

## 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 25 年 6 月 7 日現在

機関番号：31201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890198

研究課題名（和文）悪性黒色腫浸潤転移能に係る small G 関連蛋白の SUMO 化の修飾機構

研究課題名（英文）SUMOylation of small G proteins in malignant melanomas

研究代表者

角田 加奈子 (TSUNODA KANAKO)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：10611030

研究成果の概要（和文）：NACCI および small G 蛋白である RAC1 の SUMO 化修飾について検討し、浸潤、運動能との関連を解析した。NACCI は K167 で SUMO 化を受けたが RAC1 は SUMO 化修飾を受けなかった。NACCI の発現抑制により悪性黒色腫の運動・浸潤能は抑制されたが、この機構は cortactin のアセチル化が NACCI の抑制のため HDAC6 の機能不全で誘導されたものであった。NACCI-HDAC6 の結合を抑制すると考えられる CYLD の不活化は RAC1 のリン酸化を抑制し細胞の運動能に影響を与えた。NACCI を巡る複数の分子機構が悪性黒色腫の浸潤・転移能に影響を与えている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：NACCI is a member of pluripotent transcription factor, and associates with malignant phenotypes of tumor cells. The present study investigated that the molecular mechanisms of NACCI in malignant melanomas. We represented that NACCI directly bound to cortactin, and deacetylated cortactin. This deacetylation introduced acceleration of motility and invasion of tumor cells. The SUMOylation occurred at NACCI-K167 site, but did not in RAC1. CYLD1 induced-RAC1 activation has been also demonstrated in melanoma cells. These results suggested that NACCI related proteins may regulated motility and invasion activities of melanoma cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：皮膚科学

キーワード：悪性黒色腫, SUMO, NACCI, RAC1, Small G 蛋白, HDAC6

## 1. 研究開始当初の背景

悪性黒色腫は早期に転移を生じやすく、遠隔転移をきたした場合、放射線療法や化学療法に抵抗性で、予後は極めて不良である。悪性黒色腫の高い増殖、浸潤／転移能を支える

分子機構を解明することは、その治療戦略を考案する上において極めて重要なことである。しかし、腫瘍細胞の持つ増殖と転移能は表裏一体の事象であり、分裂中の運動能は低く、逆に盛んに運動している細胞の分裂能は低い。

このことは、腫瘍細胞の持つ epithelial-mesenchymal transition (EMT) および mesenchymal-epithelial transition (MET) 現象に深く関係していると考えられる。近年この現象に、small G (RAS-RAF-MEK/Rho family) 関連蛋白質の SUMO 化修飾が影響することが明らかにされた。

Rho family である RAC1 は SUMO 化修飾を受けることで運動・浸潤先進部のラメリポディア、フィロポディアに集積し、細胞運動能を亢進させる。

一方、活性型の RAS 蛋白質は、MEK の SUMO E3 ligase である MEK kinase (MEKK) の作用を抑制し、MAPK (Raf-MEK-ERK) の活性化を亢進させる。この二つの知見は、small G 関連蛋白質に生じる SUMO 化修飾が、転移と増殖のスイッチング現象を軽妙に調節している可能性を示唆している。しかし、これらの蛋白質が正しく機能するためには、その細胞内局在は極めて重要な要因であり、その分子機構は未だ明らかにされていない。

我々は、nucleus accumbens associated 1 (NAC1) が、SUMO 化修飾を受けた small 関連蛋白質の局在にアダプター蛋白として働き、重要な役割を担っていると推測している。NAC1 は細胞質内において Rho ファミリー G 蛋白である RAC1 と SUMO-SIM の結合インターフェースを介して相互作用をしている可能性がある。一方、MEK, MEKK にも同様のインターフェースが存在し、NAC1 は RAC1 ばかりでなく RAS family の下流で SUMO 化修飾による増殖能の制御にも関与している可能性がある。悪性黒色腫の持つ高い浸潤・転移能の背景には NAC1 の過剰発現が原因となるという作業仮説を立てた。

## 2. 研究の目的

本研究は、悪性黒色腫の増殖・転移能の獲得に際して生じる small G 蛋白 (RAS/Rho family) およびその関連蛋白質の SUMO 化修飾と、その分子機能における NAC1 (nucleus accumbens associated 1) 蛋白の役割を細胞生物学的に明らかにすることを目的として展開した。

さらに、この分子機構を基盤とした新規抗がん剤のスクリーニングシステムの構築も併せて研究した。

## 3. 研究の方法

(1) STEP1: NAC1 と RAC1 の相互作用および浸潤転移能との関連解析。  
NAC1 siRNA knockdown による悪性黒色腫細胞株におけるアクチン細胞骨格関連 Rho ファミリー G 蛋白質の発現解析。

