

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440091

研究課題名(和文) 蛋白質キナーゼROCK アイソフォーム特異的活性型酵素検出法ならびに阻害剤の開発

研究課題名(英文) Protein kinases ROCK -Developments of isoform-specific inhibitors and a method to detect active ROCK isoforms

研究代表者

米田 敦子 (Yoneda, Atsuko)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：80590372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質キナーゼROCKには2つのアイソフォームが存在し、癌悪性化におけるそれらの特異的機能の解明が必須であった。本研究は、ROCK2特異的内在性阻害因子(CRMP2L)由来のペプチドを大腸癌細胞に単独で発現することにより癌細胞の遊走・浸潤能を抑制できること、GSK3によるCRMP2Lのリン酸化によってCRMP2LによるROCK依存的大腸癌細胞の移動/浸潤能の阻害が調節されることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Specific functions of two homologous protein kinases ROCK in tumor progression was needed to be revealed. This study found that a peptide derived from a ROCK2 specific endogenous inhibitor, CRMP2L, alone is capable of inhibiting cell migration and invasion of colon carcinoma cells, and that GSK3 phosphorylation of CRMP2L regulates inhibition of ROCK-dependent colon carcinoma cell migration/invasion by CRMP2L.

研究分野：細胞生物学

キーワード：蛋白質リン酸化酵素 ROCK がん 細胞骨格 細胞運動 細胞外マトリクス

1. 研究開始当初の背景

Ser/Thr リン酸化酵素 ROCK は、GTP-Rho の下流で機能する細胞骨格制御因子で、細胞の浸潤、増殖、分化などを調節し、循環器病、神経再生、癌転移、糖尿病など様々な疾患治療の標的候補分子である。ほ乳類には ROCK1 と ROCK2 の 2 種類が存在し、両アイソフォームに作用する阻害剤が日本で開発され、循環器病の治療に使われている。アイソフォーム特異的機能が、我々や他のグループによって細胞および動物レベルで見いだされ、循環器病、糖尿病でのアイソフォーム特異的機能が示唆されたが、癌悪性化については殆ど明らかになっていなかった。

癌の悪性化は、癌細胞の形質転換に加え、それを取り巻く癌微小環境によっても大きく影響される。癌微小環境は、線維芽細胞、免疫細胞、血管、これら細胞から放出された可溶性因子、細胞外マトリクス等から成り、癌細胞の上皮間葉転換、浸潤転移制御、転移先での生存や再増殖に影響する。ROCK は、癌細胞の転移能に加え、癌組織の細胞外マトリクス再構成に影響することが示唆されていた。循環器病では免疫細胞の浸潤、内皮細胞機能維持に関わるため、癌組織のこれら細胞種での ROCK の寄与が予想された。

2. 研究の目的

蛋白質キナーゼ ROCK は、癌悪性化への寄与が示唆されていたが、その機構は不明であった。ROCK には 2 つのアイソフォームが存在し、癌悪性化においてそれらの特異的病理学的機能の解明が必須であった。本研究は、我々の ROCK2 特異的内在性阻害因子 (CRMP 2 L) の発見から発想した、新規の細胞内 ROCK アイソフォーム活性検出法と阻害剤の開発、癌組織構成細胞での活性型 ROCK アイソフォームの検出及びアイソフォーム特異的阻害効果の解析を目的とした。

3. 研究の方法

(1) ROCK1 および ROCK2 触媒部位結合ペプチドの最小化と、活性型 ROCK アイソフォーム特異的阻害剤としての評価

我々が先に同定した内在性 ROCK2 阻害因子 Collapsin response mediator protein-2 long form (CRMP2L)由来の ROCK2 阻害フラグメントを最小化するため、より細分化した欠失変異体が大腸菌で発現させ、ビーズに結合させ、昆虫細胞で発現させた ROCK2 の酵素活性ドメインとの結合試験に用いた。また、動物細胞で発現できるよう緑色蛍光タンパク質との融合タンパク質として発現できるプラスミドを構築した。同様に ROCK1 阻害因子由来のペプチドを発現するため、動物細胞発現プラスミド、大腸菌発現プラスミドを構築した。得られた組み換えペプチドを活性評価用の培養細胞に発現あるいは添加し、表現型の変化を検証した。

(2) 癌組織を構成する細胞種における ROCK アイソフォーム特異的機能の解析

ROCK 触媒ドメインと(1)で得られたペプチドを癌細胞や線維芽細胞内に発現し、免疫蛍光染色法において、ペプチドの触媒部位への結合特異性を検討した。

ROCK 依存的な癌細胞の移動、浸潤能の測定、線維芽細胞の細胞外マトリクス形成能、移動能の測定を行った。癌細胞と線維芽細胞の共培養下で癌細胞の増殖生存に与える線維芽細胞の影響を評価した。

