

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 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22770195

研究課題名（和文） PRLのレドックスセンサー機能の解明

研究課題名（英文） Characterization of PRL as a redox-sensing molecule

研究代表者

船戸 洋佑 (FUNATO YOSUKE)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：60505775

研究成果の概要（和文）：がん転移に関わる PRL と結合する因子を網羅的に探索した結果、機能未知の膜蛋白質を同定し、MagEx と命名した。MagEx は PRL と酸化・還元（レドックス）依存的に複合体を形成しており、機能解析の結果、MagEx が Mg^{2+} を排出する因子であることを突き止めた。この MagEx 発現細胞における Mg^{2+} の排出は PRL の共発現により抑制され、そしてその抑制は過酸化水素処理によって解除された。さらに、MagEx は Mg^{2+} の排出に伴って Akt/mTOR 経路を負に制御しており、PRL を共発現する細胞ではこの抑制が解除されていた。そして、マウス肺転移モデル実験より MagEx の発現抑制細胞では PRL の安定発現株と同様に肺転移能が亢進していた。これらの実験結果より、PRL とレドックス依存的に結合する MagEx が PRL によるがん転移促進の分子標的となっていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：I searched for a novel interacting protein of PRL, a protein tyrosine phosphatase involved in tumor metastasis, and identified MagEx as a major binding partner of PRL. MagEx interacts with PRL in a redox-dependent manner. Functional analyses revealed that MagEx stimulates Mg^{2+} -efflux. Overexpression of PRL inhibits the MagEx-dependent Mg^{2+} -efflux, which is restored by stimulating the cells with hydrogen peroxide. Mg^{2+} -efflux by MagEx results in suppression of Akt/mTOR signaling, which is cancelled by co-expression of PRL. Furthermore, experimental metastasis analyses in mice reveal that RNAi-mediated knockdown of MagEx resulted in increased metastatic nodules in lungs. Collectively, these results indicate that MagEx is the molecular target for PRL.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2011 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞内情報伝達

1. 研究開始当初の背景

近年、活性酸素種 (reactive oxygen species,

ROS) が個体レベルにおいて生理的に機能していることが実験的に証明されてきており

(*Nature* 459, 996-999 (2009) など)、ROS が仲介するレドックス (酸化・還元) シグナルを解析する重要性がこれまでに高まっている。一見有害で非特異的に見える ROS が生理的に働くには空間、時間的に限定された ROS を感知する「レドックスセンサー分子」が必要不可欠である。申請者はレドックス関連蛋白質 nucleoredoxin (NRX) の解析を行ってきた。その成果として、NRX が初期発生やがん化に関わる Wnt シグナル経路の必須アダプター分子 Dishevelled (Dvl) にレドックス依存的に結合し、NRX がレドックス依存的な Wnt シグナル経路の活性制御を担っているレドックスセンサー分子として働くことを明らかにした (Funato et al., *Nat. Cell Biol.* 8, 501-508 (2006), Funato et al., *Antioxid. Redox Signal.* 9, 1035-1057 (2007) など)。しかし、NRX のようなレドックスセンサーの報告例は現状では殆どなく、多くが未解明であると考えられる。

チロシンホスファターゼファミリーに属する PRL-3 (Phosphatase in regenerating liver-3) は網羅的解析の結果、大腸がんの転移時において特異的に発現上昇することが認められた唯一の分子であり、実際にがん患者での転移巣での遺伝子増幅が確認されている (*Science* 294, 1343-1346 (2001))。また、マウスにおける転移モデル実験より、PRL-3 の発現上昇により転移能が亢進することが示されており、PRL-3 ががん転移因子であることが明確となっている。しかし、PRL-3 の発現上昇が転移へとつながる機構はわかっておらず、また PRL-3 の生理的な基質は判明していない。そこで私は未解明であった PRL の基質探索を目的として、研究に着手した。チロシンホスファターゼ一般に活性中心を置換した変異体で酵素-基質の結合が強まり、基質探索に有用であると言われている。このことより、PRL の野生型及び活性中心のシステイン (Cys104) をセリンに置換した変異体 (C104S 変異体) を安定発現する細胞株を樹立し、免疫沈降法により結合蛋白質を探索した。その結果、意外なことに C104S 変異体では野生型と比べてむしろシグナルが弱まっているバンドが検出された。この実験結果は PRL がホスファターゼとしてではなく、むしろレドックスセンサーとしてその機能を発揮してがん転移に関与しているという全く新しい可能性を想起させる。

実際、PRL の野生型、ないしは C104S または Cys49Ser (C49S) 変異体を発現している細胞で各種シグナル伝達経路の活性化度合を調べたところ、悪性がん組織内を模した低酸

素状態 (酸化ストレスが生じる) では、細胞の増殖と密接に関与している Akt/mTOR 経路の活性保持が PRL の野生型発現細胞株でのみ起こり、C104S 変異型や C49S 変異型の発現株では見受けられなかった。合成基質を用いた PRL のホスファターゼ活性測定により C49S 変異体では活性が減少しないことがわかっており、上の実験結果は PRL がホスファターゼでなくむしろレドックスセンサーとして機能しているという今回の仮説を強く裏付ける結果と位置づけられる。

2. 研究の目的

本研究は PRL のレドックスセンサーとしての役割という、全く新しい切り口からそのシグナル伝達機構を解明しようとするものである。PRL はがん転移において重要な役割を果たしていることが知られていながら、その機能メカニズムが殆どわかっていない。PRL がチロシンホスファターゼとしてではなく、むしろレドックスセンサーとして機能していることを示唆する結果を得ている。蛋白質のアミノ酸修飾のレベルからマウス個体における転移実験までの一連の解析によって PRL の新規作用機序を解明し、レドックスシグナルとがん転移との関連の一端を明らかにすることを目指す。

3. 研究の方法

(1) FLAG タグ付き PRL の安定発現株を樹立し、この細胞株由来の細胞溶解液を用いた免疫沈降法を行った。その結果、野生型 PRL に結合し、C104S 変異体では結合が減弱する蛋白質がいくつかゲル上で確認されている。これらの蛋白質を質量分析法によって同定する。同定された蛋白質と PRL との複合体形成について、レドックス依存的な相互作用を中心としてその詳細を明らかにし、さらなる機能解析を行うべき因子を絞り込む。

(2) 上の(1)で絞り込んだ候補因子について PRL との結合領域を明らかにする。加えて、ROS によって PRL との複合体形成がどのように変化するのか、する場合どのような分子メカニズムで起こっているのか、両蛋白質のシステイン残基を中心に酸化修飾の有無やその種類を明らかにする。

(3) 上記分子の持つ機能に PRL がどのように関与しているのか、並びに PRL が関与する Akt/mTOR 経路について、培養細胞レベルでの解析を行い、詳細を明らかにする。

(4) 上記分子の安定発現、あるいは発現抑制株をマウスでの肺への転移モデルが確立されている B16 細胞より樹立し、尾静注により転移実験を行う。

4. 研究成果

(1) 質量分析の結果、PRL の主要な結合因子として機能未知の膜蛋白質を同定し、MagEx と命名した。

(2) この MagEx について、まず PRL との結合について詳細に検証を行った。免疫沈降法により、内在性の PRL と MagEx が細胞内で複合体を形成すること、ならびに細胞に対する過酸化水素処理により PRL が自身の Cys104 と Cys49 との間で分子内ジスルフィド結合を形成し、両者の結合が減弱することを見出した。

また、双方の組換え蛋白質を用いた実験より、両者の結合が直接であること、およびこの直接の相互作用についてもレドックス依存的であることも見出している。

(3) ライブイメージング法などを用いて MagEx の機能解析を行った結果、MagEx は細胞外にある Na⁺ との交換により Mg²⁺ を排出する因子であることを突き止めた。MagEx 発現細胞における Mg²⁺ の排出は PRL の共発現により抑制された。そして、過酸化水素処理を行うことによって PRL による MagEx 依存的な Mg²⁺ の排出に対する抑制効果が解除された。

(4) MagEx 発現細胞では細胞増殖が顕著に抑えられており、各種シグナル伝達経路の活性化状態を調べた結果、がんの悪性化と関わる Akt/mTOR 経路が抑制されていた。この抑制に関して、培地中への高濃度の Mg²⁺ 添加、あるいは PRL の共発現により解除されることを突き止めた。

(5) マウスメラノーマ細胞である B16 細胞を用いて、RNA 干渉法による MagEx の発現抑制株を作製した。尾静脈よりこの細胞を注入するマウス肺転移モデル実験を行ったところ、PRL の安定発現株と同様、肺転移巣の数がコントロール細胞株と比較して有意に増大していることが判明した。

これらの実験結果より、PRL とレドックス依存的に結合する MagEx について、Mg²⁺ を排出することによって Akt/mTOR 経路を制御すること、そして MagEx が PRL によるがん転移促進の分子標的となっていることが明らかとなった。

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 7 件)

- ① Miki, H., and Funato, Y. Regulation of intracellular signalling through cysteine oxidation by reactive oxygen species. *J. Biochem.* 151, 255-261 (2012) 査読有

② Morinaka, A., Funato, Y., Uesugi, K., and Miki, H. Oligomeric peroxiredoxin-I is an essential intermediate for p53 to activate MST1 kinase and apoptosis. *Oncogene* 30, 4208-4218 (2011) 査読有

③ Morinaka, A., Yamada, M., Itofusa, R., Funato, Y., Yoshimura, Y., Nakamura, F., Yoshimura, T., Kaibuchi, K., Goshima, Y., Hoshino, M., Kamiguchi, H., and Miki, H. Thioredoxin mediates oxidation- dependent phosphorylation of CRMP2 and growth cone collapse. *Science Signal.* 4, ra26 (2011) 査読有

④ Müller, L., Funato, Y., Miki, H., and Zimmermann, R. An interaction between human Sec63 and nucleoredoxin may provide the missing link between the SEC63 gene and polycystic liver disease. *FEBS Lett.* 585, 596-600 (2011) 査読有

⑤ Funato, Y., Terabayashi, T., Sakamoto, R., Okuzaki, D., Ichise, H., Nojima, H., Yoshida, N., and Miki H. Nucleoredoxin sustains Wnt/ β -catenin signaling by retaining a pool of inactive Dishevelled protein. *Curr. Biol.* 20, 1945-1952 (2010) 査読有

⑥ #Hayashi, T., #Funato, Y., Terabayashi, T., Morinaka, A., Sakamoto, R., Ichise, H., Fukuda, H., Yoshida, N., and Miki, H. (#: equal contribution) Nucleoredoxin negatively regulates Toll-like receptor 4 signaling via recruitment of flightless-I to myeloid differentiation primary response gene (88). *J. Biol. Chem.* 285, 18586-18593 (2010) 査読有

⑦ Funato, Y. and Miki, H. Redox regulation of Wnt signalling via nucleoredoxin. *Free Radic. Res.* 44, 379-388 (2010) 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 船戸洋佑、三木裕明 Nucleoredoxin sustains Wnt/ β -catenin signaling by keeping inactive pool of Dishevelled. 第 26 回熊本医学・生物科学シンポジウム 2010.6.19 熊本

- ② 船戸洋佑、寺林健、吉田進昭、三木裕明
「NucleoredoxinはDishevelled蛋白質の安定性を制御することによってWnt/b-catenin経路の活性を調節している」第62回日本細胞生物学会大会 若手優秀発表 2010.5.19 大阪

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

船戸 洋佑 (FUNATO YOSUKE)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：60505775