他の可能性として細胞運動に重要な役割を果たしている細胞骨格の構造に着目した。*Cdh1*^{GT/GT} マウス線維芽細胞と野生型マウス線維芽細胞間でアクチン線維の分布について比較検討した（図 12）。Alexa Fluor 488 結合 phalloidin で標識した細胞の蛍光免疫染色で Cdh1 を欠損した細胞は細胞体でアクチンストレスファイバーが著明に減少した特徴的な形態を呈した（図 12A-a,b）。細胞質を横切る線を引き、その線と重なるストレスファイバーの濃度を定量化した（図 12B）。蛍光強度の異なるピークは図 12A に書かれた線と重なる個々のストレスファイバーを現している。野生型線維芽細胞と比較して *Cdh1*^{GT/GT} マウス線維芽細胞ではグラフのピークが著明に低下していたが、細胞辺縁のアクチン線維は保たれていた（図 12B）。次にマウス線維芽細胞で認められた現象をさらに確かめるために HeLa 細胞に Cdh1 に対する siRNA オリゴを形質導入し、これらの細胞で細胞骨格の解析を行った（図 12C）。Cdh1 欠損細胞はストレスファイバーの形成が低下しており（図 12C-a,b）、この抑制効果は無血清培地による培養でさらに増強された（図 12C c, d）。さらに Cdh1 のストレスファイバーに及ぼす影響を調べるために、Cdh1 が基質と結合する C 末端を欠きドミナントネガティブに作用する変異型の Cdh1 N 末端断片（DN-Cdh1）（54）を用いて同様の実験を行った。GFP-DN-Cdh1 を発現した HeLa 細胞は周囲の形質導入されていない細胞と比較して、平たく、細胞質のストレスファイバーが減弱し、辺縁のアクチンが増強した傾向を示した（図 12 D,E）。NIH3T3 細胞に DN-Cdh1 を発現させた場合もストレスファイバーに与える影響は HeLa 細胞と同様であった（図 12 F）。これらの結果は異なる種類の細胞においても Cdh1 が細胞骨格を調節する役割をもつことを示している。

接着斑の形成は通常、アクチンの再構築とともに起こる(42)。そこでわれわれは Cdh1 を欠損した細胞で見られたストレスファイバーの減弱は接着斑の変化を伴っているかどうか検討した。接着斑の主要な構成蛋白である Paxillin の免疫染色を行ったところ、*Cdh1*^{GT/GT} マウス線維芽細胞、Cdh1 欠損 HeLa 細胞の両方で接着斑の数、大きさともに減弱していた（図 12A, c と d, 図 12C, e と f）。Cdh1 欠損細胞では無血清培地培養で Paxillin の発現がより低下していることも観察した。これらの結果から Cdh1 が接着斑とストレスファイバーの形成に関与していることが示唆された。

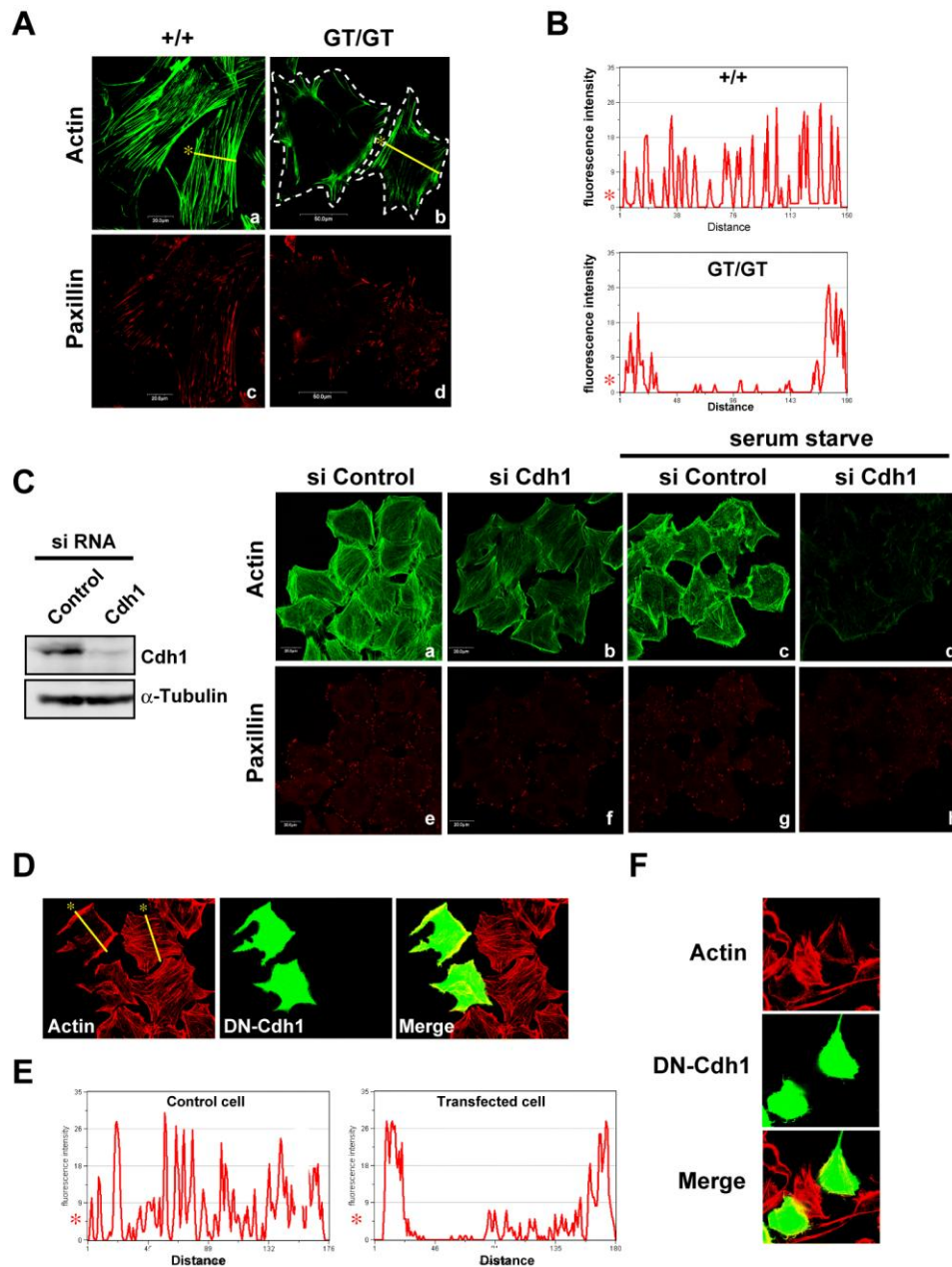


図 12 ; Cdh1 欠損が細胞骨格に与える影響の検討

(A) *Cdh1*^{+/GT} マウスの交配で得られた胎児線維芽細胞を固定し、Alexa Fluor 488-conjugated Phalloidin (上段、緑)と抗 Paxillin 抗体(下段、赤)で染色した。点線で囲まれた部分は *Cdh1*^{GT/GT} マウス線維芽細胞の細胞体を示す。パネル内白線は 20 μ m, 50 μ m に相当する。(B) 図 A の黄色線を横切る蛍光強度を MetaXpress software (Molecular Devices 社)を用いて定量化した。アスタリスクはアクチン線維を定量化した図 A での細胞とそれに一致するグラフを示す。(C) HeLa 細胞にコントロール siRNA オリゴもしくは *Cdh1* に対する siRNA オリゴを形質導入し、2 日間培養した。*Cdh1* の発現レベルはウエスタンブロットで評価した(図 3C 左)。上記のように形質導入した HeLa 細胞を 10%血清入り培地(図 3C a, b, e, f)もしくは無血清培地(図 3C c, d, g, h)で

24 時間培養し、固定後、Alexa Fluor 488 phalloidin(上段)と抗 Paxillin 抗体(下段)で染色した。パネル内白線は 20 μm に相当する。(D)基質結合領域 (WD-40 repeat)を欠き、ドミナントネガティブとして作用する GFP 標識 Cdh1 N 末端断片 (DN-Cdh1, 1-125 残基)を HeLa 細胞に形質導入した。細胞は rhodamine-phalloidin で染色した。(E) D の黄色線を横切るアクチン線維の蛍光強度を(B)と同様に定量化した。(F)NIH3T3 細胞を(D)と同様に処理して解析した。

