

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：34521

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590100

研究課題名(和文)分子シャペロンによる新規癌抑制因子WW45の機能制御

研究課題名(英文)Functional regulation of novel tumor suppressor protein Sav1 by molecular chaperone

研究代表者

柴田 克志 (SHIBATA, Katsushi)

姫路獨協大学・薬学部・教授

研究者番号：70296565

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではタンデムアフィニティー精製により、分子シャペロン(Hsp60、Hsp70)がSav1の新規結合蛋白質である事を見出した。細胞内局在解析によりSav1は主に微小管に局在しHsp70とともにアグレスーム形成に関与する事が明らかとなり、微小管依存的輸送/アグレスーム形成の基本制御因子として関与している可能性が示唆された。また、プロテオミクス解析により、ミトコンドリア分子シャペロンであるHsp60がSav1の新規結合蛋白質である事も見出し、細胞内局在解析によりSav1はミトコンドリアにも局在している事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Using high throughput proteomics screening, we identified the molecular chaperones (Hsp60 and Hsp70) as a novel protein associated with Sav1 (mammalian homologue of Salvador). Sav1 targets to the aggresome and its sequestration to the aggresome is enhanced by the proteasome inhibitor MG132. Furthermore, Sav1 co-localized with Hsp70 and CHIP (carboxy terminus of Hsp70-interacting protein) that has been shown to mediate substrate ubiquitination and degradation by the proteasome. In addition, anti-Sav1 immunostainings displayed partial colocalization with Hsp60. In this study, we demonstrate that Hsp60 is one of the proteins that binds to Sav1. The interaction between Hsp60 and Sav1 could influence the Hsp60-mediated signaling cascade. This study suggests that Sav1 has a previously unexpected critical role in the aggresome pathway.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

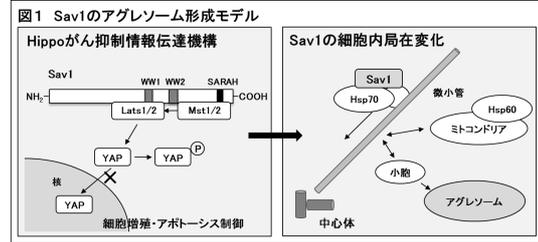
キーワード：Sav1 分子シャペロン アグレスーム ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

分子シャペロンは蛋白質のフォールディングに主要な役割を担っており、一連のファミリー (Hsp60、Hsp70、Hsp90、Hsp27 など) を形成している。ミスフォールド蛋白質は分子シャペロンによりリフォールディングされ、細胞内で再利用される。リフォールディングされなかった蛋白質は、ユビキチン-プロテアソーム系で分解される事となる。また、過剰なミスフォールド蛋白質が蓄積すると細胞内凝集体 (アグレソーム) として集積し、細胞毒性を呈する事が知られている。ポリグルタミンを有する異常蛋白質はアグレソームを形成し、多くの遺伝性神経変性疾患の病態に関与すると考えられている。近年、分子シャペロンは蛋白質のフォールディング以外に、細胞内蛋白質輸送や情報伝達制御に、直接関与している可能性が示唆されている。特に、Hsp70 や Hsp90 ファミリーの分子シャペロンについては、細胞内情報伝達系に関する役割が詳細に解析されており、Akt/PKB、MAPK 系などの主要なリン酸化カスケードを構成する、複数の情報伝達分子と複合体を形成し、細胞増殖やアポトーシス制御に関与している事が報告されている。

