

令和元年5月29日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08238

研究課題名(和文) Myosin1Eを核としたタンパク質複合体による細胞運動制御機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of Myosin1E complex-mediated cell motility

研究代表者

谷村 進 (TANIMURA, Susumu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・准教授

研究者番号：90343342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Myosin1Eを核としたタンパク質複合体による細胞運動制御の分子メカニズムの解明を目指した。その成果として、Myosin1Eに結合する分子SNX9(細胞膜の曲率を生成/認識する分子)とCavin3-Caveolin1複合体(カベオラ形成調節因子)を見出し、それらについてMyosin1Eとの結合様式と細胞伸展・運動に対する影響を明らかにした。また、SH3P2ノックアウト細胞、Myosin1Eノックアウト細胞、およびSH3P2発現誘導細胞を樹立して、SH3P2によるMyosin1E機能制御メカニズムを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞運動制御メカニズムの破綻はがん細胞の浸潤転移につながるが、その分子メカニズムについては依然として不明な点が多い。本研究によって、Myosin1Eタンパク質複合体を切り口とした新たな細胞運動制御の分子メカニズムが明らかとなった。本研究成果より、細胞運動制御メカニズムの一端が明らかになったことに加え、がんの浸潤転移を抑制する上で有効な標的分子の同定につながる可能性が予想され、がん転移抑制剤開発に新しい展開をもたらすことなどが期待される。

研究成果の概要(英文)：Dysregulation of cell motility response leads to cancer metastasis. We have previously shown that Myosin1E-SH3P2 complex regulates cell motility, however the molecular mechanisms of which still remains unknown. Here, we show that Myosin1E binds to SH3 domain of Sorting nexin9 (SNX9) through its proline-rich region within TH2 domain and to Cavin3-Caveolin1 complex through its SH3 domain. Myosin1E co-localizes with SNX9 and F-actin at the leading edge of migrating cells. siRNA-mediated knockdown of Myosin1E, SNX9, or Cavin3 inhibits cell motility. Overexpression of SH3P2 using doxycycline-inducible TetON system suppressed localization of Myosin1E to plasma membrane as well as cell motility. These results suggest that Myosin1E released from SH3P2 promotes cell motility via the interaction with SNX9 and Cavin3-Caveolin1 complex at plasma membrane.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞運動 ミオシン リン酸化

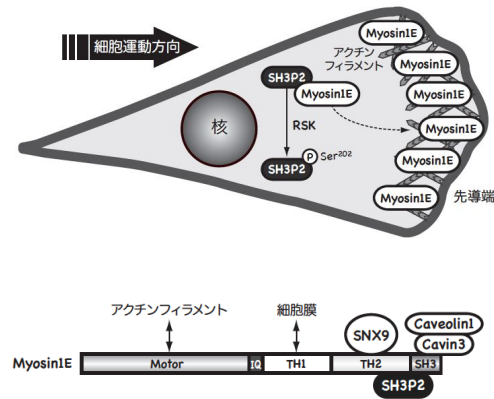
## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞運動は、細胞骨格、細胞接着および細胞内輸送の制御をはじめとした多彩で複雑な反応が、時空間的に緻密に統合されることで成り立つ細胞応答である。しかし、その制御機構の緻密さがゆえに、わずかな調節の不全であっても的確な制御が失われ、がん細胞の悪性化、すなわち浸潤転移能の獲得に繋がる。そのため、細胞運動を制御する分子メカニズムを明らかにすることは、「制がん」の観点からも極めて重要な課題である。

ERK-MAP キナーゼ経路 (ERK 経路) は、細胞運動の調節においても重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。この点に関して、これまでに我々は細胞運動を抑制する新規タンパク質 SH3P2 を同定し、さらに SH3P2 が 1 型 Myosin に属する Myosin1E と結合すること、また SH3P2 が ERK 経路依存的にリン酸化されると、SH3P2 と Myosin1E が解離することなどを見いだし、Myosin1E-SH3P2 複合体が、ERK 経路を介したリン酸化によって制御される新たな細胞運動調節機構であることを示した (右図上)。