7-4 Cdh1 は RhoGTPase の活性を調節している

RhoGTPase は細胞骨格の重要な調節因子である。*Cdh1*^{GT/GT} マウス線維芽細胞でのストレスファイバー減弱の仕組みを明らかにするために、これらの細胞で Rho ファミリー GTPase の発現量を調べた。マウス線維芽細胞において同定できなかった *Cdc42* を除いて、調べた RhoGTPase の発現量に大きな違いは認めなかった (図 13A)。そこで我々はアクチン-ミオシンストレスファイバーと接着斑の形成に中心的な役割を果たしている Rho に着目した(38)。RhoGDI は不活性型の Rho と結合することでその活性を調節していることが知られている(33)。しかし、*Cdh1*^{GT/GT} マウス線維芽細胞での RhoGDI 発現レベルに変化はなく (図 13A)、Cdh1 が RhoGDI に結合した不活性型の Rho を増加させることで Rho 活性を調節している可能性は否定された(図 13A)。次に我々は RhoA 結合ドメインである Rhotekin を含んだ GST 融合蛋白を用いた親和性沈降反応で Rho の活性を調べた(36) (37)。siRNA を形質導入した 293T 細胞を回収前に 10 分間 LPA で処理し、回収後に活性型の RhoA のレベルを測定した。図 13B にあるように *Cdh1* siRNA 導入細胞はコントロール細胞と比較して活性型 Rho が著明に減少していた。Rho 活性を定量化すると、*Cdh1* を欠損した細胞ではコントロール細胞の約 49%まで Rho の活性が低下していた(図 13C)。*Cdh1* GT MEFs を用いた実験でも同様の結果であった。図 1 のデータも含め、これらの結果は Rho の調節というこれまで明らかにされていない *Cdh1* の機能を示すものである。

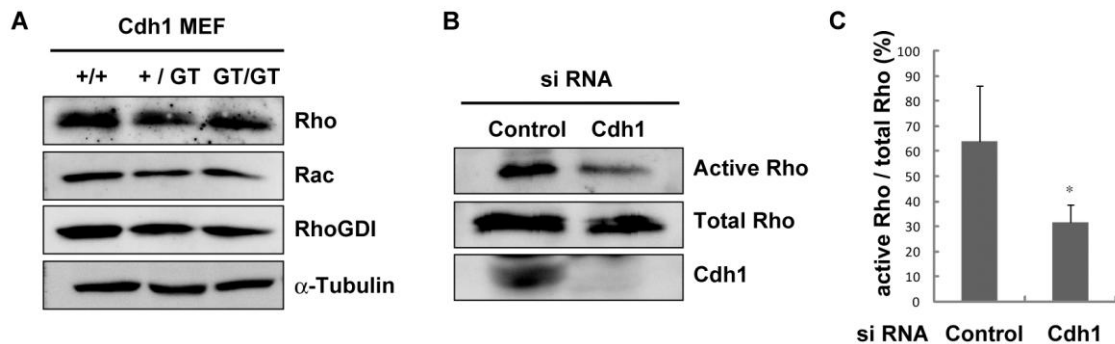


図 13 ; Cdh1 欠損による Rho 活性の低下

(A) 等量に調整した野生型、*Cdh1*^{GT/GT} マウス線維芽細胞の細胞溶解液を電気泳動後ニトロセルロース膜に転写し、抗 Rho 抗体、抗 Rac 抗体、抗 RhoGDI 抗体を用いたウエスタンブロット法にて解析した。(B) 293T 細胞に Cdh1 およびコントロールに対する siRNA を形質導入し、2 日間培養後に溶解した。活性型 Rho を沈降させるために細胞溶解液を GST-Rhotekin RBD と混和し反応させた。細胞溶解液中の総 Rho、活性型 Rho の量は抗 Rho 抗体を用いたウエスタンブロットにて決定した。独立した 3 回の実験結果から代表的なものを示した。(C) B の結果を densitometry を用いて定量化した。活性型 Rho を総 Rho の値で補正し、3 回の結果から標準偏差を計算した (* $P < 0.05$, Student's test)

7-5 Cdh1 は p190 RhoGAP 量を調節している

p190 RhoGAP (p190)は様々な組織に広く分布しており、生体内では Rho 特異的に働いている。さらに線維芽細胞を用いた研究によると総 RhoGAP 活性調節の約 60%を担っている(52)。*Cdh1*^{GT/GT} マウス線維芽細胞ではストレスファイバーの著明な減少が観察され、これは Rho 抑制の表現形と矛盾しない(図 12A)。そこでわれわれは APC^{Cdh1} が p190 を基質として直接分解しているのではないかという仮説を立てた。この可能性を確かめるために、ウエスタンブロットで *Cdh1*^{GT/GT} マウス線維芽細胞と野生型線維芽細胞での p190 発現量を比較検討した。既知の APC^{Cdh1} の基質である Skp2(6,56)と同様に p190 は *Cdh1*^{GT/GT} マウス線維芽細胞で有意に増加していた(野生型線維芽細胞と比較して 1.94 倍、図 5A)。p190 の発現量の変化は転写レベルでの調節ではないことを確認するために、定量的 real-time PCR を行った(図 14B)。p190 の発現量に対して Cdh1 が負の調節を行っていることをさらに確かめるために、HeLa 細胞に Cdh1 の siRNA、またはドミナントネガティブ変異型 Cdh1 発現ベクター(54)を形質導入することで Cdh1 の機能を阻害し、p190 発現量に対する影響を調べた。その結果、Cdh1 機能の抑制は p190 蛋白の増加を引き起こした(図 14C、14D)。

単に野生型 Cdh1 を過剰発現させただけでは p190 の発現量や細胞形態に影響を及ぼさず (図 14D)、外因性に導入された Cdh1 は APC/C を活性化しないことが示唆された。この問題に対処するために APC/C^{Cdh1} の抑制因子である Emi1 (12,27) を内因性 APC/C^{Cdh1} が活性を持っている間期の HeLa 細胞で欠損させた。Emi1 に対する siRNA オリゴを形質導入した HeLa 細胞を解析し、これらの細胞では p190 の発現が著明に減少していることを見出した (図 14E、1 段目)。APC/C^{Cdh1} の既知の標的である cyclin B1 もまた Emi1 欠損によって減少していた (図 14E、2 段目の矢印)。さらに、Emi1 を欠いた HeLa 細胞で減少した p190 の発現量はプロテアソーム阻害剤処理によりもとの量に回復させることが可能であった (図 14E)。これらの結果は APC/C^{Cdh1} がユビキチン-プロテアソーム系を通して p190 の蛋白量を調節していることを示唆する。p190 の発現量は細胞周期依存的に変動することが報告されている、すなわち間期から分裂期中期にかけて増加し、分裂期の後期に入ると減少する(45)。よって、細胞周期中に、特に分裂期の終わりに Cdh1 機能を失うことは p190 の発現量に影響する可能性がある。この可能性を除外するために *Cdh1*^{GT/GT} マウス線維芽細胞と Cdh1 欠損 HeLa 細胞の細胞周期の状態をフローサイトメトリーを用いて解析した。以前の報告(15)と同様に Cdh1 を欠いた細胞群では G2/M 期の集団が若干増加しており、このことは分裂期の進行が緩徐であることを意味する。分裂期が短ければ 2 次的な p190 の蓄積を来し得るので、Cdh1 欠損細胞で分裂期が長ければむしろ p190 は減少するはずである。よって、細胞周期中の Cdh1 の働きは p190 量の調節には影響しないと思われる。

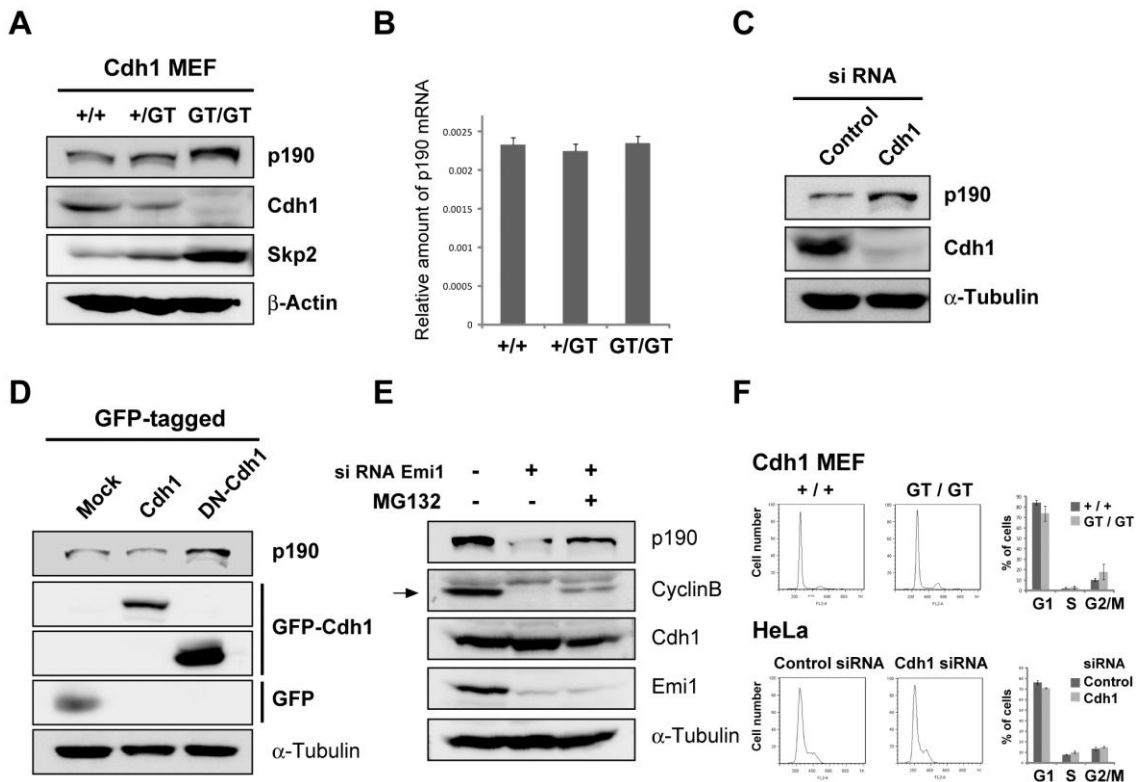


図 14 ; Cdh1 による p190 量の調節

(A) 示された遺伝子型の線維芽細胞を回収、溶解し、内因性 p190、Cdh1、Skp2 の発現をウエスタンブロット法にて解析した。 β -actin は対照として用いた。それぞれの実験は 3 回行い代表的な結果を示した。(B) p190 の蛋白量は翻訳後修飾を受けている。それぞれの遺伝子型の線維芽細胞から総 RNA を抽出し、p190 mRNA の定量的 RT-PCR の解析に用いた。結果は GAPDH の mRNA レベルで補正し、3 回の独立した実験結果から標準偏差を算出した。(C) Cdh1 欠損 HeLa 細胞における p190 の蓄積。HeLa 細胞にコントロールもしくは Cdh1 に対する siRNA オリゴを形質導入した。48 時間培養後に細胞を回収し、p190、Cdh1、 α -tubulin の発現量をウエスタンブロット法にて解析した。(D) HeLa 細胞に GFP 融合全長 Cdh1、もしくは DN-Cdh1 発現ベクターを遺伝子導入した。細胞を溶解し、抗 GFP、抗 p190、抗 α -tubulin に対する抗体によるウエスタンブロット法に用いた。(E) Cdh1 活性化は p190 レベルの低下を起こした。コントロールもしくは Emi1 に対する siRNA オリゴを形質導入した HeLa 細胞を MG132 存在(3 レーン)、非存在下(1,2 レーン)に 48 時間培養した。細胞溶解液は抗 p190、抗 Cdh1、抗 α -tubulin 抗体を用いたウエスタンブロット法による解析に用いた。Cdh1 の標的である cyclinB の分解で示されるように (2 レーン、矢印) Emi1 欠損は Cdh1 の活性化を引き起こした。(F) 細胞周期のフローサイトメトリーによる解析。それぞれの遺伝子型のマウス線維芽細胞とコントロールまたは Cdh1 の siRNA オリゴを 24 時間形質導入した HeLa 細胞を propidium iodide で染色し、フローサイトメトリーに用いた。細胞周期におけるそれぞれの層の細胞の割合を示した。

7-6 APC/C^{Cdh1} による p190 のユビキチン化

Cdh1 は基質が含んでいる標的モチーフを認識して結合する(35)。Destruction (D) box と KEN box は APC/C の分解基質がもつ標的モチーフの中で最も重要なものである。p190 は全長の中に 5 つの D box と 2 つの KEN box を持っている (図 15A)。p190 が APC/C^{Cdh1} の直接的な標的になっているかどうかを確かめるために、いくつかの変異型 p190 を用いて *in vitro* 結合実験を行った。図 15B に示すように、p190 の全長も中心領域(MD)もともに *in vitro* translate された Cdh1 と免疫沈降で共沈した (2 レーン、3 レーン)。さらに KEN box だけをもつ変異型 p190 (MD-N) と D box だけをもつ変異型 p190 (MD-C) がともに Cdh1 と結合し (4 レーン、5 レーン)、両方が Cdh1 との会合に関与していることが示唆された。次に *in vivo* における Cdh1 と p190 の会合を検討した。GFP 融合全長 Cdh1 を発現した細胞の溶解液を抗 p190 抗体で免疫沈降すると、外因性 Cdh1 は共沈した (図 15C)。さらにこれらの蛋白質間の生理的会合を確かめるために、我々はマウス Cdh1 N 末端ペプチドをマウスに免疫することで抗 Cdh1 特異的抗体を作製した。このポリクローナル抗体を用いて、内因性 p190 が内因性 Cdh1 と共沈することを確認した (図 15D)。

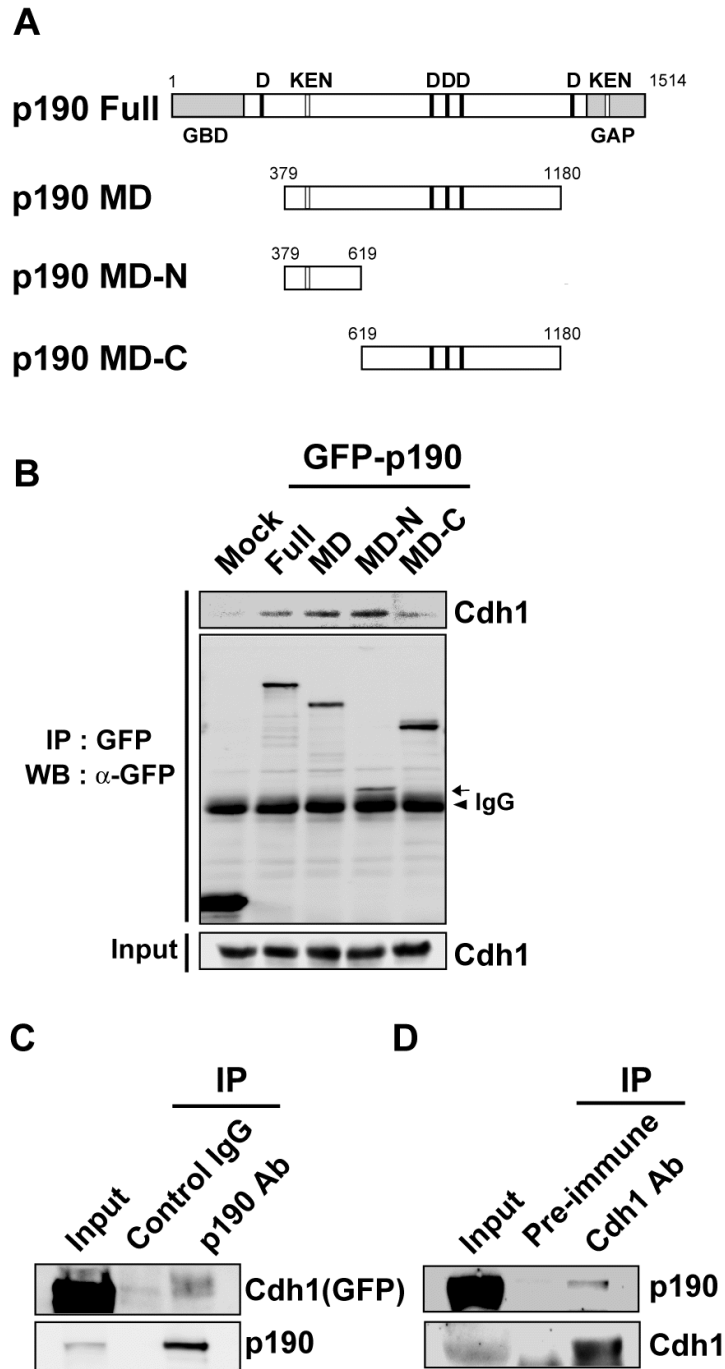


図 15 ; p190 の中心領域が Cdh1 と結合する

(A)p190 とそれより得られた変異型 p190 の模式図。MD; 中心領域、GBD; GTP 結合領域、GAP; GTP 活性化領域。(B) *in vitro* 結合実験。293T 細胞に発現させたそれぞれの GFP-p190 蛋白を免疫精製し、Protein A ビーズ (Dynal 社) に吸着させ、*in vitro* translate した Cdh1 と反応させた。反応後の免疫複合体は結合したビオチン化 Cdh1 を検出するためのアビジン・HRP を用いて解析した。矢印は MD-N 変異型 p190 を示し、矢頭は IgG を示している。(C) GFP 標識した全長 Cdh1 を形質導入した 293T 細胞の溶解液をコントロールのウサギ IgG (2 レーン) もしくは抗 p190 抗体 (3 レーン) で免疫沈降した。免疫沈降物を SDS-PAGE で分離し、抗 GFP 抗体

(上段) もしくは抗 p190 抗体 (下段) でウエスタンブロットにより解析した。(D) p190 と Cdh1 の *in vitro* での共沈。293T 細胞の溶解液を免疫前ウサギ血清 (2 レーン) または Cdh1 免疫後ウサギ血清 (3 レーン) で免疫沈降した。免疫沈降物を SDS-PAGE で分離し、抗 p190 抗体 (上段) または抗 Cdh1 抗体 (下段) でウエスタンブロットにより解析した。

次に、p190 の蛋白量はユビキチン-プロテアソーム系で調節されているかどうかを検討した。GFP-p190 と HA 標識ユビキチンを 293T 細胞に共発現させると、p190 はプロテアソーム阻害剤の存在下で有意にユビキチン化され (図 16A)、*in vivo* で p190 がユビキチン化されるという報告と矛盾しない結果であった(45)。しかし、Cdh1 に対する siRNA を形質導入した 293T 細胞ではコントロール細胞に比べて約 60%程度まで内因性 p190 のユビキチン化が減少した (図 16B,C)。さらに、不死化させた *Cdh1*^{IGT/GT} マウス線維芽細胞で減弱した p190 のユビキチン化は野生型 Cdh1 を加えることで用量依存的に回復した (図 16D)。次に我々は APC/C^{Cdh1} 複合体が p190 を直接ユビキチン化しているかどうか *in vitro* ユビキチン化実験で検討した。HeLa 細胞から免疫精製した APC/C を Sf9 細胞より精製したりコンビナント His 標識全長 Cdh1 蛋白と反応させた。引き続き Cdh1 と結合した APC/C を反応液より取り出し、E1、E2 酵素を含んだ反応液中(22)で *in vitro* トランスレートされた p190 をユビキチン化する能力を調べた。図 16E に示す通り、APC/C は *in vitro* で Cdh1 の存在下で効果的に p190 をユビキチン化した。

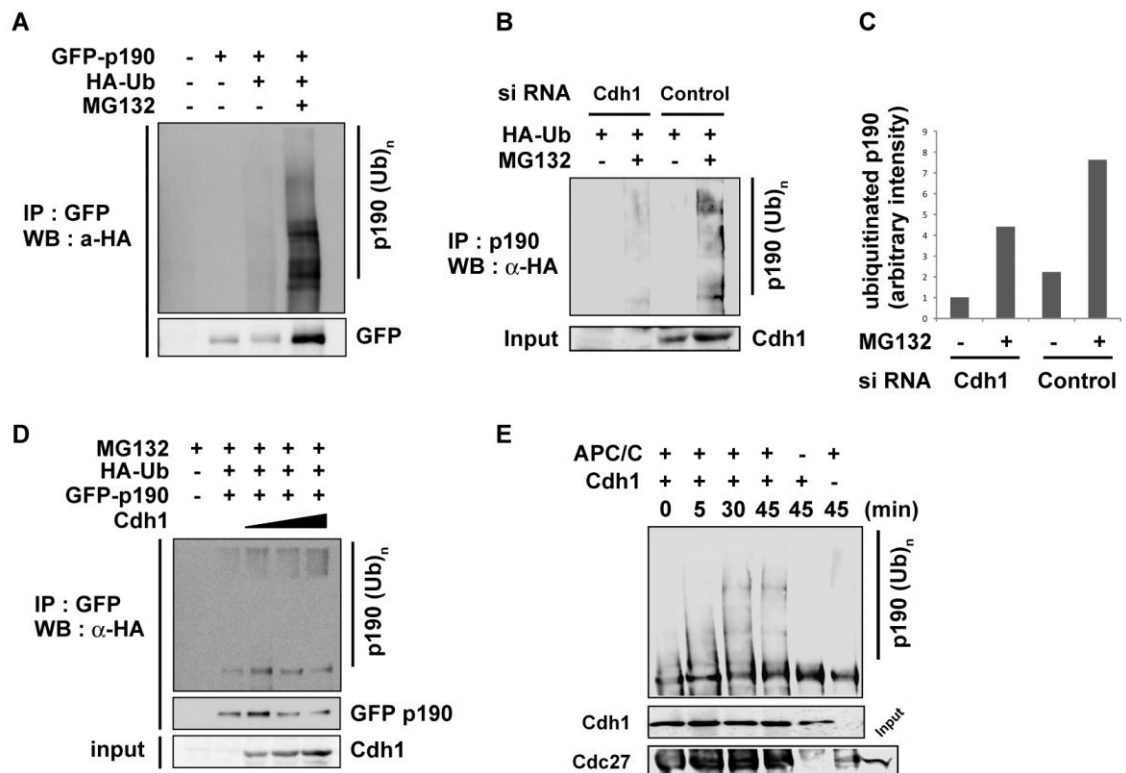


図 16 ; APC/C^{Cdh1} による p190 のユビキチン化

(A) *in vivo* における p190 のユビキチン化。GFP 融合全長 p190 蛋白発現プラスミドまたはコントロールベクターを HA-ユビキチン発現プラスミドとともに 293T 細胞に形質導入し、MG132 処理した。細胞溶解液を抗 GFP 抗体で免疫沈降し、抗 HA 抗体と抗 GFP 抗体によるウエスタンブロットで解析した。(B) コントロールもしくは Cdh1 siRNA オリゴを 48 時間形質導入した 293T 細胞で(A)と同様に *in vivo* ユビキチン化実験を行った。(C) (B)におけるユビキチン化された p190 を densitometry で定量化した。Cdh1 siRNA を形質導入し MG132 処理せずに得られた値を 1 に調整した。(D) 不死化した *Cdh1*^{GT/GT} マウス線維芽細胞に GFP 標識全長 p190、HA 標識ユビキチン、全長 Cdh1 発現ベクターを形質導入した。p190 の *in vivo* ユビキチン化反応は(A), (B)と同様に評価した。(E) *in vitro* ユビキチン化反応。HeLa 細胞から免疫沈降した APC/C をリコンビナント Cdh1 蛋白と結合させ、実験方法に示したように *in vitro* ユビキチン化反応に用いた。*In vitro* translate した全長の p190 を基質として用いた。図に示した時間でユビキチン化反応を停止させた。ユビキチン化した p190 は抗 p190 抗体を用いたウエスタンブロットで検出した (上段)。APC/C との結合に用いたリコンビナント His-Cdh1 蛋白は抗 His 抗体で検出した (中段)。各反応における APC/C 複合体は抗 cdc27 抗体でのウエスタンブロットにより確認した (下段)。Input レーンは免疫沈降に使用した HeLa 細胞溶解液の 0.5%に相当する。

7-7 Cdh1 による p190 を介した細胞運動の調節

Rho 活性の調節は細胞運動において重要な役割を果たしている(13)、Cdh1 欠損が細胞運動に影響を及ぼすかどうか検討した。Boyden chamber を用いた細胞走化性試験で Cdh1 欠損 HeLa 細胞の運動能を評価した。Cdh1 siRNA を形質導入した HeLa 細胞を無血清培地中で Boyden chamber 内の膜上に播き、24 時間移動させた。刺激していない HeLa 細胞は移動能を示さなかったが (図 17C、1 本目の棒)、血清培地で刺激した HeLa 細胞は無刺激細胞 (図 17A 左端、図 17C、2 本目の棒) と比較して移動能が増加していた。興味深いことに、Cdh1 を欠損した細胞は血清刺激した状態でも低い移動能しか示さなかった (図 17A 中央、図 17C、3 本目の棒)。細胞運動において Cdh1 とその基質と思われる p190 が同一の経路で働いていることを確かめる目的で、細胞走化性試験において Cdh1 と p190 両方を欠損させた細胞で解析を行った。Cdh1 欠損により増加した p190 の発現がコントロールレベルまで低下するように p190 抑制の条件を調整した (図 17B)。このようにして Cdh1 と p190 の両方を siRNA 形質導入することにより、Cdh1 欠損で低下した HeLa 細胞の運動能をコントロールの 110%まで回復することができた (図 17A 右端、図 17C、4 番目の棒)。

細胞運動において p190 を介した Rho の調節は非常に重要であるが、Cdh1 はどのように p190 活性に影響しているのだろうか？p190 の活性はリン酸化によって調節されていることが知られている(5, 30)。そこで我々は p190 の発現量の調節も p190 の RhoGAP としての活性調節において重要な要素なのではないかという仮説をたてた。この仮説を確かめるために p190 ノックダウン細胞のアクチン線維を異なる時間点で解析した。図 17D、E に示すように p190 ノックダウン HeLa 細胞のストレスファイバー形成の強さは p190 量とは逆相関の関係を示した。さらに、マウス線維芽細胞もしくは NIH3T3 細胞に p190 を外因性に過剰発現させたところ、これらの細胞ではストレスファイバーが減弱し、ドミナントネガティブ Cdh1 を発現させた細胞 (図 12D、図 12F) と同じように、周囲の形質導入されなかった細胞と比較して細胞辺縁のアクチンが増強していた (図 17F 上段、図 17G)。これらの結果は p190 量もまた、p190 の RhoGAP 活性に重要な役割を果たしていることを示している。我々は *Cdh1*^{GT/GT} マウス線維芽細胞でアクチンが減弱した表現形が野生型 Cdh1 を発現させることで元に戻ることも確認した (図 17F 下段)。これらの結果は APC/C^{Cdh1} と p190 が同一の経路で働いていることを意味し、RhoGTPase の調節においては p190 が APC/C^{Cdh1} の下流に位置することを示している。

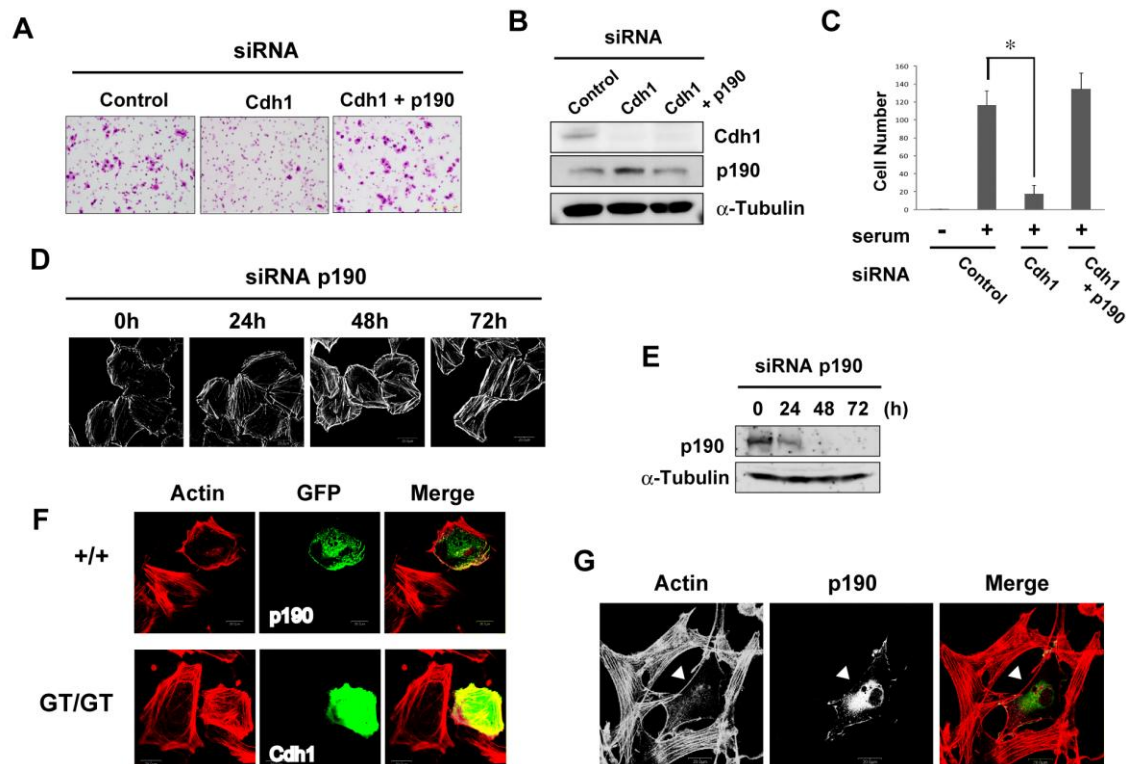


図 17; Cdh1 による p190 を介した細胞運動の調節

(A)48時間 siRNA を形質導入した HeLa 細胞を無血清培地中で Boyden chamber の膜上に播き、無刺激下、または 10%FBS 刺激下に 24 時間移動させた。その後、膜を固定し 50%ギムザ染色液/PBS で染色した。結果は表示された siRNA オリゴを形質導入した後、移動した細胞の代表的写真を示す。(B) Boyden chamber 実験に用いた細胞中の Cdh1、p190 の蛋白量を抗 Cdh1 抗体、抗 p190 抗体によるウエスタンブロット法で解析した。α-tubulin は対照として示す。(C) 24 時間培養後に移動した細胞の数を移動能として評価した。HeLa 細胞を用いた 3 回の独立した実験結果から標準偏差を算出した (* $P < 0.05$, Student's two-tailed t test)。(D) HeLa 細胞に p190 に対する siRNA を形質導入し、10%FBS を含む培地で 0~48 時間培養した。48 時間後、培地を無血清 DMEM/F12 培地に置換した。図に示した時間で細胞を固定し、Alexa Fluor 488 phalloidin で染色した。(E) (D)と同様に HeLa 細胞に形質導入し、培養した。細胞を回収し、ウエスタンブロットで p190 と α-Tubulin の発現量を調べた。(F) 初代野生型マウス線維芽細胞 (上段) と *Cdh1*^{GT/GT} マウス線維芽細胞 (下段) に GFP-p190 と GFP-野生型 Cdh1 をそれぞれ 24 時間形質導入した。細胞を固定し、rhodamine-phalloidin で染色した。(G) NIH3T3 細胞に GFP-p190 を 24 時間形質導入した。細胞を固定し、Alexa Fluor 488 phalloidin で染色した。矢頭は p190 が形質導入された細胞を示す。

・7-8 *Cdh1*^{GT/GT} マウス胎児にみられた発生異常

通常のマウスの発生においては胎生 15.5 日目～16.5 日目に眼瞼辺縁の上皮が進展することにより眼瞼の閉鎖が起こる(14)。出生時に眼が開いていることと、臍ヘルニアは *ROCK1* (*ROKβ*とも言われる) ノックアウトマウスの特徴的な表現形である(44)。*Cdh1* GT マウスは胎盤の異常により胎生 13.5 日齢で致死であった(表 1)。しかし、4 倍体キメラ法により *Cdh1*^{GT/GT} マウスはレスキューされたため、レスキューされた *Cdh1*^{GT/GT} 胎児 (E18.5) の解析を行った。コントロールとしては 4 倍体キメラ法で *Cdh1*^{GT/GT}ES 細胞株と同時に樹立した野生型 ES 細胞株を用いた(実験方法参照)。4 倍体キメラ法そのものが閉眼の時期に影響を及ぼし、調べた野生型胎児すべて (n=4) が胎生 15.5 日目でも開眼していたが、胎生 18.5 日目までには胎児 (n=9) の 22.2%に減少した(図 12C-F)。一方で、*Cdh1*^{GT/GT} 胎児 (n=10) の 83.3%が胎生 18.5 日でも開眼しており(図 12C-F)、閉眼における *Cdh1* の重要な役割が示唆された。反対に、*Cdh1*^{GT/GT} 胎児において臍ヘルニアの割合の増加はみられなかった(データなし)。閉眼の過程には MAP キナーゼ経路など他の経路も含んだ複雑な機構で制御されている(44)。この中で *Cdh1* が Rho/ROCK 経路を介して閉眼を制御している可能性を検討するために、眼瞼上皮中の p190 量を調べた。組織免疫染色で野生型胎児の眼瞼上皮と比較して *Cdh1*^{GT/GT} 胎児の眼瞼上皮では p190 がより強く染色された(図 12G)。さらに、*Cdh1*^{GT/GT} 胎児では本来 p190 の mRNA が特異的に強く発現している脳と脊髄(10)において p190 が集積していた(図 12H)。これらの結果は *Cdh1* が生体において p190 を介した Rho/ROCK 経路の重要な調節因子であることを示唆している。

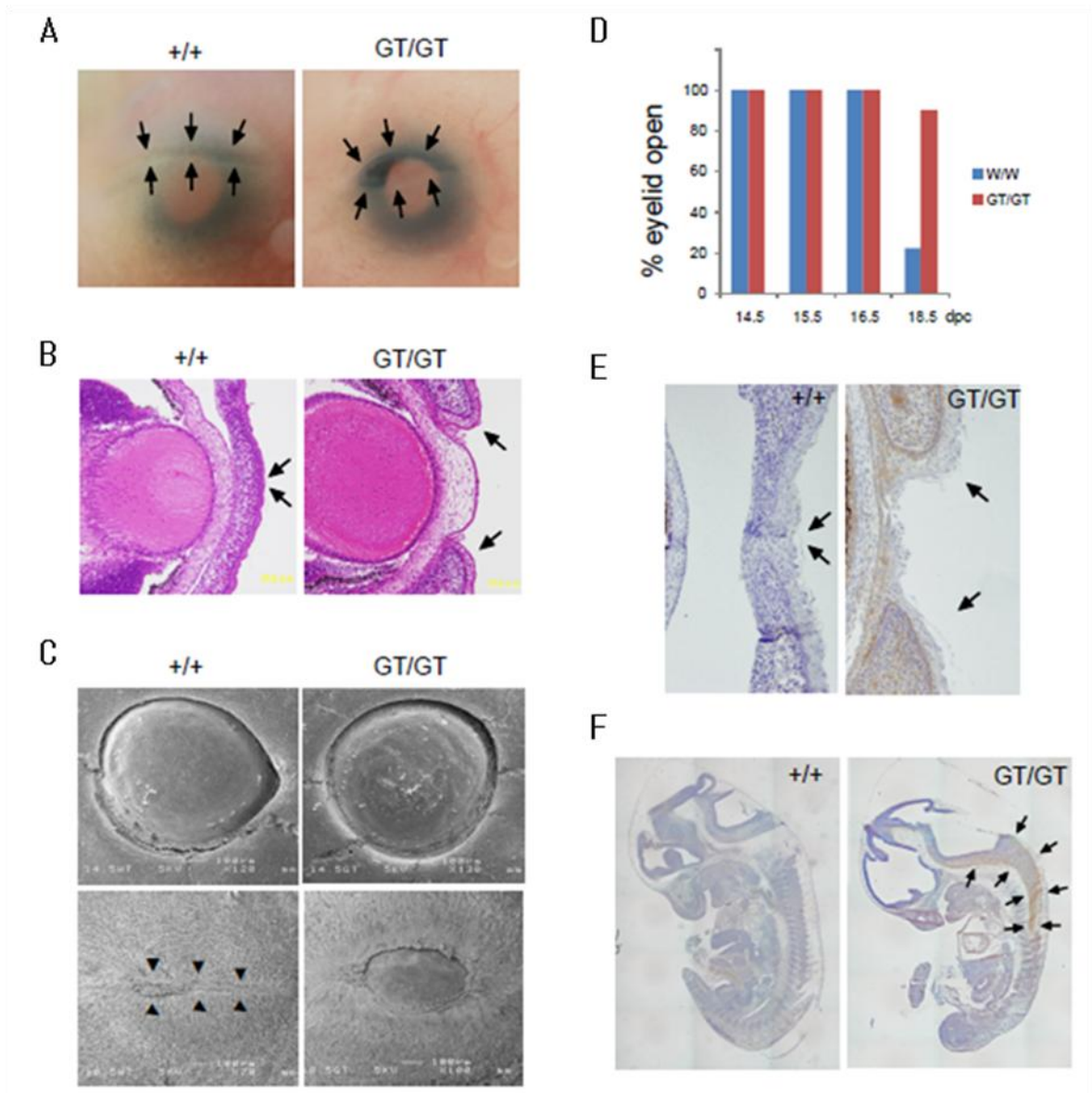


図 18 ; *Cdh1*^{GT/GT} マウス胎児にみられた発生異常

(A) 4倍体キメラ法で得られた 18.5 日目の野生型と *Cdh1*^{GT/GT} の胎児眼。矢印は眼瞼の辺縁を示す。(B) (A)と同様 18.5 日目胎児眼の水平断切片のヘマトキシリン-エオジン染色。矢印は眼瞼の辺縁を示す。(C) 示された日数の野生型、*Cdh1*^{GT/GT} レスキュー胎児の走査型電子顕微鏡写真。矢頭は野生型胎児の眼瞼融合を示す。(D) 表示された日数に開眼していた胎児の割合。解析した胎児の数は以下の通りである。14.5 日目; *Cdh1*^{+/+} = 2、*Cdh1*^{GT/GT} = 2、15.5 日目; *Cdh1*^{+/+} = 8、*Cdh1*^{GT/GT} = 5、16.5 日目; *Cdh1*^{+/+} = 8、*Cdh1*^{GT/GT} = 3、18 日目; *Cdh1*^{+/+} = 9、*Cdh1*^{GT/GT} = 10 (E) 18.5 日目の野生型と *Cdh1*^{GT/GT} レスキューマウス胎児眼の水平断の p190 免疫組織染色。矢印は眼瞼の辺縁を示す。(F) 18.5 日目のレスキューマウス胎児矢状断片の p190 免疫組織染色。矢印は *Cdh1*^{GT/GT} 胎児中枢神経系の p190 の染まりを示す。

8 考察

8-1 様々な経路による Rho の調節

Rho は ROCK、mDia 等の下流の調節因子を活性化することでストレスファイバーと接着斑の形成を促進する(32)。ROCK は筋細胞以外でミオシンホスファターゼと LIM キナーゼをリン酸化することでストレスファイバー形成を誘導する(2)。ROCK 抑制によりミオシン軽鎖のリン酸化とそれに引き続いて起こる細胞中心部でのストレスファイバー形成が阻害されるが、細胞辺縁では保たれることが報告されている(50)。Cdh1 欠損細胞では細胞体でストレスファイバーの形成が著明に減少したが、細胞辺縁では保たれており(図 12B、E)、これらの細胞において ROCK が抑制されていることを示唆している。mDia も adenomatous polyposis coli と c-Src の動員を介したアクチン線維の形成と接着斑の代謝を調節している(58)。接着斑は細胞外マトリックス受容体であるインテグリンやその他多くのシグナル伝達構成要素が関与している特殊な接着構造体である(11)。アクチン線維が接着斑凝集に果たす役割の重要性はアクチン-ミオシン相互作用の阻害が接着斑の分解を引き起こす実験で示されている(42)。本研究で Cdh1 欠損が活性型 Rho レベルの低下とともにストレスファイバーの形成と接着斑凝集の両方を減弱させ、これらの報告と矛盾しない結果であった(図 12、13)。この Rho を介した反応は成長因子のシグナル伝達の下流に位置する(38,42)。Cdh1 siRNA を形質導入した細胞を血清飢餓状態にさせるとストレスファイバーと接着斑の減弱はさらに増強された。このことは Cdh1-p190 経路を含めてさまざまなシグナル経路が Rho の調節に関わっていることを意味する。Rho を介した細胞骨格の形成は多様なレベルで制御されている。cAMP の上昇と引き続き起こるプロテインキナーゼ A(PKA)の活性化はミオシン軽鎖キナーゼのリン酸化を起し、ストレスファイバーと接着斑の減弱を来す(42)。PKA はまた、APC/C をリン酸化し Cdh1 存在下ですらそのユビキチン化活性を抑制することが報告されている(21)。よって cAMP/PKA は APC/C^{Cdh1}/p190/Rho 経路を通して細胞骨格を制御していると予測することもできる。

8-2 Cdh1 による p190 の量的な調節

Rho ファミリーGTPase 活性化蛋白である p190 RhoGAP は培養細胞において Rho 活性を抑制する十分な働きを持つことが報告されている(52)。RhoGAP は蛋白-蛋白相互反応、リン脂質修飾、リン酸化、細胞内局在、蛋白分解など多様な機構で制御されている(7,30)。Src による p190 のリン酸化はその RhoGAP 活性を増加させ、一方で ROCK による p190

のリン酸化は p190 の Rnd との結合を阻害することで不活性化させる(5, 30)。このリン酸化に加えて、本研究の結果は p190 の蛋白量の調節が p190 活性のもう一つの調節機構であることを示唆するものである。

p190 の発現量は細胞周期を通して一定ではない(45)。p190 の発現量は分裂期後期に低下し、この低下はユビキチンに仲介される蛋白分解によって起こる(45)。APC^{Cdh1} はその活性を持つ時期が p190 分解の時期と一致することから、p190 分解を担う E3 ユビキチンリガーゼの有力な候補である。しかし、これまでに p190 分解を行う E3 ユビキチンリガーゼは明らかになっていない。本研究の中で我々は Cdh1 が p190 と物理的な複合体を形成し、また、Cdh1 が p190 のユビキチン化と分解を促進することを *in vitro* と *in vivo* の両方で示した (図 16)。Su らは分裂期後期に見られる内因性 p190 の分解は細胞質分裂の完成と連動していることを示した。細胞質分裂はアクチンとミオシン収縮輪によって駆動される。Rho の恒常的活性化と恒常的抑制はどちらも細胞質分裂を阻害することから、この過程において複雑な Rho の調節が必要であることが示唆される(13)。乳癌細胞株で p190 を恒常的に過剰発現させると、細胞の多核化を引き起こした。これは細胞質分裂の異常でしばしば見られる現象であり、Cdh1 欠損線維芽細胞の表現形と類似している(15,45)。これらの結果から Cdh1 は p190 を介して細胞運動だけでなく、細胞質分裂も制御していると思われる。

8-3 Cdh1 による p190 のユビキチン化と分解

p190 は 5 つの D box と 2 つの KEN box を持っており (図 15A)、これらは APC^{Cdh1} によって認識される分解のモチーフとなる配列である(35)。変異型 p190 (図 15A) を用いた我々の実験結果は MD 領域内の KEN box と D box が Cdh1 との会合に直接関連していることを示した。Cdh1 は p190 のユビキチン化とそれに引き続く分解を効果的に促進した(図 16)。しかしながら、Cdh1 ノックダウンは p190 のユビキチン化を完全には抑制せず (図 16B、C)、Skp1-cullin-F-box 複合体の様な他の E3 リガーゼもこの過程に関与している可能性があることを示唆している。つまり、APC^{Cdh1} は p190 分解に関わる主要な E3 リガーゼだが唯一のものではないと考えられる。p190 量調節の詳細な機構の解明にはさらなる解析が必要である。

8-4 *Cdh1*^{GT/GT} マウスと *ROCK* ノックアウトマウスの類似性

すべての Rho アイソフォーム(A, B, C)は線維芽細胞に過剰発現させるとストレスファイバーの形成を誘導する(18)。*RhoB* ノックアウトマウスと *RhoC* ノックアウトマウスは生存し、目立った発生上の異常は示さない(17) (26)。*RhoA* ノックアウトマウスが存在しないことから Rho A の哺乳類における重要性は不明である(18)。*RhoA* ノックアウトマウスと比較できない以上、Rho との関係という観点から *Cdh1* の発生上の役割を理解することは現在のところ困難である。数ある Rho の下流分子の中で、*ROCK* は最初に同定され、Rho シグナルの重要な部分を伝達していると考えられる(2, 39)。そこで、*Cdh1*^{GT/GT} マウスと *ROCK* ノックアウトマウスを比較することは *Cdh1* の生理的役割を明らかにする上で非常に有用と思われる。*ROCK* ノックアウトマウスは作製されており、発生における役割は解析されている(44) (49)。*ROCK* *f/f* マウスの多くは出生後直ぐに死亡し、ホモ接合の胎児は眼瞼と腹壁の閉鎖不全を呈した(44)。*ROCK* *II* *f/f* マウスも胎生 13.5 日目以降に死亡し、迷路層の構造異常と血栓形成という胎盤の異常を示した(49)。本研究で *Cdh1*^{GT/GT} マウス胎児に認めた発生上の異常は *ROCK* *f/f* マウスと *ROCK* *II* *f/f* マウスと多くの共通点が見られた。*ROCK* *II* 同様 *Cdh1* は胎盤の迷路層に強く発現している (図 9B)。胎盤の構造異常と高頻度の血栓形成は *Cdh1*^{GT/GT} マウス胎盤の迷路層にも認められた。*Cdh1* の欠損は妊娠中期の胎盤の異常による胎生致死を引き起こし、これは *ROCK* *II* 欠損胎児よりも早い時期に起こった(15,24)。これら胎生致死の時期の違いについて1つの可能性は *ROCK* ノックアウトマウスの胎盤に栄養芽層巨細胞(TGC)の異常を認めないことである(44) (49)。*Cdh1*^{GT/GT} マウスでは迷路層と TGC 層の両方に異常を来たしていたので *ROCK* 欠損マウスと比較するとより激しい表現形を示した可能性が考えられる。

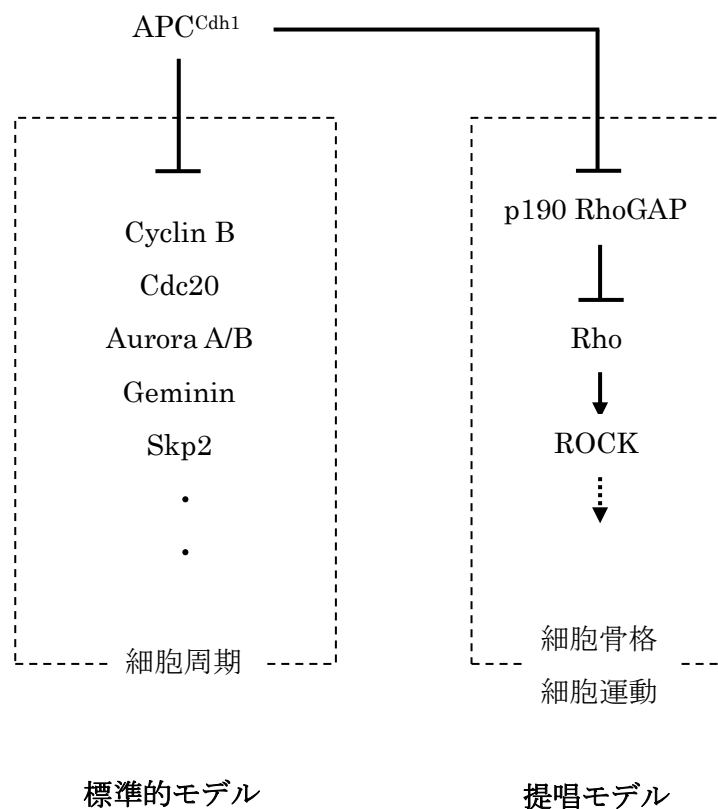
8-5 4倍体キメラ法による *Cdh1*^{GT/GT} マウスのレスキュー

我々はまた *Cdh1*^{GT/GT} 胎児の死因としての胎盤の重要性について 4倍体キメラ法を用いて確認した。この方法により *Cdh1*^{GT/GT} 胎児は出生時まで生存していたが、それにもかかわらず、正常の個体と比べると閉眼の時期が遅れていた。野生型の ES 細胞から 4倍体キメラ法で得られた胎児でも通常の妊娠で得られる胎児と比較すると閉眼の遅れが見られた(44)。しかし、*Cdh1*^{GT/GT} 胎児ではさらに遅れがあり、4倍体キメラ法という操作による影響とは考えにくい。p190 mRNA はマウス発生期において中枢神経系で発現が高い(10)。*Cdh1*^{GT/GT} 胎児では脊髄で p190 蛋白の発現が亢進していた (図 18F)。さらに p190 蛋白は *Cdh1*^{GT/GT} マウスの眼瞼上皮においても発現が亢進していた (図 18E)。このことは *Cdh1* が p190 を

介して Rho/ROCK シグナル経路を調節しているという我々の仮説をマウスの発生において支持する結果である。

9 結語

本研究の結果は Cdh1 の新たな生理的役割を明らかにするものである。Cdh1 は代表的な RhoGAP である p190 RhoGAP の分解を介して Rho の活性を制御していた。この結果から Cdh1 はこれまでに知られている細胞周期の調節だけではなく、細胞骨格、細胞運動の調節にも関わっていると考えられる。Cdh1 と Rho との機能的相互作用は生理的、病理的状況下における Cdh1 が持つ広範な役割を示唆するものである。



10 参考文献

1. **Almeida, A., J. P. Bolanos, and S. Moreno.** 2005. Cdh1/Hct1-APC Is Essential for the Survival of Postmitotic Neurons. *J. Neurosci.* **25**:8115-8121.
2. **Amano, M., Y. Fukata, and K. Kaibuchi.** 2000. Regulation and Functions of Rho-Associated Kinase. *Experimental Cell Research* **261**:44-51.
3. **Araki, K., T. Imaizumi, K. Okuyama, Y. Oike, and K. Yamamura.** 1997. Efficiency of recombination by Cre transient expression in embryonic stem cells: comparison of various promoters. *J Biochem* **122**:977-82.
4. **Araki, K., N. Takeda, A. Yoshiki, Y. Obata, N. Nakagata, T. Shiroishi, K. Moriwaki, and K. Yamamura.** 2009. Establishment of germline-competent embryonic stem cell lines from the MSM/Ms strain. *Mamm Genome* **20**:14-20.
5. **Arthur, W. T., L. A. Petch, and K. Burridge.** 2000. Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Curr Biol* **10**:719-22.
6. **Bashir, T., N. V. Dorrello, V. Amador, D. Guardavaccaro, and M. Pagano.** 2004. Control of the SCF(Skp2-Cks1) ubiquitin ligase by the APC/C(Cdh1) ubiquitin ligase. *Nature* **428**:190-3.
7. **Bernards, A., and J. Settleman.** 2004. GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol* **14**:377-85.
8. **Bernards, A., and J. Settleman.** 2005. GAPs in growth factor signalling. *Growth Factors* **23**:143-9.
9. **Brandeis, M., and T. Hunt.** 1996. The proteolysis of mitotic cyclins in mammalian cells persists from the end of mitosis until the onset of S phase. *EMBO J* **15**:5280-9.
10. **Brouns, M. R., S. F. Matheson, K. Q. Hu, I. Delalle, V. S. Caviness, J. Silver, R. T. Bronson, and J. Settleman.** 2000. The adhesion signaling molecule p190 RhoGAP is required for morphogenetic processes in neural development. *Development* **127**:4891-903.
11. **Clark, E. A., and J. S. Brugge.** 1995. Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* **268**:233-9
12. **Di Fiore, B., and J. Pines.** 2007. Emi1 is needed to couple DNA replication with mitosis but does not regulate activation of the mitotic APC/C. *J Cell Biol*

- 177:425-37.
13. **Etienne-Manneville, S., and A. Hall.** 2002. Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**:629-635.
 14. **Findlater, G. S., R. D. McDougall, and M. H. Kaufman.** 1993. Eyelid development, fusion and subsequent reopening in the mouse. *J Anat* **183 (Pt 1)**:121-9.
 15. **Garci-Higuera, I., E. Manchado, P. Dubus, M. Canamero, J. Mendez, S. Moreno, and M. Malumbres.** 2008. Genomic stability and tumour suppression by the APC/C cofactor Cdh1. *Nat Cell Biol* **10**:802-811.
 16. **Gieffers, C., B. H. Peters, E. R. Kramer, C. G. Dotti, and J. M. Peters.** 1999. Expression of the CDH1-associated form of the anaphase-promoting complex in postmitotic neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:11317-22.
 17. **Hakem, A., O. Sanchez-Sweetman, A. You-Ten, G. Duncan, A. Wakeham, R. Khokha, and T. W. Mak.** 2005. RhoC is dispensable for embryogenesis and tumor initiation but essential for metastasis. *Genes Dev* **19**:1974-9.
 18. **Heasman, S. J., and A. J. Ridley.** 2008. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**:690-701.
 19. **King, R. W., J. M. Peters, S. Tugendreich, M. Rolfe, P. Hieter, and M. W. Kirschner.** 1995. A 20S complex containing CDC27 and CDC16 catalyzes the mitosis-specific conjugation of ubiquitin to cyclin B. *Cell* **81**:279-88.
 20. **Konishi, Y., J. Stegmuller, T. Matsuda, S. Bonni, and A. Bonni.** 2004. Cdh1-APC controls axonal growth and patterning in the mammalian brain. *Science* **303**:1026-30.
 21. **Kotani, S., S. Tugendreich, M. Fujii, P. M. Jorgensen, N. Watanabe, C. Hoog, P. Hieter, and K. Todokoro.** 1998. PKA and MPF-activated polo-like kinase regulate anaphase-promoting complex activity and mitosis progression. *Mol Cell* **1**:371-80.
 22. **Kraft, C., M. Gmachl, and J. M. Peters.** 2006. Methods to measure ubiquitin-dependent proteolysis mediated by the anaphase-promoting complex. *Methods* **38**:39-51.
 23. **Kuninaka, S., M. Nomura, T. Hirota, S. Iida, T. Hara, S. Honda, N. Kunitoku, T. Sasayama, Y. Arima, T. Marumoto, K. Koja, S. Yonehara, and H. Saya.** 2005. The tumor suppressor WARTS activates the Omi/HtrA2-dependent pathway of

- cell death. *Oncogene* **24**:5287-98.
24. **Li, M., Y.-H. Shin, L. Hou, X. Huang, Z. Wei, E. Klann, and P. Zhang.** 2008. The adaptor protein of the anaphase promoting complex Cdh1 is essential in maintaining replicative lifespan and in learning and memory. *Nat Cell Biol* **10**:1083-1089.
 25. **Li, W., G. Wu, and Y. Wan.** 2007. The dual effects of Cdh1/APC in myogenesis. *FASEB J* **21**:3606-17.
 26. **Liu, A. X., N. Rane, J. P. Liu, and G. C. Prendergast.** 2001. RhoB is dispensable for mouse development, but it modifies susceptibility to tumor formation as well as cell adhesion and growth factor signaling in transformed cells. *Mol Cell Biol* **21**:6906-12.
 27. **Machida, Y. J., and A. Dutta.** 2007. The APC/C inhibitor, Emi1, is essential for prevention of rereplication. *Genes Dev* **21**:184-94.
 28. **Maeda, T., R. M. Hobbs, T. Merghoub, I. Guernah, A. Zelent, C. Cordon-Cardo, J. Teruya-Feldstein, and P. P. Pandolfi.** 2005. Role of the proto-oncogene Pokemon in cellular transformation and ARF repression. *Nature* **433**:278-85.
 29. **Mitsunaga, K., K. Araki, H. Mizusaki, K.-i. Morohashi, K. Haruna, N. Nakagata, V. Giguère, K.-i. Yamamura, and K. Abe.** 2004. Loss of PGC-specific expression of the orphan nuclear receptor ERR- β results in reduction of germ cell number in mouse embryos. *Mechanisms of Development* **121**:237-246.
 30. **Mori, K., M. Amano, M. Takefuji, K. Kato, Y. Morita, T. Nishioka, Y. Matsuura, T. Murohara, and K. Kaibuchi.** 2009. Rho-kinase contributes to sustained RhoA activation through phosphorylation of p190A RhoGAP. *J Biol Chem* **284**:5067-76.
 31. **Nagy, A.** 2003. *Manipulating the mouse embryo : a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.5
 32. **Narumiya, S., M. Tanji, and T. Ishizuki.** 2009. Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer and Metastasis Reviews* **28**:65-76.
 33. **Olofsson, B.** 1999. Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal* **11**:545-54.
 34. **Papaioannou, V. E., and R. Behringer.** 2005. *Mouse phenotypes : a handbook of mutation analysis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

N.Y.

35. **Peters, J. M.** 2006. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. *Nat Rev Cell Biol* **7**:644-56
36. **Reid, T., T. Furuyashiki, T. Ishizaki, G. Watanabe, N. Watanabe, K. Fujisawa, N. Morii, P. Madaule, and S. Narumiya.** 1996. Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhophilin in the rho-binding domain. *J Biol Chem* **271**:13556-60.
37. **Ren, X. D., W. B. Kiosses, and M. A. Schwartz.** 1999. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J* **18**:578-85.
38. **Ridley, A. J., and A. Hall.** 1992. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**:389-99.
39. **Riento, K., and A. J. Ridley.** 2003. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:446-56.
40. **Sahai, E., R. Garcia-Medina, J. Pouyssegur, and E. Vial.** 2007. Smurf1 regulates tumor cell plasticity and motility through degradation of RhoA leading to localized inhibition of contractility. *J Cell Biol* **176**:35-42.
34. **Schmidt, A., and A. Hall.** 2002. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* **16**:1587-609.
41. **Schmidt, A., and A. Hall.** 2002. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning of the switch. *Genes Dev* **16**: 1587-609
42. **Schoenwaelder, S. M., and K. Burridge.** 1999. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Current Opinion in Cell Biology* **11**:274-286.
43. **Schwab, M., A. S. Lutum, and W. Seufert.** 1997. Yeast Hct1 is a regulator of Clb2 cyclin proteolysis. *Cell* **90**:683-693.
44. **Shimizu, Y., D. Thumkeo, J. Keel, T. Ishizaki, H. Oshima, M. Oshima, Y. Noda, F. Matsumura, M. M. Taketo, and S. Narumiya.** 2005. ROCK-I regulates closure of the eyelids and ventral body wall by inducing assembly of actomyosin bundles. *J Cell Biol* **168**:941-53.
45. **Su, L., J. M. Agati, and S. J. Parsons.** 2003. p190RhoGAP is cell cycle regulated and affects cytokinesis. *J Cell Biol* **163**:571-82.
46. **Sudakin, V., D. Ganoth, A. Dahan, H. Heller, J. Hershko, F. C. Luca, J. V.**

- Ruderman, and A. Hershko.** 1995. The cyclosome, a large complex containing cyclin-selective ubiquitin ligase activity, targets cyclins for destruction at the end of mitosis. *Mol. Biol. Cell* **6**:185-197.
47. **Sudo, T., Y. Ota, S. Kotani, M. Nakao, Y. Takami, S. Takeda, and H. Saya.** 2001. Activation of Cdh1-dependent APC is required for G1 cell cycle arrest and DNA damage-induced G2 checkpoint in vertebrate cells. *EMBO J* **20**:6499-508.
48. **Taniwaki, T., K. Haruna, H. Nakamura, T. Sekimoto, Y. Oike, T. Imaizumi, F. Saito, M. Muta, Y. Soejima, A. Utho, N. Nakagata, M. Araki, K. Yamamura, and K. Araki.** 2005. Characterization of an exchangeable gene trap using pU-17 carrying a stop codon-beta geo cassette. *Dev Growth Differ* **47**:163-72
49. **Thumkeo, D., J. Keel, T. Ishizaki, M. Hirose, K. Nonomura, H. Oshima, M. Oshima, M. M. Taketo, and S. Narumiya.** 2003. Targeted disruption of the mouse rho-associated kinase 2 gene results in intrauterine growth retardation and fetal death. *Mol Cell Biol* **23**:5043-55.
50. **Totsukawa, G., Y. Yamakita, S. Yamashiro, D. J. Hartshorne, Y. Sasaki, and F. Matsumura.** 2000. Distinct Roles of Rock (Rho-Kinase) and Mlc in Spatial Regulation of Mlc phosphorylation for Assembly of Stress Fibers and Focal Adhesions in 3t3 Fibroblasts. *J Cell Biol* **150**:797-806
51. **Tsubouchi, A., J. Sakakura, R. Yagi, Y. Mazaki, E. Schaefer, H. Yano, and H. Sabe.** 2002. Localized suppression of RhoA activity by Tyr31/118-phosphorylated paxillin in cell adhesion and migration. *J Cell Biol* **159**:673-83
52. **Vincent, S., and J. Settleman.** 1999. Inhibition of RhoGAP activity is sufficient for the induction of Rho-mediated actin reorganization. *Eur J Cell Biol* **78**:539-48.
53. **Visintin, R., S. Prinz, and A. Amon.** 1997. CDC20 and CDH1: A family of substrate-specific activators of APC-dependent proteolysis. *Science* **278**:460-463.
54. **Wan, Y., X. Liu, and M. W. Kirschner.** 2001. The anaphase-promoting complex mediates TGF-beta signaling by targeting SnoN for destruction. *Mol Cell* **8**:1027-39.
55. **Wang, H. R., Y. Zhang, B. Ozdamar, A. A. Ogunjimi, E. Alexandrova, G. H. Thomsen, and J. L. Wrana.** 2003. Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science* **302**:1775-9.
56. **Wei, W., N. G. Ayad, Y. Wan, G. J. Zhang, M. W. Kirschner, and W. G. Kaelin, Jr.**

2004. Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature* **428**:194-8.
57. **Yagi, T., Tokunaga, Y. Furuta, S. Noda, M. Yoshida, T. Tsukada, Y. Saga, N. Kakeda, Y. Ikawa, and S. Aizawa.** 1993. A novel ES cell line, TT2, with high germline-differentiating potency. *Anal Biochem* **214**:70-6.
58. **Yamana, N., Y. Arakawa, T. Nishino, K. Kurokasa, M. Tanji, R. E. Itho, J. Mnypenny, T. Ishizaki, H. Bito, K. Nozaki, N. Hashimoto, M. Matsuda, and S. Marumiya.** 2006. The Rho-mDia1 pathway regulates cell polarity and focal adhesion turnover in migrating cells through mobilizing Apc and c-Src. *Mol Cell Biol* **26**:6844-58.