

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 5月20日現在

機関番号：34438

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2013

課題番号：23790109

研究課題名（和文）新規な細胞運動促進因子 ZF21 を標的とした実験的癌浸潤抑制方法の確立

研究課題名（英文）Development of the experimental method to inhibit the tumor invasion by targeting a cell migration factor, ZF21 protein

研究代表者

長野 真 (NAGANO MAKOTO)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号：50572715

研究成果の概要（和文）：ZF21 は細胞-細胞外基質間に形成される接着構造である細胞接着斑の分解を促進することで、がん細胞の運動・転移を促進する。本研究の成果として、ZF21 の N 末端側部分断片を癌細胞内に過剰に発現させることで、細胞運動を促進する FAK と ZF21 の相互作用が抑制され、癌細胞の運動を阻害できることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：ZF21 protein promotes the cellular migration and tumor invasion via promoting the turnover of the adhesion structures at the contact sites between cell and extracellular matrix through interacting with focal adhesion kinase (FAK). In this study, I elucidated that the overexpression of the N-terminal fragment of ZF21 protein, which includes the FAK-interacting region, suppresses the tumor cell migration via inhibition of the interaction between ZF21 and FAK.

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	2,500,000	750,000	3,250,000

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：細胞生物学、癌細胞の浸潤抑制

1. 研究開始当初の背景

我々は 2010 年に、細胞運動を促進する新たな因子として ZF21 を報告した (Nagano M., *et al.*, JBC, 2010)。ZF21 は、細胞-細胞外基質間に形成される接着複合体である、細胞接着斑の分解を促進することで細胞運動を促進する。ZF21 は、細胞接着斑の中心的な制御分子の一つである focal adhesion kinase (FAK) や細胞内プロテアーゼである m-Calpain、微小管構成因子である b-Tubulin、チロシン脱リン酸化酵素 SHP-2 などと結合するが、特に FAK の脱リン酸化を介して細胞接着斑の分解を誘導することが示唆されていた。

生体内における ZF21 の生理的および病理

的な働きは明らかではなかったが、転移性大腸癌細胞での ZF21 の発現上昇が報告されていた (Saha S., *et al.*, Science, 2001)。また我々は研究開始当初、癌細胞のマウス肺転移モデルを用いた解析から、*in vivo* において ZF21 が肺転移の初期段階で促進的に働くことを見出していた。以上の知見から ZF21 は、癌浸潤・転移の分子標的治療の対象となる可能性を有していると考えられた。

2. 研究の目的

本研究課題では、ZF21 およびその周辺分子を標的とした癌治療法の可能性を探るために、ZF21 の機能抑制による実験的癌浸潤抑制手法の確立を目的とした。特に本研究で

は、ZF21 が、FAK や m-Calpain、b-Tubulin、SHP-2 などとのタンパク質間相互作用を介して癌細胞の運動性を亢進させていると考えられたことから、ZF21 とその相互作用分子間に形成される結合を阻害することによって、癌浸潤を抑制する方法を確立することとした。

一方で、ZF21 が細胞内でどのような制御を受けているかについては不明な点が多かった。そこで本研究では、特に ZF21 の 229 番目チロシン残基がリン酸化されることを示唆する先行研究の実験データに基づいて、このリン酸化の細胞運動への影響を解析することとした。これにより、ZF21 の細胞運動促進作用の発現におけるリン酸化制御の存在を明らかにすることで、ZF21 の機能を抑制するための新たな手法の確立へと応用することを試みた。

本申請課題では、これらの研究を進め、ZF21 を標的とした実験的な癌浸潤抑制手法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ZF21 の機能抑制による細胞運動抑制手法の確立。

① ZF21-FAK 間の結合阻害手法の確立

本検討項目では、(i) ZF21 の機能欠失変異体、(ii) ZF21 のアミノ酸配列を分割して合成した ZF21 断片化ペプチド、をそれぞれ用いて、ZF21 と相互作用分子間の結合阻害による細胞運動の抑制を検討した。研究開始時は、細胞運動を抑制する機能欠失変異体あるいは同断片化ペプチドを同定後に、その標的分子のスクリーニングを行う予定であったが、研究の進行の効率化のために、ZF21 の機能的相互作用分子としてすでに見出していた Focal Adhesion Kinase (FAK) と ZF21 の相互作用を阻害する機能欠失変異体あるいは断片化ペプチドのスクリーニングに焦点を絞って解析を進めた。

ZF21-FAK 間の結合阻害の解析方法として、GST pull down 法とウエスタンブロッティングを用いた。

(i) では、ZF21 を大腸菌 BL21 (DE3) pLysS 内に GST 標識して発現させ、グルタチオンセファロース 4B で精製した。また、ZF21 の機能欠失変異体として、FAK 結合性は保持しているものの、細胞運動の促進作用は示さない ZF21N (ZF21 の 1-105 アミノ酸断片) を、6xHis 標識して同大腸菌内に発現させ、Ni-NTA resin (Qiagen) で精製した。続いて、GST-ZF21 を結合させたグルタチオンセファロース 4B とヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞の抽出液を混合し、GST-ZF21 と抽出液中の FAK が結合する条件下で、6xHis-ZF21N 添加による結合への影響を解析した。

(ii) では、ZF21 のアミノ酸配列を 25 アミノ酸ずつに分割して合成した ZF21 由来合成ペプチドライブラリーを構築し、(i) と同様に GST-ZF21 と FAK 間の結合への影響を解析した。

② FAK 脱リン酸化への影響解析

ZF21 は微小管依存的に FAK の脱リン酸化を促進することを報告している。そこで本研究では、ZF21 の機能抑制の指標として、FAK の脱リン酸化が抑制されているかを解析した。解析方法は、培養細胞を微小管重合阻害剤であるノコダゾールで処理し、一定時間後にノコダゾールを含まない培養液に交換し、微小管形成に伴う FAK の脱リン酸化を誘導した。経時的に細胞抽出液を調製し、FAK のリン酸化レベルの変化を、抗 FAK-pTyr397 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した。

③ 細胞運動性の解析

本検討項目では、細胞運動性を解析する手法として一般的な、transwell migration assay 法を用いた。

(2) ZF21-Tyr229 リン酸化の細胞運動への影響解析。

ZF21 の発現を抑制した HT1080 細胞に、レンチウイルスベクターを用いて野生型の ZF21 (ZF21-WT) または 229 番目のチロシンをフェニルアラニンに置換した ZF21 (ZF21-Y229F) をそれぞれ安定的に発現させ、細胞運動性を比較解析した。

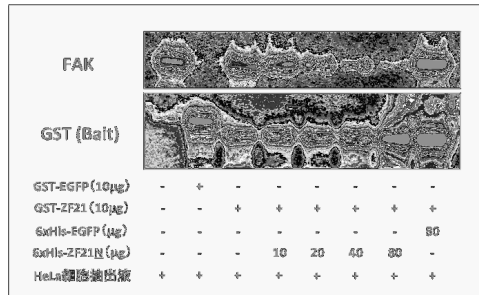
4. 研究成果

(1) ZF21 の機能抑制による細胞運動抑制手法の確立。

ZF21 は全長 234 アミノ酸(aa) で構成され、41-105aa 部分で FYVE ドメイン、106-234aa 部分で PH-like ドメインを形成している。ZF21 は FYVE ドメイン部分を介して FAK に結合するが、この部分を含む N 末端側 1-105aa 部分だけでは細胞運動を促進できない。このことから、がん細胞内に ZF21 の N 末端側 1-105aa 部分 (以下、ZF21N) を過剰発現させることで、ZF21-FAK 相互作用の阻害が可能であると考えられた。

このような仮定に基づいて、ZF21-FAK 相互作用を ZF21N で抑制できるかを最初に検討した。本検討では、(i) GST 標識 ZF21、(ii) 6xHis 標識 ZF21N を大腸菌リコンビナントタンパク質として調製し、GST-ZF21 と FAK の結合を、6xHis-ZF21N で阻害できるかを検討した。まず、既報のとおり、GST-ZF21 は細胞可溶性画分中の FAK と結合することが確認された。一方で、6xHis-ZF21N 存在下では、同タンパク質の濃度依存的に、GST-ZF21 と FAK の結合量の低下が認められた。従って、ZF21N によ

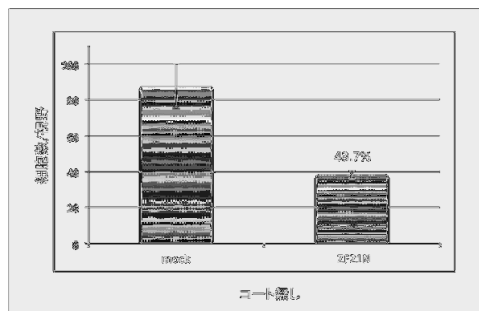
て ZF21-FAK の複合体形成を抑制できること



が明らかとなった (図 1)。

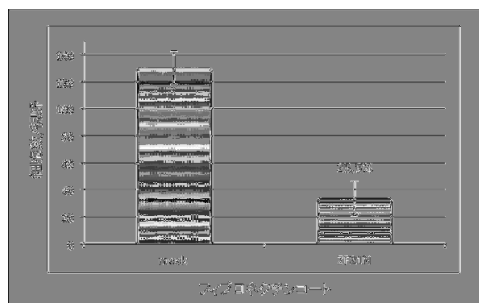
【図 1】 ZF21N は、濃度依存的に GST-ZF21 と FAK の結合を阻害した。

続いて、ZF21N の過剰発現による細胞運動への影響を解析した。蛍光タンパク質の m1Venus で標識した ZF21N を安定的に過剰発現させたヒト線維肉腫由来 HT1080 細胞 (ZF21N 細胞) と、同タンパク質を発現させていない細胞 (mock 細胞) の運動性を transwell migration assay により比較した。その結果、ZF21N 細胞は mock 細胞と比較して、細胞運動性が 43.7%まで抑制されていることが明らかとなった (図 2)。



【図 2】 ZF21N 過剰発現によって細胞運動が抑制された。

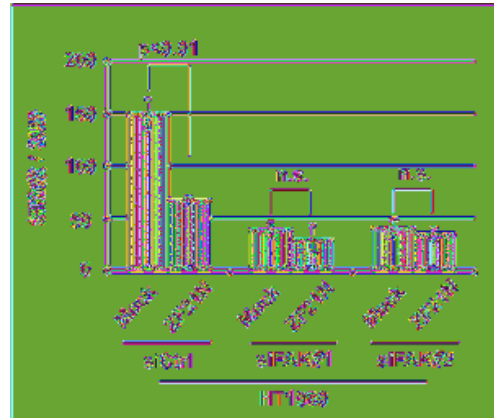
さらに、transwell 内にフィブロネクチンをコートし、細胞-細胞外基質間接着性が高い条件下で細胞運動性を比較した結果、運動性がさらに低下し、25.9%にまで抑制されることが明らかとなった (図 3)。



【図 3】 ZF21N 過剰発現による細胞運動抑制は細胞-細胞外基質間接着性が高い条件下で

より顕著であった。

次に、ZF21N 細胞における細胞運動性の低下が、ZF21-FAK 間の相互作用の阻害によるものかを明らかにするための検討を行った。解析には、mock および ZF21N 細胞において、それぞれ siRNA による FAK の発現抑制をかけ、ZF21N 発現による細胞運動性への影響を解析した。その結果、FAK の発現を抑制した条件下では、ZF21N の発現による細胞運動性の低

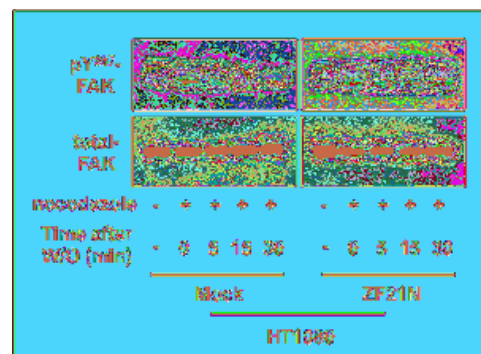


下が認められなくなった (図 4)。

【図 4】 ZF21N は、FAK の発現下でのみ細胞運動を抑制した。

従って ZsZF21N は、FAK 依存的な細胞運動を抑制していることが明らかとなり、その細胞運動の抑制機構は、ZF21-FAK 間相互作用の阻害によるものであることが示唆された。

前述のように ZF21 は、微小管形成時に誘導される FAK の脱リン酸化を促進する働きを示す。そこで次に、ZF21N がこの FAK 脱リン酸化に対して影響するかを解析することで、ZF21N が ZF21-FAK 間での機能的な相互作用を阻害するかを明らかにすることとした。研究の方法の項に記載した方法に従って、mock および ZF21N 細胞における FAK 脱リン酸化の程度を、ウエスタンブロッティングで解析した (図 5)。



【図 5】 ZF21N 細胞では、FAK の微小管形成依存的な脱リン酸化が抑制されていた。

従って ZF21N は、ZF21 が制御する微小管依存性の FAK 脱リン酸化を抑制することが示唆され、ZF21-FAK 間の機能的相互作用を抑制していることが示唆された。

以上より、ZF21 の N 末端側 1-105 アミノ酸領域からなる ZF21 フラグメントタンパク質を癌細胞内に過剰発現させることで、ZF21 と FAK 間の相互作用を抑制し、これにより細胞運動を阻害できることが明らかとなった。