4. 研究成果

(1) ROCK1 および ROCK2 触媒部位結合ペプチドの最小化と、活性型 ROCK アイソフォーム特異的阻害剤としての評価

CRMP2L 由来の ROCK2 結合フラグメントを

短くした5種類のフラグメントをコードする cDNA を構築し、大腸菌で発現させた。これが結合したピーズと、ROCK2 触媒部位との結合試験により、ROCK2 触媒部位結合ペプチドをさらに短くすることに成功した。また、CRMP2 と ROCK2 の相互作用が、CRMP2 のリン酸化によって下方制御されること、そのリン酸化はリン脂質合成酵素 PI3-キナーゼの下流で働くタンパク質リン酸化酵素 GSK3 によっておこることを見いだした。

(2) 癌組織を構成する細胞種における ROCK アイソフォーム特異的機能の解析

ROCK2 結合フラグメントを大腸癌細胞に単独で発現することにより、ROCK 依存的な大腸癌細胞の遊走能、浸潤能を抑制できることを見出した。さらに、CRMP2 のリン酸化状態は ROCK2 との結合を制御するため、CRMP2 による ROCK 依存的な大腸癌細胞の移動能、浸潤能の阻害が調節されることを見いだした。ROCK1 結合ペプチドを線維芽細胞に発現することで、ROCK1 依存的なアクチン線維形成が阻害されることを示した。

癌組織を構成する細胞種の一つである線維芽細胞に着目し、細胞外マトリクス量の測定法を構築した。また、癌細胞との共培養下で癌細胞の増殖生存に与える線維芽細胞の影響を評価する系を構築した。構築した方法を用い、ROCK の上流因子を調節することで、癌細胞の増殖を阻害できることを示す結果を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Morgan-Fisher, M., Couchman, J.R., and Yoneda, A*. Phosphorylation and mRNA splicing of collapsin response mediator protein-2 determine inhibition of rho-associated protein kinase (ROCK) II function in carcinoma

cell migration and invasion. *J. Biol. Chem.* **288**, 31229-31240, 2013.

DOI: 10.1074/jbc.M113.505602.

*Corresponding author.

Yoneda A*. Fibronectin Matrix Assembly and Its Significant Role in Cancer Progression and Treatment. フィブロネクチンマトリクス形成とがんにおけるその重要性 *Trends Glycosci. Glycotechnol.* **27**, 89-98, 2015.

*Corresponding author. (Invited)

DOI: 10.4052/tigg.1421.1

Gomes, A.M., Sinkeviciute, D., Multhaupt, H.A.B., Yoneda, A. and Couchman, J.R. Syndecan Heparan Sulfate Proteoglycans: Regulation, Signaling and Impact on Tumor Biology. *Trends Glycosci. Glycotechnol.* Jul.4,2015. (Invited)

DOI:10.4052/tigg.1422.1

〔学会発表〕(計 6 件)

招待講演

1 Yoneda, A., Morgan-Fisher, M., Høye, A.M., Wewer, U.M., and Fukami, K. Fine regulation of common players in cancer cell migration and fibronectin matrix assembly. 第 65 回日本細胞生物学会大会 2013 年 6 月 19 - 21 日 名古屋

2 米田 敦子, Morgan-Fisher, M., Høye, A.M., Wewer, U.M., Couchman, J. R., 深見 希代子 細胞外マトリクスと細胞内アクチン骨格とのインテグリンを介した双方向クロストーク 第 4 5 回日本結合組織学会学術大会 第 60 回マトリクス研究会大会 合同学術大会 2013 年 6 月 28 - 29 日 和歌山

- 3 米田 敦子 プロテインキナーゼ ROCK
の活性制御による癌細胞の遊走と細胞外
マトリックス形成の阻害 第2回
MatriCell フォーラム 2014年9月6日
7日 東京

口頭発表

- 1 Yoneda, A., Morgan-Fisher, M., Fukami,
K., and Couchman, J. R. GSK3
Phosphorylation and mRNA Splicing of
Collapsin Response Mediator Protein-2
Control ROCK II-dependent Carcinoma
Cell Migration and Invasion. 9th
International Conference on
Proteoglycans and 10th Pan-Pacific
Connective Tissue Societies Symposium
Seoul, Korea, August 23-27, 2015.

ポスター発表

- 1 Morgan-Fisher, M., Couchman, J.R.,
Wewer, U.M., and Yoneda, A. Fine tuning
of ROCK-II function is facilitated by
modification of CRMP-2-mRNA splicing,
and phosphorylation by GSK-3. Cancer
Biology, BRIC 10-year anniversary
symposium, Copenhagen, Denmark, 22nd
-23rd Aug. 2013.
- 2 Yoneda, A., Morgan-Fisher, M.,
Couchman, J.R., and Fukami, K.
Phosphorylation and mRNA Splicing of
Collapsin Response Mediator Protein-2
Determine Inhibition of Rho-associated
Protein Kinase (ROCK) II Function in
Carcinoma Cell Migration and Invasion.
第67回 日本細胞生物学会大会 東京
2015年6月30日 7月2日

[その他]

ホームページ等

<http://toyaku-ls-genome.com/publications.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

米田 敦子 (YONEDA ATSUKO)

東京薬科大学 生命科学部 助教

研究者番号：80590372