

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591887

研究課題名（和文）脳腫瘍細胞における細胞極性制御異常の解明

研究課題名（英文）Analysis of abnormal cell polarity in brain tumor cells

研究代表者

井澤 一郎（IZAWA ICHIRO）

愛知県がんセンター（研究所）・発がん制御研究部・室長

研究者番号：20311441

研究成果の概要（和文）：代表的脳腫瘍である神経膠腫（グリオーマ）の形質を細胞極性制御の観点から解析するために、細胞極性を制御する分子である LAP 蛋白質（ヒト ERBIN および Scribble）について解析した。ヒト Scribble と結合する蛋白質を酵母 two-hybrid 法を用いてスクリーニングし、いくつかの新規結合候補蛋白質を同定した。Scribble は、p0071 および MRP4 とその PDZ ドメインを介して相互作用し、細胞の basolateral membrane で共局在し、そして、これらの蛋白質の機能を制御している可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：To study the phenotype of glioma, a representative brain tumor, from the point of view of the regulation of cell polarity, we studied LAP family proteins (human ERBIN and Scribble), which are known to regulate cell polarity. We identified several proteins as binding partners of human Scribble by a yeast two-hybrid screening. We found that Scribble interacts with p0071 and MRP4 via the PDZ domain, co-localizes with these proteins at the basolateral membrane, and may regulate functions of these proteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：細胞極性・細胞接着

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 悪性脳腫瘍の治療は現在なお非常に困

難であるが、この原因のひとつは、腫瘍細胞が脳内で周囲に向かってびまん性に浸潤し

ていくことである。悪性の神経膠腫(グリオーマ)である多形性神経膠芽腫(グリオブラストーマ)は著明な浸潤をきたし、手術時に腫瘍と健常脳の境界は不明瞭であり、再発を防ぐために腫瘍と健常脳との境界を摘除すればするほど、術後に重篤な神経脱落症状を残すこととなる。また、グリオブラストーマでは、その名の示すとおり、腫瘍細胞は不均一で、種々の細胞形態をとり、核は異型化を示す。すなわち、グリオブラストーマでは、形質が同一でない細胞が混在しており、このことも、治療が奏功しない重大な原因のひとつであると考えられている。

(2) 私共はこれまで、細胞極性制御に関与することが報告されている LAP (leucine-rich repeats and PDZ) 蛋白質ファミリーに属する Densin-180 および ERBIN に興味をもち、これらによる細胞極性制御機構の解析を行ってきた。LAP タンパク質はロイシン・リッチ・リピート (leucine-rich repeats; LRR) ドメインおよび PDZ ドメインをもつ分子群であり、PDZ ドメインを 4 個もつ Scribble と、PDZ ドメインを 1 個もつ Densin-180、ERBIN、LET-413 などの蛋白質が属する。私共は、酵母 two-hybrid スクリーニングの系を用いて、Densin-180 の PDZ ドメインと結合しうる蛋白質として p120 カテニン・サブファミリーに属するデルタ・カテニンを世界に先駆けて同定した。また、私共は、ERBIN の PDZ ドメインと結合する蛋白質として、デルタ・カテニンに高い相同性をもつ p0071 蛋白質を同定した。上皮細胞において ERBIN は p0071 と共に細胞間接着部位に存在し、低分子量 G 蛋白質 Rho ファミリーのドミナントアクティブ型を発現させると、ERBIN が細胞間接着部位に濃縮することを報告した。一方、ショウジョウバエにおいて、Scribble は腫瘍抑制遺伝子と考えられており、腫瘍の増殖・浸潤・転移に

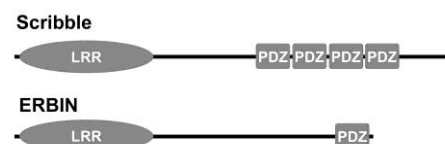
対して抑制的に働くことが報告されている。これまでに Scribble 結合蛋白質として、beta-PIX などが報告されているが、上記の Scribble の機能を説明する分子メカニズムの詳細は不明である。

## 2. 研究の目的

「いかにしてグリオーマの浸潤を抑制するか」が、グリオーマ治療の最重要課題であるが、依然として良い方法は見つかっていない。本研究課題では、グリオーマの浸潤性や形質の不均一性を、細胞極性の制御異常によって引き起こされる現象としてとらえて解析するために、ヒト ERBIN および Scribble による細胞極性制御の分子メカニズムについて探究する。ヒト ERBIN および Scribble 結合蛋白質の同定とその機能解析を行い、ERBIN および Scribble が細胞極性を制御するためのキーとなる分子を同定し、その分子メカニズムを解明する。また、ヒト ERBIN および Scribble のパルミトイル化による形質膜局在化機構の解析を行い、これらの蛋白質の形質膜局在化による機能制御を解析する。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト ERBIN および Scribble 結合蛋白質の同定とその機能解析： LAP タンパク質はロイシン・リッチ・リピート (leucine-rich repeats; LRR) ドメインおよび PDZ ドメインをもつ分子群であり、PDZ ドメインを 4 個もつ Scribble と、PDZ ドメインを 1 個もつ ERBIN などの蛋白質が属する(下図参照)。



本研究では、ヒト ERBIN および Scribble と結合する新規蛋白質の同定を試み、ERBIN および Scribble が細胞極性を制御する分子基

盤を解明する。方法としては、ERBIN または Scribble の全長、あるいは、LRR ドメイン、PDZ ドメイン、LRR ドメインと PDZ ドメインの間、PDZ ドメインより C 末端側のドメインの4つに分け、これらと結合する蛋白質を酵母 two-hybrid 法を用いて探索する。そして、得られた結合候補蛋白質の中で、特にグリオーマ細胞の細胞運動や増殖と分化の統合に関与しうる分子について重点的に解析を加えていく。

(2) ヒト ERBIN および Scribble のパルミトイル化による形質膜局在化機構の解析： 私共は、ERBIN のロイシン・リッチ・リピート (LRR) のさらにアミノ末端側に存在するシステイン 14 および 16 がパルミトイル化されていることを認めており、ERBIN が形質膜に局在化するためには、このシステイン 14 および 16 のパルミトイル化が必須であることを見出している。本研究ではまず、Scribble もパルミトイル化されているかを検討する。次に、Scribble のアミノ末端に存在するシステインに変異を加えた変異体を用いて、これらのパルミトイル化が形質膜局在に必要なかを調べる。

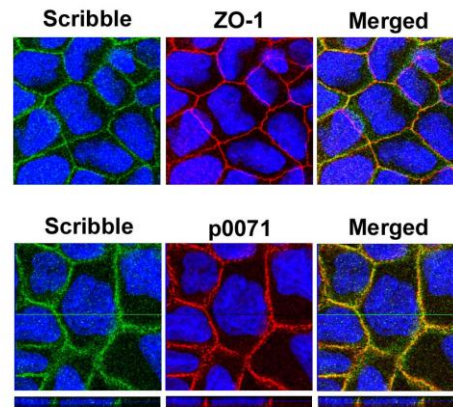
#### 4. 研究成果

(1) ヒト Scribble の全長を用いた two-hybrid screening で、下記の Scribble 結合候補蛋白質を同定した。

- ① p0071 (別名 plakophilin 4)
- ② catenin, delta 2 (CTNND2)
- ③ MRP4 (別名 ABCC4)
- ④ KIAA0408
- ⑤ tetratricopeptide repeat, ankyrin repeat and coiled-coil containing 2 (TANC2)
- ⑥ lysosomal protein transmembrane 4 alpha (LPTM4A)

- ⑦ bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2B (BAZ2B)
- ⑧ transportin 2 (TNPO2)
- ⑨ latrophilin 3 (LPHN3)
- ⑩ THAP domain containing 5
- ⑪ ferritin, heavy polypeptide 1 (FTH1)

(2) 全長 Scribble を bait として行った two-hybrid screening で同定した Scribble 結合候補蛋白質の中で、p0071 について解析を進めた。p0071 (別名 plakophilin 4) は、p120 カテニンと相同性を有する蛋白質で、カドヘリンの関与する細胞間接着に関与する分子であると考えられている。p0071 はその C 末端に PDZ ドメイン結合モチーフをもつが、酵母 two-hybrid 法で、この PDZ 結合モチーフを介して Scribble の PDZ ドメインと結合することが確認された。細胞に強制発現した Scribble を免疫沈降すると、内在性の p0071 が共沈した。さらに、MDCK 細胞における細胞免疫染色で、Scribble と p0071 の共局在が認められた (下図参照)。



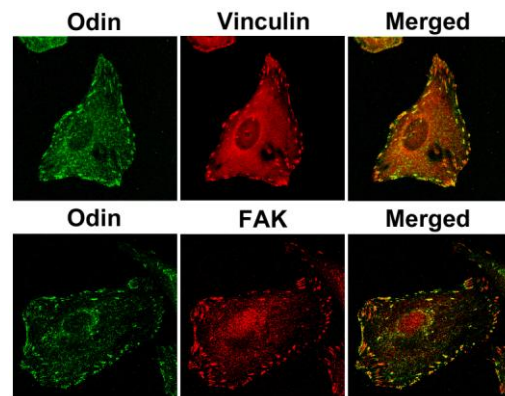
興味深いことに、Scribble の発現を RNA 干渉法にてノックダウンすると、p0071 の発現量が増加した。また、同様に、Scribble の発現を RNA 干渉法にてノックダウンし、免疫染色を行うと、p120 カテニンと相互作用が報告されている転写因子の一種である Kaiso が、細

胞内より核内に移行する傾向が認められた。

(3) 全長 Scribble を bait として行った two-hybrid screening で同定した Scribble 結合候補蛋白質の中で、Multidrug resistance protein 4 (MRP4、別名 ABCC4) について解析を行った。MRP4 は、ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily の subfamily C に属する蛋白質で、形質膜に存在して、ロイコトリエン B4、cAMP、PGE1、GSH などの内在性基質や MTX、topotecan などの抗がん剤の細胞外への輸送を行う蛋白質であることが報告されている。また、MRP4 は前立腺を含む幅広い組織で発現が認められているが、細胞によって、apical membrane に局在する場合と、basolateral membrane に局在する場合があるとされている。MRP4 はその C 末端に ETAL という PDZ ドメイン結合モチーフをもつが、酵母 two-hybrid 法で、この PDZ 結合モチーフを介して Scribble の PDZ ドメインと結合することが確認された。細胞に強制発現した Scribble を免疫沈降すると、内在性の MRP4 が共沈した。さらに、内在性の Scribble を抗 Scribble 抗体で免疫沈降したところ、その免疫沈降物中に MRP4 が含まれており、Scribble と MRP4 は、in vivo で結合していることが確認された。Caco-2 細胞における細胞免疫染色で、Scribble と MRP4 は、basolateral membrane 上で共局在していた。また、Caco-2 細胞で Scribble の発現を RNA 干渉法にてノックダウンし、免疫染色を行うと、MRP4 が basolateral membrane より消失した。これらのことより、Scribble は MRP4 と相互作用し、その機能を制御している可能性が示された。

(4) ERBIN の Leucine rich repeats ドメインを bait として行った two-hybrid screening

で ERBIN 結合候補蛋白質として同定した Odin について解析を行った。最終的に、Odin に対する抗体を作製し、内在性の ERBIN と Odin が結合するかを検討したが、結合は認められなかった。また、作製した抗体を用いて行った細胞免疫染色で Odin は、細胞免疫染色で ERBIN の存在する細胞間接着部位には存在せず、一部は、細胞—基質間接着部位に存在した（下図参照）。



(5) ヒト Scribble のパルミトイル化の可能性について検討した。Scribble の N 末端に存在する 3 個のシステイン（システイン 4、システイン 10、システイン 22）の変異体を作製し、細胞に強制発現させてそれらの局在を観察したところ、システイン 4 およびシステイン 10 が、Scribble の形質膜局在に重要であることが判明した。また、システイン 4 およびシステイン 10 の変異体は、野生型のものに比べて可溶性が高くなっていた。これらのことから、Scribble のシステイン 4 およびシステイン 10 がパルミトイル化されている可能性が示唆された。

(6) まとめ： 本研究で Scribble 結合蛋白質として同定した p0071 および MRP4 について、今後さらに検討を加え、グリオーマの細胞極性の特徴を明らかにしていきたいと考えている。また、Odin のグリオーマ細胞の運

動における働きについても検討していく予定である。

愛知県がんセンター（研究所）・発がん制御研究部・室長  
研究者番号：20311441

## 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 Inoko, A., Matsuyama, M., Goto, H., Ohmuro-Matsuyama, Y., Hayashi, Y., Enomoto, M., Ibi, M., Urano, T., Yonemura, S., Kiyono, T., Izawa, I., Inagaki, M.: Trichoplein and Aurora A block aberrant primary cilia assembly in proliferating cells. J. Cell Biol., 197:391-405, 2012, DOI:10.1083/jcb.201106101（査読有）

〔学会発表〕（計4件）

① Izawa I., Hayashi Y., Inagaki M.: Odin/ANKS1A, a PTB domain-containing protein, is localized at focal adhesion. 第70回日本癌学会学術総会. 2011年10月5日. 名古屋国際会議場（愛知県）

② 井澤一郎、林裕子、稲垣昌樹：LAP蛋白質 Scribble と p0071 の相互作用. 第69回日本癌学会学術総会. 2010年9月22日. 大阪国際会議場（大阪府）

③ 井澤一郎、林裕子、稲垣昌樹：PI3K-Akt シグナル経路への ERBIN の関与の可能性. 第68回日本癌学会学術総会. 2009年10月3日. パシフィコ横浜（神奈川県）

④ 井澤一郎、林裕子、稲垣昌樹：ERBIN の形質膜局在にはパルミトイル化が必要である. 第61回日本細胞生物学会大会. 2009年6月3日. 名古屋国際会議場（愛知県）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pref.aichi.jp/cancer-center>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

井澤 一郎 (IZAWA ICHIRO)