本研究課題ではさらに、ZF21 のアミノ酸配列を 25 アミノ酸ずつに分割して合成したペプチドライブラリーも構築した。これを用いて、ZF21 と FAK 間の結合を阻害できるペプチドのスクリーニングも試みたが、同定には至っていない。この検討の過程で、ZF21 中の FAK 結合配列は、41-75 アミノ酸部分中に含まれることを見出したが、この配列を含む合成ペプチドである ZF21 (30-54)、ZF21 (50-74) ペプチドは、いずれも ZF21 と FAK の結合を阻害しなかった。今後はさらに、阻害に必要なアミノ酸配列の検討や阻害に用いるペプチド濃度の検討などを行う必要があると考えられる。

(2) ZF21-Tyr229 リン酸化の細胞運動への影響解析。

本課題の先行研究において、ZF21 の 229 番目のチロシン残基がリン酸化されうることを見出していた。そこで本課題では、このリン酸化サイトにアミノ酸置換を導入し、リン酸化されない ZF21 変異体を細胞に発現させた時の、細胞運動への影響も解析した。本研究では、内在性 ZF21 の発現を short hairpin RNA によって安定的に抑制した HT1080 細胞に、ZF21-WT または ZF21-Y229F 変異体を安定発現させた細胞を作製した。これを用いて細胞運動性を比較解析したが、両細胞間で顕著な運動性の違いは認められなかった。従って、ZF21 の 229 番目のチロシン残基は、ZF21 が示す細胞運動能の促進機能には関与しないことが示唆された。

本研究において行った ZF21 によるがん浸潤促進機構の解析過程では、ZF21 が浸潤突起と呼ばれる、癌細胞が形成する細胞接着斑に類似した細胞膜構造を介した細胞外基質分解を促進することも見出された。従って、癌細胞における ZF21 の機能阻害は、細胞運動に加えて、細胞外基質分解を介したがん浸潤の効果的な抑制手法となり得ると考えられる。本研究で得られた成果を基に、癌細胞における ZF21 の特異的な機能阻害手法を確立し、癌浸潤・転移機構の新たな理解や癌治療法の開発へとつながることが期待される。

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 3 件)

(1) Daisuke Hoshino, Makoto Nagano, *et al.*, (全 5 名の 2 番目), *The Phosphoinositide-Binding Protein ZF21 Regulates ECM Degradation by Invadopodia.*, *PLoS One*, 査読有り, 2013, 8(1)e50825: p1-8, doi:10.1371/journal.pone.0050825

(2) Makoto Nagano, *et al.*, (全 5 名の 1 番目), *Turnover of focal adhesions and cancer cell migration.*, *Int J Cell Biol.*, 査読有り, 2012, 2012:310616: p1-10, doi:10.1155/2012/310616

(3) Makoto Nagano, *et al.*, (全 16 名の 1 番目), *ZF21 protein, a regulator of the disassembly of focal adhesions and cancer metastasis contains a novel non-canonical pleckstrin homology domain.*, *J Biol Chem.*, 査読有り, 2011, 286(36): p31598-31609, doi:10.1074/jbc.M110.199430

[学会発表] (計 6 件)

(1) 長野 真, 細胞運動促進分子 ZF21 の N 末端側断片は細胞運動を抑制する, 第 85 回日本生化学会大会, 2012 年 12 月 14 日~16 日, 福岡

(2) 長野 真, The role of the interaction of ZF21 with Nrfs in cell migration, 第 71 回日本癌学会学術総会, 2012 年 9 月 21 日~24 日, 札幌

(3) 長野 真, ZF21 タンパク質による細胞運動促進における活性酸素シグナルの関与, 日本薬学会第 132 回年会, 2012 年 3 月 29 日, 札幌

(4) 長野 真, 細胞運動を促進する新規分子 ZF21 を標的としたがん転移抑制の可能性, 第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 2011 年 10 月 22 日, 神戸

(5) 長野 真, 細胞接着斑制御に関与する ZF21 タンパク質はがん細胞の浸潤を促進する., 第 70 回日本癌学会学術総会, 2011 年 10 月 5 日, 名古屋

(6) 長野 真, 細胞運動を促進する ZF21 の C 末端側領域は新規な Pleckstrin homology 様ドメインを形成する., 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 23 日, 京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長野 真 (NAGANO MAKOTO)

摂南大学・薬学部・助教

研究者番号: 50572715