一方、変異体ショウジョウバエを用いた研究より、酵母から哺乳動物に至るまで高度に保存された、新たな癌抑制系情報伝達機構 (Hippo-Salvador-Warts) が見出され、上皮細胞の増殖やアポトーシスに深く関与している事が明らかとなっている。特に、Salvador の哺乳動物ホモログである WW45 (以下 Sav1) は、Hippo-Salvador-Warts 情報伝達経路の足場蛋白質として、複数の情報伝達分子と蛋白質-蛋白質相互作用する事により、迅速な情報伝達制御に重要な役割を担っている。Sav1 はアミノ末端に塩基性アミノ酸クラスター、2つの WW ドメイン、カルボキシル末端にポリグルタミン領域、SARAH (Salvador、RASSF1、Hippo) ドメインを有する、45kd のアダプター蛋白質である。特に、Sav1 は細胞質、核、細胞周期の一時期には中心体へも局在する事が報告されているが、細胞内局在変化の分子メカニズムの詳細は不明である。我々はプロテオミクス解析により、分子シャペロンである Hsp60 が、Sav1 の新規結合蛋白質である事を見出した。また、免疫組織化学的解析により、Sav1 は細胞質およびミトコンドリアにおいて Hsp60 と部分共局在しており、Hsp60 との相互作用は Sav1 の細胞内局在変化ならびに、Hippo-Salvador-Warts 情報伝達の新たな活性制御機構である可能性が示唆された。Hsp60 は主にミトコンドリアに局在する分子シャペロンであるが、細胞膜や細胞質にも局在し、蛋白質輸送や細胞内情報伝達にも関与していると考えられている。Hsp60 は pro-caspase-3、Bax、p53 などの、アポトーシス関連分子と相互作用する事が報告されており、癌細胞における細胞増殖・アポトーシス制御に関わる、情報伝達分

子としての役割が注目されている (図1)。



2. 研究の目的

本研究では、分子生物学的、プロテオミクス技術を駆使して、Sav1-Hsp60 および Sav1-Hsp70 複合体形成の分子メカニズムならびに、中心体・微小管ネットワーク制御における意義を明らかとする事を第一の目的とする。また、RASSF1A の新規結合中心体蛋白質を同定・機能解析する事により、中心体・微小管制御ならびに、Hippo-Salvador-Warts 情報伝達の新たな活性制御機構を見出す事を第二の目的とする。

3. 研究の方法

(1) Sav1 の新規結合蛋白質の同定: FLAG、HA の二つのタグを融合した Sav1 (FLAG-HA-Sav1) を用いた二段階免疫沈降法により、新規 Sav1 結合蛋白質を同定する。まず、FLAG-HA-Sav1 の安定発現細胞を作製し、非変性条件下において可溶化し、抗 FLAG、抗 HA 抗体を用い段階的に共免疫沈降する事により、FLAG-HA-Sav1 を構成成分とする蛋白質複合体を精製する。次に、電気泳動、質量分析法により分離蛋白質を解析する。

(2) Sav1 の細胞内局在変化の解析: 可視化蛍光技術による解析: 生細胞でリアルタイムにモニターするため、GFP 融合蛋白質を発現させた哺乳動物細胞株を作製し、Sav1 の細胞内局在動態を解析する。免疫組織化学による解析: GFP 融合蛋白質を用いた実験より見出した知見は、内在性蛋白質に対する抗体を用いて、実験結果の再現性を確認する。また、FLAG、HA などの比較的小さいタグとの融合蛋白質を発現させた各種細胞株で、抗タグ抗体を用いて局在変化を解析する。また、適宜、電子顕微鏡を用いて局在特性の詳細を観察する。中心体・微小管動態変化の解析: 抗チューブリン抗体、抗チューブリン抗体を用いた免疫組織化学的解析により、中心体周期、微小管形成 (星状体形成) を解析する。また、微小管形成阻害あるいは、安定化の各種薬剤を用いて、微小管動態変化と Sav1 の細胞内局在変化との関連を解析する。

