

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790090

研究課題名（和文） 新規細胞運動制御因子 SH3P2 の機能解析

研究課題名（英文） Molecular analysis of SH3P2 function during cell migration

研究代表者

谷村 進（TANIMURA SUSUMU）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90343342

研究成果の概要（和文）：

新規細胞運動調節因子である SH3P2 の機能解析を目的として、その結合タンパク質である hnRNP-K と Myosin1E に焦点を当てて解析を進めた。その結果、SH3P2 は hnRNP-K による MMP-3/-9 等のスプライシング調節を介して、また Myosin1E によるカベオラ形成を介して細胞運動を制御する可能性を示す新たな知見を得た。

研究成果の概要（英文）：

SH3P2, a novel regulator of cell migration, binds to hnRNP-K and Myosin1E. Overexpression of SH3P2 inhibited the splicing of MMP-3/-9 mRNA. GST pull down/LC-MS/MS assay revealed that SH3 domain of Myosin1E interacts with Caveolin1-Cavin complex, which plays important roles in caveolae formation. These results indicate that SH3P2 regulates cell migration via hnRNP-K-mediated mRNA splicing of MMPs and Myosin1E-mediated caveolae formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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：薬学・生物系薬学

キーワード：癌、シグナル伝達、細胞運動、リン酸化、MAP キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

ERK 経路は様々な細胞外刺激に応答して活性化され、細胞増殖、分化、運動性亢進など、多彩な生理応答の誘導において中心的な役割を果たしている。我々はここ数年来、特に細胞運動制御における ERK 経路の役割に注目して解析を進め、ERK 経路は細胞運動を調節する分子群（Ezrin、CD44、Matrix metalloproteinase [MMP] -9 等）の遺伝子発現を介して細胞運動を亢進させること、ERK 経路の機能亢進はがん細胞の高い浸潤能獲得に連動することを明らかにした。

さらに我々は、発現クローニング法を用い

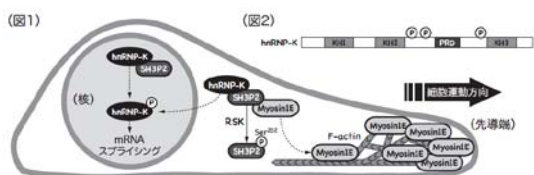
て「細胞運動制御に関与する分子の探索」を進めた結果、発現亢進によって細胞の運動性が抑制される分子として、SH3 ドメインを有するタンパク質「SH3P2」を見いだした。その後の解析より、SH3P2 はクラス 1 ミオシンに分類される Myosin1E と特異的に結合すること、SH3P2 と Myosin1E の結合には SH3P2 の C 末端領域が必須であること、C 末端領域にある Ser²⁰² が ERK 経路依存的に (RSK によって直接) リン酸化されると SH3P2 は Myosin1E から解離すること、Myosin1E の発現抑制によって細胞運動が抑制されるなどを見いだした。そして、これらの結果より、「SH3P2-Myosin1E システムは、ERK 経路を

介したリン酸化によって機能制御される、新しい細胞運動調節機構」であると考えるに至った (図1 右側)。

また、SH3P2のN末端部位にはSH3ドメインが存在することに着目して、SH3P2のSH3ドメインと相互作用するタンパク質の同定をGST pull down assay等を用いて進めた結果、意外にもRNA結合タンパク質「heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-K; hnRNP-K」を見いだした。

hnRNP-Kは、遺伝子発現の様々なステップ(転写、RNAスプライシング、RNA安定性、タンパク質翻訳など)に関与する多機能分子であり、幾つかのがん細胞でその発現亢進が報告されている。hnRNP-KにはK homology (KH)ドメインが3カ所存在し、それを介してDNA/RNAの特定配列に結合すること、KH2とKH3の間に存在するProline-richドメイン(PRD; SH3ドメインのリガンド)には様々な分子(他のRNA結合タンパク質など)が結合して複合体を形成することなどが報告されている(図2)。また、hnRNP-KはMAPキナーゼ、あるいはSrcファミリーキナーゼによってリン酸化されることで、RNAとの結合能/他の分子との相互作用が変化する可能性が示唆されているが、詳細は不明である。

