

自己評価報告書

平成23年 4月 4日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究[B]

研究期間：2008～2011

課題番号：20380186

研究課題名(和文) 環境センサーと環境コントローラーとしての接着領域裏打ちタンパク質の生理機能の解析

研究課題名(英文) Functional analysis of focal adhesion proteins-sensors and regulators for microenvironment

研究代表者

木岡 紀幸 (Noriyuki Kioka)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：90234179

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：がん、細胞接着、コラーゲン、シグナル伝達

1. 研究計画の概要

動物細胞と細胞外基質間の接着、いわゆる細胞接着は、1)環境センサーと2)環境コントローラーという2つ重要な役割を持っている。細胞は細胞接着により、周囲の細胞外基質の種類を感知し、自身の運命(生存、分化、運動)を決定している。センサーの異常は疾病と深くかかわっている。たとえば、正常細胞は細胞接着しているときに増殖し、浮遊状態になるとアポトーシスを起こして死んでしまう。しかし、癌細胞ではセンサーに異常がおこり、浮遊状態でも生存、増殖することができるようになっており、これががんの転移、浸潤に結びつく。さらに、環境センサーを自由に制御できれば、がんの治療だけでなく、細胞外環境に応じて分化する細胞の分化をコントロールすることで再生医療に貢献できると考えられる。一方細胞は、細胞接着を介して自身を取り巻く細胞外基質の繊維化を調節し、自らの細胞外環境をコントロールしている。細胞接着がもつこの2つの重要な機能は、いずれも接着領域に集積する細胞質タンパク質、いわゆる接着領域裏打ちタンパク質によって仲介されている。つまり、細胞接着がもつセンサーとしての重要な機能を解明していくためには、接着領域裏打ちタンパク質の機能解析が必須である。本研究では、1)細胞増殖の足場依存性、細胞外基質の種類依存的な細胞運動制御といった環境センサーとしての接着領域裏打ちタンパク質の機能解明と、2)細胞外基質フィブロネクチンの繊維化制御という環境コントローラーとしての接着領域裏打ちタンパク質の機能解明を目指している。

2. 研究の進捗状況

増殖因子シグナルと細胞接着による細胞外環境の感知が重要な役割を持っている創傷治癒過程に、接着領域裏打ちタンパク質ピネキシンノックアウトマウスは遅延を示すことを明らかにしていた。このシステムを用い、ピネキシンの環境センサーとしての機能解明を進めた。その結果、ピネキシンは創傷によってできる新しい環境(新しい細胞-細胞外基質間接着の形成など)を感知し、上皮細胞増殖因子受容体を移動先端部に局在化させ、この受容体の活性化を亢進させることで細胞運動を促進していることが示唆された。

またがん細胞では環境センサーの異常が考えられるので、がん細胞におけるピネキシンの異常と役割について検討した。細胞をがん化させるとピネキシンの発現が減少し、この細胞にピネキシンを強制再発現させると細胞移動能が低下した。またこのがん細胞ではピネキシンのチロシンリン酸化が亢進していた。このことから環境センサーとしてのピネキシンの発現ががん細胞で抑制され、それががん細胞の異常に関与している可能性が示唆された。

Aキナーゼ(PKA)は細胞接着の有無により活性が調節されることから、環境センサーの一端を担っていると考えられる。PKAは基質特異性が低いため、細胞内での局所的な局在が生理機能の発揮に必須である。本研究では細胞骨格形成促進因子WAVE2が、PKAと直接結合し、それによってPKAを細胞膜突出部に局在化させる機能を持っていることを明らかにした。これにより環境センサーの一端を

担うPKAの新しい制御メカニズムを明らかにした。

環境コントローラーとしてのビネキシンとファミリータンパク質CAPの役割についても検討している。細胞外マトリックスフィブロネクチンの線維化が、ビネキシンとCAPの発現量に応じて制御されている可能性を示した。また、ビネキシン、CAPがフィブロネクチン線維化に関わるテンシンと相互作用することを踏まえその必須部位を特定した。現在さらに解析を進めているが、ビネキシンやCAPの遺伝子破壊細胞ではビネキシンファミリーの第3の分子ArgBP2の発現量が上昇している場合があることが判明した。現在ArgBP2の発現量も制御するシステムを構築中であり、今後それを用いて解析を進める予定である。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している
ビネキシンの環境センサーとしての役割について、創傷治癒過程における役割を解明するだけでなく、がん細胞における発現異常、リン酸化変化を明らかにするなど、計画以上に進展している。