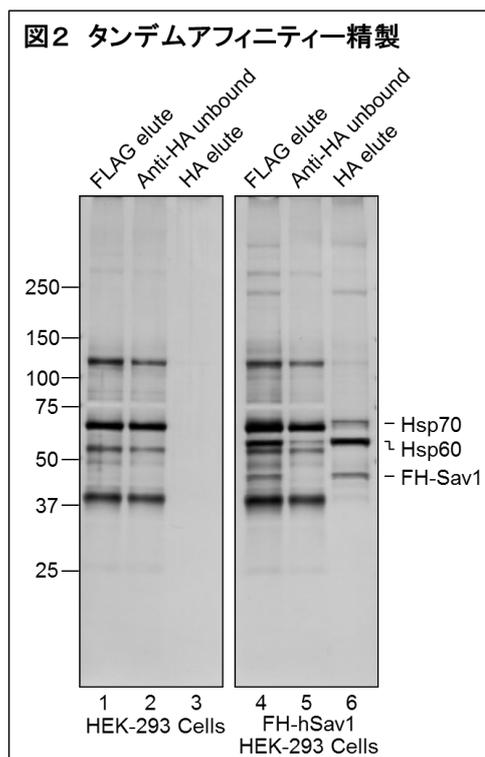
(3) ノックダウン細胞の作製: shRNA 発現レンチウイルスを用いて、Sav1 を特異的にノックダウンさせ、細胞生理機能との関連を解析する。

(4) ドメイン構造の解析: ドメイン構造に

基づき、Sav1 の各種変異体を作製し、細胞内局在変化ならびに共免疫沈降法を用いて分子シャペロンと相互作用するドメインを決定する。

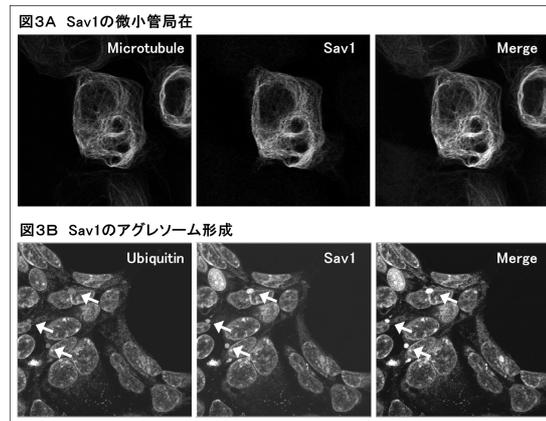
4. 研究成果

(1) タンデムアフィニティー精製により、分子シャペロン (Hsp60、Hsp70) が Sav1 の新規結合蛋白質である事を見出した (図 2)。分子シャペロンである Hsp70 はミスフォールド蛋白質のユビキチン化ならびにダイニン依存性の微小管逆行輸送に主要な役割を担っており、過剰のミスフォールド蛋白質はアグレソームとして細胞質内に集積する事が知られている。中心体・微小管動態やプロテアソームを阻害する薬剤は抗がん薬としても臨床応用されており、微小管依存的輸送 / アグレソーム形成系はがん治療の標的情報伝達経路として注目されている。また、Hsp60 は主にミトコンドリアに局在する分子シャペロンであるが、細胞膜や細胞質にも局在し、蛋白質輸送や細胞内情報伝達にも関与していると考えられている。Hsp60 は pro-caspase-3、Bax、p53 などの、アポトーシス関連分子と相互作用する事が報告されており、癌細胞における細胞増殖・アポトーシス制御に関わる、情報伝達分子としての役割が注目されている。

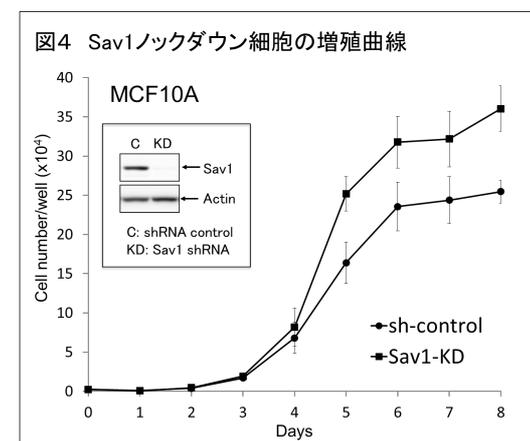


(2) Sav1 の細胞内局在解析により、Sav1 は主に微小管に局在し Hsp70 とともにアグレソーム形成に関与する事を明らかとした (図 3 A および 3 B)。アグレソーム形成はストレスに対する生理的な細胞防御反応の一つであるが、病的アグレソーム形成はがんや神