この点に関して、我々はSH3P2は細胞質だけでなく核内にも存在すること、核外移行阻害剤Leptomycin BでHeLa細胞などを処理するとSH3P2が核内に集積することを見いだした。これらの結果は、SH3P2が核内で何らかの役割を果たす可能性を示唆する。これらの知見をもとに、我々は「静止期細胞においてSH3P2は細胞質/核内でhnRNP-Kと結合してその機能を抑制している。血清等の細胞外刺激に反応してSH3P2から解離したhnRNP-Kが、細胞運動制御に関わる特定の遺伝子群のRNAスプライシングを調節する」可能性を考えた(図1左側)。



2. 研究の目的

本研究では、細胞運動制御に関わる新規分子として我々が同定したSH3P2が、Myosin1Eに加えて、hnRNP-Kとの相互作用を介して細胞運動制御に関わる一群の遺伝子の発現制

御にも関わる可能性を検討する。我々はこれまでに、ERK経路が恒常的に活性化している多くのがん細胞が、細胞運動を調節する分子群(CD44、MMP-3/-9/-14など)の発現亢進を介して、高い細胞運動・浸潤能を有することを報告している。なお、hnRNP-Kも細胞外刺激に反応してリン酸化される。これより我々は、SH3P2-hnRNP-K複合体形成も、SH3P2-Myosin1Eの場合と同様、リン酸化によって制御を受ける可能性を予測している。すなわち、細胞外刺激に伴って、SH3P2に補足されていたMyosin1E、及びhnRNP-Kが遊離され、Myosin1EはF-アクチン上の移動を介して直接的に細胞運動亢進に寄与する。一方、hnRNP-Kは細胞運動過程で機能する幾つかの分子の発現を調節する。これらが統合されて初めて、効果的な細胞運動が誘起されるのではないかと考えている。すなわち、SH3P2はMyosin1E/hnRNP-Kが不適切なタイミングで機能しないようにブレーキをかけている可能性が示唆される。

本研究では、SH3P2がhnRNP-Kとの相互作用を介して細胞運動制御に関わる遺伝子群の発現(RNAスプライシング)を制御する可能性、SH3P2-hnRNP-K複合体形成が細胞外刺激に反応したリン酸化によって制御される可能性、を中心に検証する。これより、SH3P2を介した新たな細胞運動制御機構の実態を分子レベルで明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) SH3P2-hnRNP-Kの相互作用制御の分子メカニズム解明

hnRNP-KのPRD欠失変異体/免疫共沈法を用いてSH3P2結合領域を特定するとともに、各種リン酸化酵素阻害剤がSH3P2とhnRNP-Kの相互作用に及ぼす影響を確認する。それらの結果を踏まえて、SH3P2との相互作用に影響を及ぼすhnRNP-Kのリン酸化部位、及びリン酸化酵素の同定を進める。なお、各条件下でのhnRNP-Kの細胞内局在を併せて検討する。

(2) SH3P2-hnRNP-Kによる遺伝子発現調節メカニズム解明

図3に示すようなイントロンを挟むプライマー[図中(A)、(B)]を用いたRT-PCR法によって、RNAスプライシングに及ぼす影響を検討する。なお、イントロンを挟まないプライマーでの転写量を確認することで、転写、

あるいはスプライシングのいずれに対する影響かを特定する。解析には、GFPを発現させたコントロール、及び野生型 GFP-SH3P2 および GFP-SH3P2^{S202A} 変異体 (RSK によるリン酸化部位の変異体) を恒常的に発現させた HT-1080 細胞株を用いる。これにより、SH3P2 によってスプライシング調節を受ける遺伝子の同定を進める。具体的には、ERK 経路のによって発現が調節される *MMPs*、*Osteopontin*、*CD44*、*Ezrin* 等に注目しながら、その RNA スプライシング変化を比較検討する。

(3) SH3P2/Myosin1E 結合分子の同定

SH3P2 および Myosin1E について、新たな結合タンパク質を同定する。内在性タンパク質、あるいはタグ付きタンパク質の過剰発現系における免疫共沈実験、また GST 融合組換えタンパク質を用いた GST pull down assay により、結合タンパク質を捕捉後、SDS-PAGE にて分離し、ゲルを染色後、目的のバンドを切り出し、質量分析法によって、結合タンパク質の特定を進める。