① 悪性黒色腫細胞株として HMV-I, HMV-II, SK-MEL-28, CRL1579, MM-RU, PM-WK G361 および正常表皮メラニン細胞 (NHEM-M, NHEM-D) を用いた。

② 標的分子の mRNA/タンパク質の発現を real-time PCR, western blot で解析し、評価する。細胞内の局在については confocal microscopy で確認する。

③ NAC1 と RAC1 の相互作用についての解析: NAC1 siRNA knockdown による Rac1 の SUMO 化状態の変化を免疫沈降法、あるいは小麦ベクターを用いた pull-down assay で解析する。各標的分子について epitope-tag 付きの mammalian expression (invitrogen) および小麦発現ベクター (Promega) を作製し、SUMO 化 site については K/R mutant, SIM 配列については VXVV/VXKK の変異体を作製した。各々の野生型および変異体について co-transfection し、免疫沈降法あるいは小麦発現ベクターを用いた pull-down assay で結合を解析する。各々の野生型および変異型について SUMO 化状態を評価する。相互作用が認められた場合、共局在を GFP あるいは cherry 融合蛋白発現ベクターを co-transfection し confocal microscopy で確認する。

④ 腫瘍細胞の運動能・浸潤能の評価には scratch wound healing assay あるいは Matrigel invasion assay で解析する。

(2) STEP2: RAC1 SUMO 化サイト野生型および変異体の mammalian expression vector の作成。

RAC1 と NAC1 の相互作用が認められた場合、その SUMO 化修飾が両者の結合に与える影響を検討する。また、両者の相互作用が認められた時には cherry-NAC1, GFP-RAC1 の double transfectant を作成し、HCA (High content analysis) システム (In Cell Analyzer 2000, GE) を用う。

(3) NAC1 と相互作用の期待される CYLD 分子に係る解析

NAC1 と相互作用する HDAC6 の機能阻害効果を有する CYLD の発現、細胞運動に与える影響を scratch wound healing assay あるいは Matrigel invasion assay で解析する。

## 4. 研究成果

### (1) NAC1 の SUMO 化修飾

NAC1 は 3 カ所の SUMOylation site の候補の内、K167 で SUMO 化修飾を受けることが明らかとなった (図 1)。

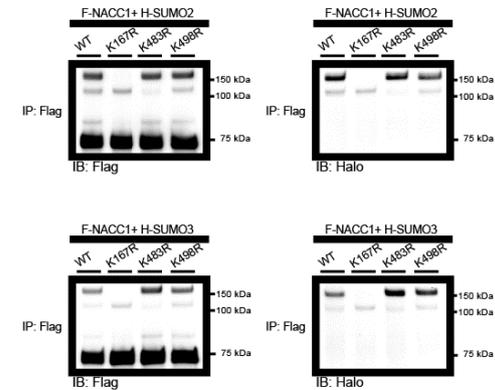
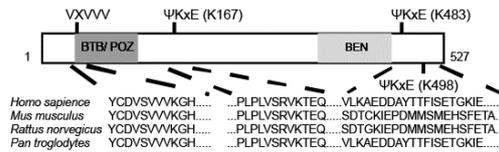


図 1  
SUMO 化修飾を受けた NACC1 は RAC1 との直接結合は認められずリン酸化の誘導も行われなかった。しかし、NACC1 の発現抑制によって悪性黒色腫の運動・浸潤能は抑制された。

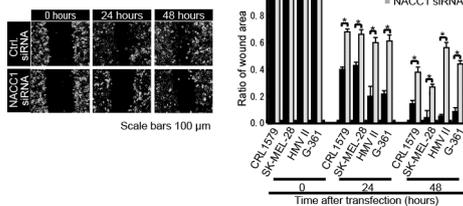


図 2  
この運動浸潤能の低下は、NACC1 が HDAC6 および cortactin と直接結合し (図 3) これが解除されることによるものであった。

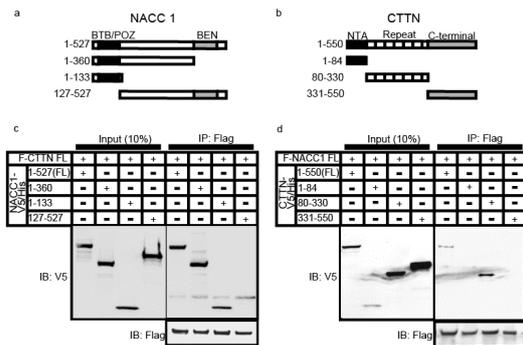


図 3  
結果として NACC1 の発現抑制は cortactin の脱アセチル化作用を抑制し、focal adhesion FA の形成、F-actin filament の stabilization を誘導することで細胞運動・浸潤能の低下を誘導したものである (図 4)。本研究成果は国内外に於いて高く評価され NACC1 を標的とした新規転移制御法の解析が期待される。

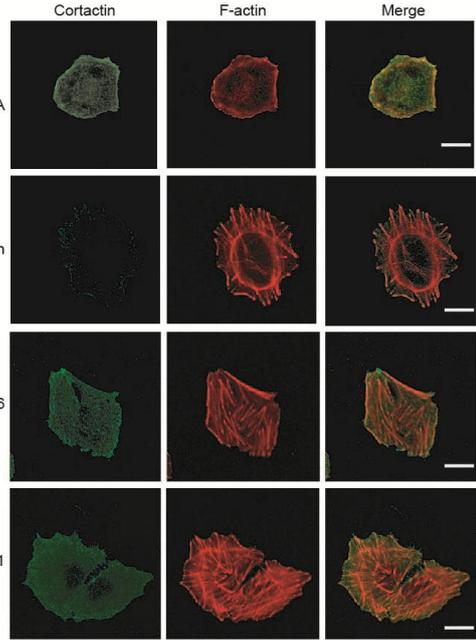


図 4  
一方、RAC1 自体の SUMO 化修飾も確認できなかった。

(2) 悪性黒色腫における CYLD の RAC1 活性に与える影響

CYLD の発現は NACC1 と HDAC6 の直接結合を阻害し、tubulin のアセチル化に影響を与えると同時に、RAC1 のリン酸化を抑制した。このことは、CYLD のペプチドあるいは mimic な化合物が悪性黒色腫の浸潤転移能を抑制する新規治療分子となり得る可能性が示された。

(3) HCA システムによる阻害薬のスクリーニング

ケミカルバイオロジー的解析による阻害薬のスクリーニングに係る研究を展開する予定であったが、RAC1 と NACC1 の相互作用が確認されず、加えて RAC1 化修飾が認められないことより、計画を断念した。

(4) バイオマーカーとしての NACC1 関連分子の意義

免疫染色により、NACC1 関連タンパク質の発現を検討し、NACC1 以外にも cortactin の過剰発現が予後と密接な関連を認めた (図 5)。今後 NACC1 および cortactin の共染色は悪性黒色腫のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

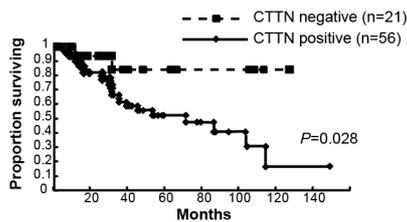


図 5

## 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 4 件)

- ① Ishikawa Y, Tsunoda K, Shibazaki M, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T, Maesawa C. Downregulation of cylindromatosis gene, CYLD, confers a growth advantage on malignant melanoma cells while negatively regulating their migration activity. *Int J Oncol.* 2012 41(1):53-60. Doi: 10.3892/ijo.2012.1424. (査読有り)
- ② Sakurai E, Maesawa C, Shibazaki M, Yasuhira S, Oikawa H, Sato M, Tsunoda K, Ishikawa Y, Watanabe A, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T. Downregulation of microRNA-211 is involved in expression of preferentially expressed antigen of melanoma in melanoma cells. *Int J Oncol.* 2011 39(3):665-72. Doi: 10.3892/ijo.2011.1084. (査読有り)
- ③ Tsunoda K, Oikawa H, Tada H, Tatemichi Y, Muraoka S, Miura S, Shibazaki M, Maeda F, Takahashi K, Akasaka T, Masuda T, Maesawa C. Nucleus accumbens-associated 1 contributes to cortactin deacetylation and augments the migration of melanoma cells. *J Invest Dermatol.* 2011 131(8):1710-9. Doi:10.1038/jid.2011.110. (査読有り)
- ④ 角田 加奈子, 及川 浩樹. 悪性黒色腫における nucleus accumbens associated 1 の発現に関する免疫組織学的研究. 岩手医学雑誌(0021-3284)63 巻 1 号 Page23-32(2011.04) (査読有り)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 前沢 千早, 多田 広志, 角田 加奈子, 柴崎 晶彦, 安平 進士, 及川 弘樹, 菅野 公德, 石川 雄一, 増田 友之.

NACCI/HDAC6 脱アセチル化機構はアクチンおよび微小間依存性の腫瘍細胞の運動能に影響を与える (NACCI/HDAC6 deacetylation system accelerates tumor cell migration via an actin- and microtubule-dependent process) (英語). 第 70 回日本癌学会総会記事, 2011/10/3 ~5, 名古屋.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等: <http://miast.jp/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

角田加奈子 (TSUNODA KANAKO)  
岩手医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 23890198