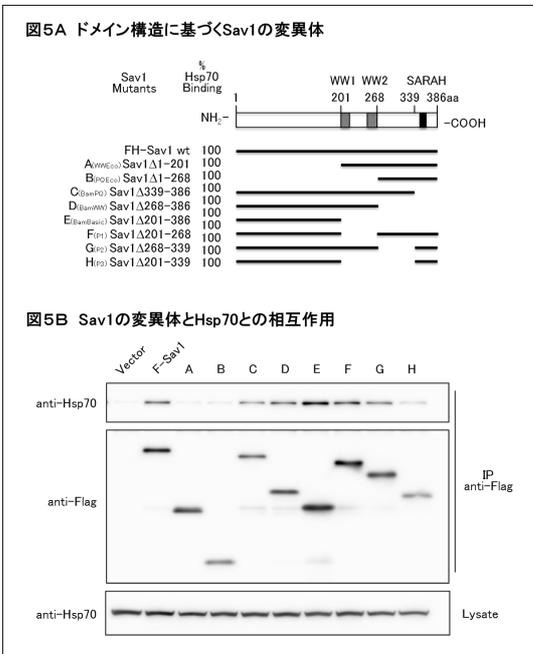
経変性疾患の病態生理に関与すると考えられており、Sav1 が細胞防御反応としてのアグレソーム形成のみならず病的アグレソーム形成にも関与する、すなわち微小管依存的輸送 / アグレソーム形成の基本制御因子として関与している可能性が示唆された。また、免疫組織化学的解析により、Sav1 は細胞質およびミトコンドリアにおいて Hsp60 と部分共局在していた。以上より、Hsp70 および Hsp60 と Sav1 との相互作用は Sav1 の細胞内局在変化ならびに、Hippo-Salvador-Warts 情報伝達の新たな活性制御機構である可能性が示唆された。



(3) Sav1 の細胞生理機能: 乳腺上皮細胞である MCF10A 細胞株において Sav1 遺伝子の特異的にノックダウンさせた細胞株を作製し、細胞増殖能の変化を解析した。その結果、Sav1 遺伝子の特異的にノックダウンさせた細胞株では対照細胞と比較して、細胞増殖能が亢進している事が明らかとなった。この結果により、Sav1 は非がん細胞株において細胞増殖を負に制御している可能性が示唆された (図 4)。



(4) Sav1 と Hsp70 との結合ドメイン決定: Sav1 のドメイン構造に基づき各種 Sav1 変異体を作製した (図 5 A)。Sav1 と Hsp70 との結合ドメインを決定するために共免疫沈降を行った所、Sav1 のアミノ末端が Hsp70 との結合には必要である事が示唆された (図 5 B)。



5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計4件)

酒井伸也

新規がん抑制遺伝子 Sav1 の細胞増殖制御における役割

- ヒトがん細胞を用いた検討 -

第 86 回日本薬理学会年会

平成 25 年 3 月 21 日 ~ 23 日

福岡

酒井伸也

アグレソーム形成における Sav1 の新たな機能

第 59 回日本生化学会近畿支部例会

平成 24 年 5 月 19 日

京都

Sakai N

Functional characterization of novel tumor suppressor protein Sav1 in cancer cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition.

2013 Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology

April 21-25, 2013

Boston, Massachusetts, USA.

Sakai N

The novel role of Sav1 in aggresome formation.

2012 Annual Meeting of the American Society for Biochemistry and Molecular Biology

April 21-25, 2012

San Diego, California, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 克志 (SHIBATA, Katsushi)

姫路獨協大学・薬学部・教授

研究者番号: 70296565

(2) 研究分担者

白木 孝 (SHIRAKI, Takashi)

姫路獨協大学・薬学部・准教授

研究者番号: 10294208

(3) 研究分担者

酒井 伸也 (SAKAI, Nobuya)

姫路獨協大学・薬学部・講師

研究者番号: 30525077

(4) 連携研究者

輿水 崇鏡 (KOSHIMIZU, Taka-aki)

自治医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 20392491

(5) 連携研究者

今西 順久 (IMANISHI, Yori-hisa)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号: 80255538