4. 研究成果

(1) SH3P2 と hnRNP-K の相互作用

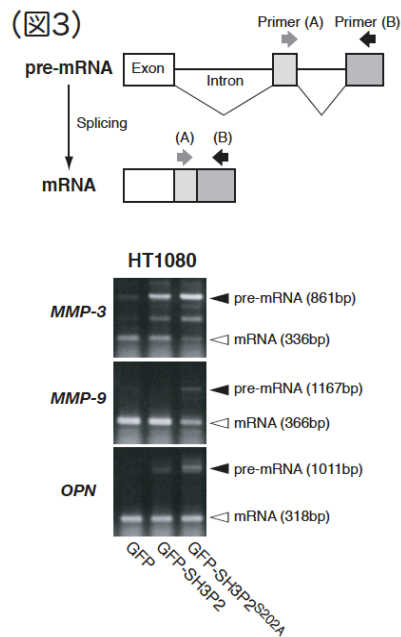
免疫共沈法によって内在性 hnRNP-K、あるいは GFP-hnRNP-K と SH3P2 の結合を確認したところ、わずかではあるものの相互作用が確認された。しかし、この相互作用は血清等の細胞外刺激、あるいは各種リン酸化酵素阻害剤によっても有意な変動が認められなかった。また、hnRNP-K の細胞内局在を検討したところ、その大部分は核内に存在しており、血清等の細胞外刺激、各種リン酸化酵素阻害剤処理、あるいは SH3P2 の過剰発現/発現抑制によっても有意な局在変化は認められなかった。なお、SH3P2 に関しても刺激依存的な細胞内局在変化は観察されなかった。

これらの結果より、SH3P2 と hnRNP-K の結合が極めて微弱、あるいは一過性である可能性、また何らかの分子を介して間接的に結合している可能性が考えられた。この点に関しては、現在解析中である。

(2) SH3P2 による遺伝子発現調節メカニズム

SH3P2、あるいは SH3P2 非リン酸化変異体を過剰発現させた HT-1080 細胞を用いて、*Matrix metalloproteinase (MMP)*-2/-3/-9-14、*Osteopontin*、*CD44*、*Ezrin* の RNA スプライシ

ング変化を比較検討した。その結果、親株の細胞と比較して SH3P2 過剰発現させた HT-1080 細胞では、*MMP-3*、*MMP-9*、及び *Osteopontin (OPN)* のスプライシングが抑制されること、特に SH3P2 非リン酸化変異体を発現させた細胞ではその抑制効果がより高いこと [図3 中黒矢頭 (pre-mRNA) が増加する]、一方、*MMP-2*、*CD44*、及び *Ezrin* のそれには影響が認められないことが明らかとなった。



(3) Myosin1E 結合分子の同定

内在性 Myosin1E の免疫を行い、質量分析法を用いて結合タンパク質の同定を進めたところ、分子シャペロンである UNC45 および Hsp90 を見いだした。UNC45 と Hsp90 は複合体を形成して 2 型ミオシンに対する分子シャペロンとして機能すること、それにより 2 型ミオシンの安定性やアクチン繊維への結合調節に関与することが報告されている。

そこで、RNAi 法によって UNC45 の発現を抑制した条件下、あるいは Hsp90 特定の阻害剤である 17-AAG で処理した条件下において、Myosin1E の発現変動を解析したところ、タンパク質の発現量に関しては特に有意な変動は認められなかった。しかし、同条件下にて Myosin1E の細胞内局在を観察したところ、Myosin1E が細胞の移動先端にとどまる傾向がみとめられ、そのような細胞では運動能が阻害されることが明らかとなった。

すなわち、UNC45-Hsp90 は Myosin1E の細胞内局在を制御を調節しており、それが細胞運動の制御に重要な役割を果たす可能性が示唆さ

れた。

また、GST 融合 Myosin1E (SH3 ドメイン) を用いた GST pull down assay/質量分析法により、Myosin1E の SH3 ドメインにはカベオラ (細胞膜上に存在するコレステロールに富んだ微小陥入構造) 形成に関与する Caveolin1-Cavin 複合体が結合することを見いだした。Caveolin1 に関しては、その発現が細胞運動と密接に関連すること、また Caveolin1-Cavin 複合体によって形成されるカベオラには細胞運動に関連する多くの分子が集積することなどが報告されていることから、現在、SH3P2-Myosin1E がカベオラ形成に及ぼす影響に焦点を当てて解析を進めている。