4. 今後の研究の推進方策

細胞の運命、挙動に影響を与える細胞外環境因子として、細胞接着の有無や細胞外マトリックスの種類だけでなく、細胞外環境(細胞外マトリックス)の物理的な堅さが重要であることが明らかになってきている。この堅さの感知(メカノセンサー)にもビンキュリンやビネキシンが関与している可能性が考えられるので、今後はメカノセンサーとしての接着領域裏打ちタンパク質の機能の解明を目指す。また、環境コントローラーとしての機能解明については、内在的なビネキシンファミリータンパク質の発現が解析を複雑にしている可能性を考えている。今後は内在的に発現しているビネキシンファミリータンパク質の発現をすべて抑制した細胞でさらに解析を行うことで、環境コントローラーとしてのさらなる機能解明を目指す。

5. 代表的な研究成果

(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 Yamashita, H., K. Ueda, and N. Kioka. WAVE2 Forms a Complex with PKA and Is Involved in PKA Enhancement of Membrane Protrusions. *J Biol Chem.*

286:3907-3914. 2011. 査読有

- ② Kioka N, Ito T, Yamashita H, Uekawa N, Umemoto T, Motoyoshi S, Imai H, Takahashi K, Watanabe H, Yamada M & Ueda K Crucial role of vinexin for keratinocyte migration in vitro and epidermal wound healing in vivo. *Experimental cell research* **316**, 1728-1738. 2010 査読有
- ③ Yamazaki T, Fujiwara N, Yukinaga H, Ebisuya M, Shiki T, Kurihara T, Kioka N, Kambe T, Nagao M, Nishida E & Masuda S The Closely Related RNA Helicases, UAP56 and URH49, Preferentially form Distinct mRNA Export Machineries and Coordinately Regulate Mitotic Progression. *Molecular biology of the cell* **21**, 2953-2965. 2010査読有
- ④ Umemoto T, Tanaka K, Ueda K & Kioka N Tyrosine phosphorylation of vinexin in v-Src-transformed cells attenuates the affinity for vinculin. *Biochem Biophys Res Commun* **387**, 191-195. 2009査読有
- ⑤ Umemoto T, Inomoto T, Ueda K, Hamaguchi M & Kioka N v-Src-mediated transformation suppresses the expression of focal adhesion protein vinexin. *Cancer Lett* **279**, 22-29. 2009査読有

[学会発表] (計 25 件)

- ① 2011. 3. 25-28 市川 尚文、山下 寛、松山大輔、植田 和光、木岡 紀幸 ビネキシン-ビンキュリン相互作用の生化学的解析 日本農芸化学会 2011 年度大会 京都
- ② 2010.11.09 T. Sezaki, K. Inada, T. Sogabe, K. Ueda, N. Kioka Crohn's disease associated protein Dlg5/lp-dlg controls epithelial mesenchymal transition in LLcPK1. 第 8 回 iCeMS 国際シンポジウム 京都
- ③ 2010. 09. 22 Tomiyama Lucia, Ueda Kazumitsu, Kioka Noriyuki The role of DLG5 in prostate cancer progression 第 69 回日本学会総会 大阪
- ④ 2010. 5. 19 山下 寛, 植田 和光, 木岡 紀幸 PKA による細胞運動制御機構の解析 第 62 回日本細胞生物学会大会 大阪
- ⑤ 2009.12.5-9 N. Kioka, T. Ito, N. Uekawa, T. Umemoto, S. Motoyoshi, H. Yamashita, H. Imai, K. Takahashi, H. Watanabe, M. Yamada, K. Ueda Crucial Role of Vinexin for Keratinocyte Migration *in vitro* And Epidermal Wound Healing *in vivo* 49th ASCB Annual Meeting, San Diego, USA