

平成21年 4月30日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790227

研究課題名(和文) 細胞癌化におけるPDLIM1とPalladinの役割

研究課題名(英文) A role for PDLIM1 and Palladin for cellular transformation

研究代表者

千賀 威(Takeshi Senga)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80419431

研究成果の概要：PDLIM1 (CLP36) が乳癌由来の MDA-MB-231 細胞の細胞骨格形成や細胞運動に関与していることを見出した。また、Palladin という蛋白が細胞骨格に局在し、PDLIM1 と結合することを見いだした。Palladin は EGF の刺激や v-Src の発現、また細胞分裂期に顕著に N 末のセリンがリン酸化されることを見出した。このリン酸化により、Palladin と actinin との結合が阻害されることを確認した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	0	1,500,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,200,000	510,000	3,710,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：PDLIM1, Palladin, 細胞骨格、りん酸化

1. 研究開始当初の背景

PDLIM1 (CLP36) と Palladin は細胞骨格に局在する蛋白である。PDLIM 蛋白は PDZ 領域と LIM 領域をもつ蛋白であり、PDLIM1 から PDLIM7 までの 7 つの遺伝子が報告されている。PDLIM3, PDLIM5 は主に筋肉に発現しているが、そのほかの PDLIM 蛋白は多くの細胞に発現しており、PDLIM1 は最も多くの組織で高発現している PDLIM 蛋白である。PDLIM1 は actinin と結合することにより、細胞骨格に局在すると考えられている。すべての PDLIM 蛋白は細胞骨格、もしくは筋肉のサルコメアに局在することが報告されているが、それらの蛋白の詳しい役割はわかっていない。我々は最も発

現の多い PDLIM1 について解析するため、まず抗体を作成し、その局在を免疫染色にて観察した。PDLIM1 は報告どおり、細胞骨格、また細胞の辺縁に局在していた。PDLIM1 の機能を詳しく解析するため、結合蛋白をイーストツーハイブリッド法を用いて探索したところ、Palladin という蛋白が結合することが判明した。Palladin の抗体を作成し、その局在を調べたところ、PDLIM1 と同様に細胞骨格に主に局在することが確認された。また Palladin は v-Src などの癌遺伝子を発現することにより、顕著にりん酸化されることが確認された。

2. 研究の目的

PDLIM1 と Palladin の生理的役割、また癌の形成における役割について解明することを目標とした。また、PDLIM1 と Palladin の結合について解析し、その蛋白複合体の役割を明らかにする。Palladin は EGF や v-Src などの癌遺伝子の発現により顕著にリン酸化されるので、そのリン酸化部位や、その役割を明らかにする。

3. 研究の方法

siRNA を用いた機能の解析

PDLIM1 の機能を解析するため、siRNA を用いて PDLIM1 の発現を抑制した。siRNA は Invitrogen より購入した Lipofectamine2000 を使用した。細胞株は KMST-1, MDA-MB231, SAOS-2 細胞などを使用した。siRNA をこれらの細胞に導入し、細胞骨格や細胞接着の形成を免疫染色で観察した。また、細胞運動をボイデンチャンバーを用いて測定した。細胞接着、伸展(attachment, spreading)を、細胞をファイブロネクチンでコートしたディッシュ上にまき、顕微鏡で観察することで検討した。

PDLIM1 と Palladin の結合の解析

PDLIM1 と Palladin の結合を解析するため、様々な PDLIM1 の deletion mutant を作成し、それらの蛋白を大腸菌内で G S T 融合蛋白として発現させ、精製した。これらの蛋白をグルタチオンビーズで精製した。細胞に Palladin を発現させ、そして細胞抽出液を作成後、精製蛋白とまぜ、免疫沈降した。その後、ウエスタンブロットにより、PDLIM1 と Palladin の結合を観察した。また、Palladin の様々な deletion mutant も作成することで、結合に必須な Palladin の領域も同定した。細胞内での PDLIM1 と Palladin の結合を観察するため、PDLIM1 の抗体で免疫沈降し、抗 Palladin 抗体でウエスタンブロットをおこなった。

PDLIM1 と Palladin の細胞内局在の解析

PDLIM1 と Palladin が細胞骨格に局在するのに必須な領域を同定するため、様々な deletion mutant を作成し、GFP タグをつけたレトロウイルスベクターにクローニングした。BOSC23 細胞に一過性に導入し、そしてウイルスを産生した後 NIH3T3 細胞に感染させ、恒常的に発現する細胞株を作成した。そして、それぞれの deletion mutant の局在を蛍光顕微鏡で観察した。

Palladin のリン酸化の解析

Palladin は v-Src の発現や分裂期において、顕著にリン酸化される。また、EGF などの成長因子によってもリン酸化される。このリン酸化部位を同定するため、HA タグをつけた Palladin を発現し、それを精製し、質量分析器でリン酸化部位を検討した。また、

Palladin の deletion mutant を作成し、リン酸化に必須な領域を同定し、そして点変異を導入することにより、リン酸化部位の同定をこころみた。

4. 研究成果

PDLIM1 機能解析

PDLIM1 の発現を siRNA を用いて抑制し、細胞骨格、そして細胞接着などについて免疫染色により解析した。SAOS-2 細胞などではまったく変化は観察されなかったが、乳癌由来の MDA-MB-231 細胞では PDLIM1 の発現を抑制することにより、細胞骨格の破壊が観察された。また、細胞運動をボイデンチャンバーを用いて観察した結果、PDLIM1 を抑制することにより、細胞運動が亢進することが観察された。さらにスクラッチアッセイによっても細胞運動が亢進することが確認された。さらに細胞の spreading や attachment による影響を検討した。細胞をファイブロネクチンでコートしたディッシュにまき、一定時間後に細胞のファイブロネクチン上への attachment, spreading を観察した。しかしながら、PDLIM1 の発現を抑制しても、これらの現象に顕著な影響は観察されなかった。

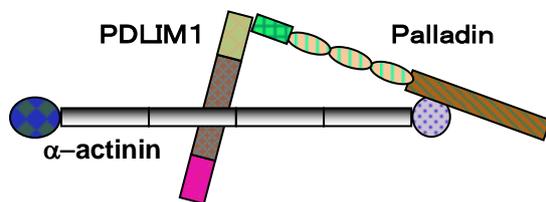
PDLIM1 と Palladin の結合の解析

PDLIM1 の様々な deletion mutant を作成し、それらを G S T 融合蛋白として大腸菌に発現させ、精製した。そして細胞内に Palladin を発現させた細胞抽出液とまぜ、グルタチオンビーズで免疫沈降し、ウエスタンブロットにより結合を観察した。そして、PDLIM1 の PDZ 領域が Palladin との結合に必須であることを明らかにした。次に Palladin のどの部位が PDZ 領域と結合するかを Palladin の様々な deletion mutant を作成することで、明らかにすることを試みた。その結果、Palladin の C 末端と PDZ 領域が結合することが判明した。

次に PDLIM1 の細胞骨格への局在に PDLIM1 のどの領域が必要か、GFP タグをつけた様々な deletion mutant を細胞に発現し、観察した。PDLIM1 は N 末の PDZ 領域と C 末の LIM 領域、そしてそのはさまれた部分にある Zasp-like-motif に分けられる。PDZ 領域、LIM 領域、そして Zasp-like-motif のみでは細胞骨格に局在できず、PDZ 領域と Zasp-like-motif の両方が必要であった。PDZ 領域は Palladin との結合に必須であり、Zasp-like-motif は actinin との結合を担っている。よって PDLIM1 の細胞骨格への局在は Palladin, actinin 両方の蛋白との結合が重要と考えられる。そこで Palladin を siRNA でその発現を抑制し、PDLIM1 の局在を観察したところ、細胞骨格への局在が阻害されていた。よって PDLIM1 の細胞骨格への局在には PDZ 領域を介した Palladin への結合と、

Zasp-like-motif を介した actinin への結合が必要と結論できる。

Palladin の細胞骨格への局在に必要な領域を同定するため、様々な deletion mutant を作成し、NIH3T3 細胞に発現させ、その局在を観察した。Palladin は N 末を介して actinin と結合することが報告されており、N 末の一部を欠損した Palladin は細胞骨格へ局在しなかった。また、PDLIM1 との結合に必要な C 末の一部を削った Palladin は細胞骨格へ局在しなかった。よって Palladin の細胞骨格への局在には N 末による actinin との結合と C 末による PDLIM1 との結合の両方が必要であると考えられる。PDLIM1 の PDZ 領域のみを細胞に強発現すると、Palladin の局在が阻害されたことより、PDLIM1 との結合は Palladin の細胞骨格への局在に重要であると結論できる。



このように actinin, PDLIM1, Palladin は細胞骨格上において、蛋白の複合体を形成していると考えられる。

以上の結果は FEBS Journal に投稿し、掲載予定となっている。

Palladin の機能解析とりん酸化の解析

Palladin は細胞骨格の形成に重要であることが報告されている。そこでまず様々な細胞で Palladin の発現を shRNA を用いて抑制し、その影響を観察した。その結果、細胞骨格の変化は観察されず、また細胞運動や接着、伸展に顕著な変化は観察されなかった。

Vero 細胞を EGF で刺激すると、細胞のラフリングが形成されることが報告されている。そこで、このような細胞骨格の変化に Palladin が関与しているか検討した。Vero 細胞に Palladin に対する siRNA を導入しその発現を抑制した後、EGF で刺激し、ラフリングの形成を観察したところ、その形成が抑制されることが判明した。また、EGF で刺激したときに Palladin のみかけの分子量の増加が観察された。これはりん酸化されるときに高頻度に観察される現象である。そこで EGF で刺激し、Palladin を免疫沈降し、そしてフォスファターゼで処理し、分子量の変化を調べた。するとみかけの分子量の増加が観察されなかったことより、これはりん酸化によるものであると推測される。さらにりん酸化抗体を用いて調べたところ、セリンがりん酸化されることが判明した。またこのりん酸化は EGF の刺激のみでなく、癌遺伝子である v-Src を発現することでも観察された。そこ

でこのりん酸化部位の同定をこころみた。大まかな部位を同定するため、N 末、または C 末を削った Palladin を発現させ、そのりん酸化を調べたところ、主に N 末がりん酸化されることが明らかとなった。

N 末には約 28 個のセリンがあり、これらのセリンをグリシンに変換し、v-Src による分子量の変化でりん酸化を観察し、りん酸化部位の同定を試みた。りん酸化されるセリンは複数あり、72 番目のセリンがりん酸化されることは明らかとなったが、それ以外にもりん酸化部位があり、その部位はいまだ特定はできていない。質量分析器を用いた解析でも同定にはいたっていない。

細胞分裂期における Palladin のりん酸化

actinin は細胞分裂のときに収縮環と呼ばれる部位に局在し、actinin を強発現することにより、細胞分裂を妨げることが報告されている。Palladin も actinin と結合し、同様な局在を示すことから、細胞分裂期における Palladin の局在をしらべた。すると、Palladin も actinin と同様に、細胞分裂時に収縮環に局在することが判明した。細胞分裂期における Palladin のりん酸化をしらべたところ、分裂期の初期では顕著にりん酸化されるが、収縮環ができ、その部位に局在する段階では、そのりん酸化が消失することが判明した。細胞分裂における Palladin のりん酸化も N 末におけるセリンであるが、その部位は EGF, v-Src におけるりん酸化より多く、同定にはいたっていない。このりん酸化部位が N 末であり、actinin との結合に重要な部位であることから、りん酸化による actinin との結合を解析した。すると、分裂期にりん酸化された Palladin は actinin との結合が観察されないことがわかった。細胞分裂の初期において Palladin はりん酸化され actinin と離れ、そして分裂が進み、収縮環が形成される段階で再び脱りん酸化され、actinin と結合することで収縮環に局在すると考えられる。

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 1 件)

1. Masao Maeda, Eri Asano, Daisuke Ito, Satoko Ito, Yoshinori Hasegawa, Michinari Hamaguchi, Takeshi Senga
Characterization of interaction between CLP36 and Palladin.
FEBS Journal, In press
査読あり

[学会発表] (計 2 件)

1. 発表者 浅野 恵理 千賀 威
発表題名 細胞分裂期におけるPalladinの
りん酸化
学会名 日本生化学会
発表年月日 平成20年12月9日
発表場所 神戸
査読なし

2. 発表者 前田 真男 千賀 威
発表題名 PLIM1 is involved in the
organization of actin stress fiber and
interacts with Palladin.
学会名 日本癌学会
発表年月日 平成19年10月3日
発表場所 横浜
査読なし

6. 研究組織
(1)研究代表者
千賀 威 (Takeshi Senga)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：80419431