本研究では、新規細胞運動調節因子である SH3P2 の機能解析を目的として、その結合タンパク質である hnRNP-K と Myosin1E に焦点を当てて解析を進めた。その結果、SH3P2 は hnRNP-K による MMP-3/-9 等のスプライシング調節を介して、また Myosin1E によるカベオラ形成を介して細胞運動を制御する可能性を示す重要な知見を得ることができた。

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6件)

- (1) Sakamoto, T., Ozaki, K., Fujio, K., Kajikawa, S., Uesato, S., Watanabe, K., Tanimura, S., Koji, K., Kohno, M. Blockade of the ERK pathway enhances the therapeutic efficacy of the histone deacetylase inhibitor MS-275 in human tumor xenograft models. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2013, in press. 査読有 doi:pii:S0006-291X(13)00406-3. 10.1016/j.bbrc.2013.03.009.
- (2) Waheed, F., Dan, Q., Amoozadeh, Y., Zhang, Y., Tanimura, S., Speight, P., Kapus, A., Szász, K. Central role of the exchange factor GEF-H1 in TNF- α -induced sequential activation of Rac, ADAM17/TACE, and RhoA in tubular epithelial cells. *Mol. Biol. Cell.*, 2013, 24, 1068-1082. 査読有 doi: 10.1091/mbc.E12-09-0661. Epub 2013 Feb 6.
- (3) Matsuse, M., Mitsutake, N., Tanimura, S., Ogi, T., Nishihara, E., Hirokawa, M., Fuziwara, CS., Saenko, VA., Suzuki, K., Miyauchi, A., Yamashita, S. Functional characterization of the novel BRAF complex mutation, BRAF^(V600delinsYM), identified in papillary

thyroid carcinoma. *Int. J. Cancer*, 2013, 132, 738-743. 査読有

doi: 10.1002/ijc.27709. Epub 2012 Jul 21.

- (4) Kawabata, T., Tanimura, S., Asai, K., Kawasaki, R., Matsumaru, Y., Kohno, M. Up-regulation of pro-apoptotic protein Bim and down-regulation of anti-apoptotic protein Mcl-1 cooperatively mediate enhanced tumor cell death induced by the combination of ERK kinase (MEK) inhibitor and microtubule inhibitor. *J. Biol. Chem.*, 2012, 287, 10289-10300. 査読有 doi: 10.1074/jbc.M111.319426. Epub 2012 Jan 23.
 - (5) Kawaratani, Y., Harada, T., Hirata, Y., Nagaoka, Y., Tanimura, S., Shibano, M., Taniguchi, M., Yasuda, M., Baba, K., Uesato, S. New microtubule polymerization inhibitors comprising a nitrooxymethylphenyl group. *Bioorg. Med. Chem.*, 2011, 19, 3995-4003. 査読有 doi: 10.1016/j.bmc.2011.05.031. Epub 2011 May 23.
 - (6) Kohno, M., Tanimura, S., Ozaki, K. Targeting the extracellular signal-regulated kinase pathway in cancer therapy. *Biol. Pharm. Bull.*, 2011, 34, 1781-1784. 査読無 PMID: 22130230
- [学会発表] (計6件)
- (1) 谷村進、Myosin1E の細胞運動亢進作用は UNC45-Hsp90 複合体による細胞内局在制御によって調節される、第 85 回 日本生化学会大会、平成 24 年 12 月 15 日、マリンメッセ福岡
 - (2) 平田弦也、UNC45 による Myosin1E の細胞内局在制御、第 29 回 日本薬学会九州支部大会、平成 24 年 12 月 9 日、熊本大学薬学部
 - (3) 中原康子、Myosin1E によるカベオラ形成制御と細胞運動、第 29 回 日本薬学会九州支部大会、平成 24 年 12 月 9 日、熊本大学薬学部
 - (4) 谷村進、MEK and microtubule inhibitors together kill tumor cells through up-regulation of Bim and down-regulation of Mcl-1. 第 71 回 日本癌学会学術大会、平成 24 年 9 月 20 日、ロイトン札幌

- (5) 森田和幹、Myosin1E による細胞運動制御の分子メカニズム、第 28 回 日本薬学会九州支部大会、平成 23 年 12 月 10 日、福岡大学
- (6) 谷村進、Myosin1E enhances cell motility via the induction of filopodia formation: essential role of phosphorylation on Ser736. 第 70 回 日本癌学会学術大会、平成 23 年 10 月 5 日、名古屋国際会議場

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷村 進 (TANIMURA SUSUMU)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教
研究者番号：90343342

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし