

平成 21 年 6 月 9 日現在

研究種目：若手（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790320
 研究課題名（和文） カルポニン 3 を介する新規の細胞融合機構の解明
 研究課題名（英文） The mechanisms of cellular fusion by calponin 3
 研究代表者 渋川幸直（Shibukawa Yukinao）
 地方独立行政法人
 大阪府立病院機構 大阪府立母子保健総合医療センター（研究所）・研究員
 研究者番号：90393264

研究成果の概要（和文）：

これまでに我々はカルポニン 3（CNN3）がトロホプラストの細胞融合による分化を制御することを見いだしてきた。また CNN3 はリン酸化レベルに応じてアクチン細胞骨格との解離・会合を制御していることを明らかにした。CNN3 のリン酸化部位の同定を試みたところ C 末の酸性アミノ酸に富む領域に二カ所(Ser293 および Ser296)存在し、この領域を欠失させた非リン酸化変異体や二カ所のアラニン置導体を発現させた細胞では細胞融合効率が有意に減少していることが明らかとなった。またこれらの変異体ではアクチンとの解離が抑制されていた。さらに二カ所のリン酸化部位特異的な抗リン酸化抗体を作成し細胞融合にともなうリン酸化レベルのプロファイルを行ったところ BeWo 細胞では Fusion 特異的に脱リン酸化が誘導しておりアクチンとの解離が促進していることが明らかとなった。マイオブラストである C2C12 細胞の細胞融合に伴う筋管形成に対しても C 末欠失変異体あるいはアラニン置導体の発現により細胞融合が有意に抑制されていることを明らかにした。また C2C12 細胞では ROCK1/2 が CNN3 キナーゼとして働き細胞融合を制御していることも明らかにした。これらのことから CNN3 はトロホプラストとマイオブラストという発生の異なる細胞で共通する細胞融合による分化に深く関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Cell-cell fusion is a differentiation process essential for the development and maturation of the placenta, muscle and bone in humans, but common mechanisms underlying the intracellular remodeling for fusion in various cell types are almost unknown. We found that forskolin-induced syncytium formation of BeWo cells was accompanied by calponin 3 (CNN3) phosphorylation. Depletion of CNN3 enhanced multinucleation, suggesting CNN3 to be a negative regulator of trophoblast cell fusion. Phosphorylated CNN3 dissociated from actin cytoskeletons in multinucleate cells. The phosphorylation sites were located at Ser293 and Ser296 in the C-terminal region, which is unique to CNN3 in the CNN family, and deletion of this region or site-specific disruption of Ser293/296 suppressed syncytium formation. Moreover, overexpression of these mutants also inhibited C2C12 myoblast cell differentiation represented by fusion, cell elongation and myotube formation. These results implicate that CNN3 phosphorylation in a mechanism of cellular fusion common to different cell lineages.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000

総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生化学、細胞生物学

科研費の分科・細目：医歯薬学・基礎医学、実験病理学

キーワード：発生・分化、プロテオーム、再生医学

1. 研究開始当初の背景

細胞融合は骨、筋肉、胎盤の発生過程において重要な役割を果たすだけでなくウイルス感染や癌化メカニズム、組織の再生などにも関与することが知られている。しかしながらそのメカニズムに関しては不明瞭な部分が多い。これまでに我々は細胞融合のモデル細胞である絨毛癌由来細胞BeWoを用いてリン酸化特異的なプロテオーム解析を行いカルボニン3 (CNN3)が細胞融合を制御しうる分子であることを見いだしてきた。

カルボニンファミリーはアクチン結合性のリン酸化タンパクであり細胞骨格系を制御することが知られていることから「CNN3はアクチン細胞骨格系の再編成を制御することを通して細胞融合を制御する」という作業仮説を立てた。

2. 研究の目的

現在までにトロホブラストの分化過程における細胞融合を CNN3 が制御することを見いだしてきた。更に我々は CNN3 に2カ所のリン酸化部位が存在し Fusion に伴いリン酸化レベルが亢進することを明らかにしてきたが各部位のリン酸化が Fusion に至る細胞内ダイナミクスをどのように制御しているのかは不明のままである。そこで本研究ではまず CNN3 の2カ所のリン酸化部位特異的な抗体を作成し、Fusion に伴う CNN3 の部位特異的なリン酸化レベルの変化と細胞内での局在の変化を明らかにすることを目指す。更にプロテオーム解析を利用して Fusion 特異的に CNN3 に会合する分子、つまり CNN3 のリン酸化特異的に会合する分子の同定と CNN3 の Fusion 制御メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

まず CNN3 の2カ所の部位特異的抗リン酸化抗体および抗 CNN3 抗体の作成を行う。作成する抗体はウエスタンブロット及び細胞染色に使用できるものを望ましい。次に内

在性の CNN3 のリン酸化レベルのプロファイルを行うために BeWo 細胞をフォルスコリンで4日間処理し Fusion 誘導を行う。誘導後、細胞抽出液を調整して SDS-PAGE で展開しウエスタンブロット法により2カ所のリン酸化部位がそれぞれ非誘導時と比較して Fusion 誘導でどのように変化するか経時変化を追ってプロファイルする。C2C12 細胞に関しては低血清培地に置換することにより Fusion 誘導を行い BeWo 細胞と同様のプロファイリングを行う。次に部位特異的な抗リン酸化抗体を用いた細胞染色により各部位のリン酸化レベルによって細胞内の CNN3 局在に変化がみられるかどうかの確認を行いウエスタンブロット法による結果と合わせて細胞融合時における CNN3 のリン酸化の意義についての考察を行う。

CNN3 キナーゼの探索については各種阻害剤の添加実験と特定配列によるデータベースサーチを併せて行う。阻害剤添加により CNN3 のリン酸化レベルに変化が見られた分子に関しては *in vitro* kinase assay 等により CNN3 のリン酸化誘導実験を行い確認し、*in vivo* ノックダウン法と併せて CNN3 キナーゼの同定を行う。

Fusion 特異的な CNN3 会合分子の同定法としては、FLAG タグを付加した CNN3 をレンチウイルスベクターで細胞内に遺伝子導入し安定発現細胞を作成する。各リン酸化部位に最も変化の見られた Fusion 誘導時間で細胞抽出液を調製し、抗 FLAG 抗体カラムを用いて Flag-CNN3 複合体の免疫沈降を行いアセトン沈殿等の適当な濃縮操作を行った後に SDS-PAGE で展開後銀染色を行い各バンドの可視化を行う。必要であればリン酸化タンパク特異的な染色である ProQ-Diamond を使用し、リン酸化レベルに変化の見られる分子の可視化も行う。

得られた候補分子群はまず内在性の CNN3 と会合する事を作成した抗 CNN3 抗体を用いた免疫沈降法により確認する。更に内在性 CNN3 のリン酸化レベルに応じて CNN3-候補分子の会合が変化するかどうかの確認も行う。

4. 研究成果

CNN3 のリン酸化部位の同定を試み、少なくとも3カ所存在するリン酸化部位のうちの2カ所に対して抗リン酸化抗体(phospho-S293, phospho-S296)の作成と解析を行った。BeWo 細胞ではトータルのCNN3 リン酸化レベルはそれほど大きな変化が無かったにもかかわらず局所的な2カ所のリン酸化レベルはフォルスコリン処理時間に伴って低下していくことが明らかとなった。このことは細胞融合に伴い CNN3 の等電点がアルカリ側にシフトしていた事と一致している。また CNN3 はトロホプラストと同様にマイオプラストの細胞融合も制御していた為、マウス筋芽細胞 C2C12 を用いて分化に伴う CNN3 のリン酸化レベルの変化を解析したところ、トロホプラストとは反対に分化誘導3 - 5日目で CNN3 のリン酸化レベルが最大値に上昇し、その後減少していくことを見いだした。これらのことから BeWo 細胞と C2C12 細胞において CNN3 のリン酸化を介して異なる制御機構が存在することが考えられる。

また CNN3 キナーゼの同定と細胞融合特異的に駆動されるシグナルカスケードの探索を目的とし解析を進めたところ、BeWo(トロホプラスト)および C2C12 細胞(マイオプラスト)において ERK1/2 および ROCK1/2 が in vitro で CNN3 の 293 番目のセリンをリン酸化することを見いだした。さらに C2C12 細胞において ROCK をノックダウンした細胞では CNN3 の 293 および 296 番目のセリンのリン酸化が抑制されており、それに伴い筋管形成も抑制されていることを明らかにした。このことは細胞内において ROCK が CNN3 のキナーゼであり細胞融合による筋管形成を制御するシグナルカスケードとして存在していることを示している。また CNN3 の2カ所のリン酸化部位(Ser293 及び Ser296) をアラニンに置換あるいは C 末のリン酸化領域を欠失した変異体を発現させたところ BeWo・C2C12 細胞共に細胞融合を抑制し、反対にアスパラギン酸置換体を発現させた場合は細胞融合が促進する傾向を見いだした。さらに CNN3 とアクチンの会合・解離に関して解析を進めたところ、CNN3 のリン酸化レベルに応じてアクチンとの会合を制御していることも見いだした。これらのことから CNN3 の細胞融合抑制メカニズムとして CNN3 の酸性アミノ酸に富む C 末領域のリン酸化によるアクチン細胞骨格の再編成を調節することが示唆された

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2件)

Kawauchi, K., Tobiume, K., Iwashita, K., Inagaki, H., Morikawa, T., Shibukawa, Y., Moriyama, Y., Hirata, H., and Kamata, H., Cycloprodigosin hydrochloride activates the Ras-PI3K-Akt pathway and suppresses protein synthesis inhibition-induced apoptosis in PC12 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72, 1564-1567 (2008) 査読有

Kariya, Y., Kato, R., Itoh, S., Fukuda, T., Shibukawa, Y., Sanzen, N., Sekiguchi, K., Wada, Y., Kawasaki, N., and Gu, J. N-Glycosylation of laminin-332 regulates its biological functions. A novel function of the bisecting GlcNAc. *J Biol Chem* 283, 33036-33045 (2008) 査読有

〔学会発表〕(計3件)

渋川幸直、山崎奈津子、大門江津子、田尻道子、和田芳直 細胞融合過程における CNN3 の役割 第81回日本生化学会 神戸国際会議場(2008) ポスター

渋川幸直、山崎奈津子、大門江津子、和田芳直 “細胞融合過程におけるカルボニン3の役割” 第82回日本生化学会大会・神戸国際会議場(2009) 口頭、ポスター

大門江津子、渋川幸直、和田芳直.” マウス着床期子宮におけるカルボニン3の発現と機能について” 第82回日本生化学会大会・神戸国際会議場(2009) ポスター

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/inst-mch/MM/MM.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

渋川幸直 (Shibukawa Yukinao)

地方独立行政法人 大阪府立病院機構 大阪府立母子保健総合医療センター(研究所) 研究員

研究者番号：90393264