1~18 型に分類される Myosin のなかで、1 型 Myosin は細胞膜と相互作用するとされる Tail Homology (TH) 1 領域を持つ。1 型 Myosin に属する Myosin1E は、TH1 領域に加えて TH2 領域と SH3 ドメインを有する点において特徴的である (右図下)。我々は、Myosin1E の TH2 領域に Sorting nexin 9 (SNX9) が結合する可能性、また SH3 ドメインにカベオラ形成調節因子である Cavin3-Caveolin1 複合体が結合する可能性を見いだした。SNX9 と Cavin3-Caveolin1 複合体は、いずれも細胞膜と相互作用することが知られている。よって、Myosin1E はこれらの分子と複合体を形成することで細胞膜の動態を調節して、細胞運動を誘導するのではないかと考えられた。



### 2. 研究の目的

これまでの知見を総合的に考慮し、「Myosin1E は SNX9 および Cavin3-Caveolin1 をエフェクターとし、細胞運動の先端端でそれらのエフェクター分子と結合する、あるいは先端端へそれらのエフェクター分子を輸送するのではないか。」、それによって、「Myosin1E は細胞膜ラフリング形成とエンドサイトーシスを介したカベオラの極性形成を誘導し、それが細胞運動の誘導につながるのではないか。」、また、「Myosin1E とエフェクター分子の結合は SH3P2 によって調節されるのではないか。」と考えた。

そこで、本研究課題では以下の解析を通して、Myosin1E を核としたタンパク質複合体による新たな細胞運動制御機構の詳細を分子レベルで明らかにすることを最終目的とした。

- (1) Myosin1E を核とした上記各分子の結合はどのようにして調節されるか。
- (2) Myosin1E と各分子の結合によってどのようにして細胞運動が調節されるか。

### 3. 研究の方法

本研究課題では、Myosin1E を核とした複合体に焦点をあて、その複合体形成調節の分子メカニズムと、複合体形成による細胞運動制御の分子メカニズム、およびその意義を明らかにすることを旨とし、免疫共沈法、細胞分画法、および間接免疫蛍光法等の手法を利用して解析を進めた。

#### (1) Myosin1E を核とした上記各分子の結合はどのようにして調節されるか。

SNX9 における Myosin1E 結合部位の特定

SNX9 は SH3 ドメイン、PX ドメイン、BAR ドメインといった機能ドメインを有する。そこで、SNX9 の各ドメイン欠失変異体を用いて Myosin1E との結合実験を行い、Myosin1E 結合部位の特定を試みた。

Myosin1E-SNX9 複合体および Myosin1E-Cavin3-Caveolin1 複合体の形成調節

SNX9 と Cavin3-Caveolin1 は、それぞれ Myosin1E の TH2 ドメインと SH3 ドメインに結合する。その一方で、SH3P2 は Myosin1E の TH2 と SH3 ドメインに結合し、血清刺激に伴って Myosin1E から解離することから、上記分子と Myosin1E の結合は SH3P2 によって調節されるのではないかと考えられた。そこで、血清刺激によって細胞運動を誘導した条件下、あるいは SH3P2 の過剰発現や発現抑制条件下において、Myosin1E に結合する SH3P2、SNX9、Cavin3-Caveolin1 の変動や、それらの細胞内局在の変動を解析した。

#### (2) Myosin1E と各分子の結合によってどのようにして細胞運動が調節されるか。

Myosin1E、SH3P2、SNX9、Cavin3 あるいは Caveolin1 の発現を抑制した細胞、および SH3P2 を過剰発現させた細胞、また SH3P2 ノックアウトマウスと野生型マウスの骨髄由来マクロファージについて、細胞接着・伸展と細胞運動等を比較検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) Myosin1E を核とした上記各分子の結合はどのようにして調節されるか。

###### SNX9 における Myosin1E 結合部位の特定

SNX9 の SH3 ドメイン欠失変異体を用いて Myosin1E との結合実験を行ったところ、SH3 ドメインを欠失させた変異体では、Myosin1E との結合が認められなくなった。また、Myosin1E の欠失変異体を用いた実験より、Myosin1E の TH2 ドメインが SNX9 との結合に必要であることが分かった。さらに、Myosin1E の TH2 ドメイン内のプロリンリッチ配列 (SH3 ドメインのリガンド) を変異させた際に、SNX9 との結合が大幅に減少した。また、Myosin1E の TH2 ドメインと SNX9 の SH3 ドメインは直接結合することが分かった。以上の結果より、SNX9 はその SH3 ドメインが Myosin1E の TH2 ドメイン内にあるプロリンリッチ配列に直接結合することが明らかとなった。

各分子の細胞内局在変化を解析した結果、SNX9 は血清刺激に応答して細胞運動の先端端に移行し、そこで Myosin1E とアクチンフィラメントと共局在することが分かった。また、細胞分画法によって、Myosin1E と SNX9 が血清刺激に伴って細胞膜へと移行すること、SNX9 の細胞膜への移行には SNX9 の SH3 ドメインが必要であることが明らかとなった。

###### Myosin1E-SNX9 複合体および Myosin1E-Cavin3-Caveolin1 複合体の形成調節

血清刺激に伴う細胞運動誘導時における Myosin1E 複合体の変動を検討した結果、免疫共沈や細胞分画法では、刺激に伴う Myosin1E-SNX9 複合体および Myosin1E-Cavin3-Caveolin1 複合体の変化をとらえることはできなかった。また、siRNA によって Myosin1E の発現を抑制した場合や、Myosin1E の TH2 ドメイン内にあるプロリンリッチ配列を置換した (SNX9 が結合しない) 変異体を発現させて場合にも、SNX9 の局在に大きな変化は認められなかった。よって、Myosin1E 複合体は局所的もしくは一過性に制御されているのではないかと考えられた。

Myosin1E はそのレギュレータである SH3P2 によって細胞内局在が調節されることを明らかにしていたが、SH3P2 ノックアウトマウス由来マクロファージを用いた解析によってそれを裏付ける結果を得た。すなわち、SH3P2 ノックアウトマウス由来マクロファージでは、Myosin1E の細胞膜画分への移行が促進されることが分かった。

また、CRISPR-Cas9 システムを利用して、Myosin1E ノックアウト HeLa 細胞と SH3P2 ノックアウト HeLa 細胞を樹立した。また、TetON 発現誘導システムを利用した HeLa-TetON-SH3P2 細胞を樹立した。これらの細胞を用いて解析を進めたところ、SH3P2 ノックアウトによって Myosin1E の細胞膜への局在が増加し、逆に Tet-ON システムを用いて (ドキシサイクリン添加によって) SH3P2 の発現を増加させると Myosin1E の細胞膜への局在が減少することが明らかとなった。

siRNA によるノックダウンでは、各標的分子の発現抑制が部分的であったために、各分子の結合や局在に対する影響が認められなかった可能性が考えられる。そこで、今後は新たに樹立した上記ノックアウト細胞系を用いて、Myosin1E とその結合分子の細胞内動態変化を検討する必要があると考えられる。

##### (2) Myosin1E と各分子の結合によってどのようにして細胞運動が調節されるか。

Myosin1E、SNX9 あるいは Cavin3 の発現を抑制した条件下において、ボイデンチャンパーを用いて細胞の運動能を測定したところ、いずれにおいても細胞運動能が低下することが分かった。また、Myosin1E と SNX9 あるいは Cavin3 を併せてノックダウンした場合にも、それぞれ単独の場合と同程度の抑制効果であった。よって、SNX9 と Cavin3 は Myosin1E のエフェクターとして細胞運動を調節する可能性が示された。また、細胞運動の一過程を担う細胞伸展に着目したところ、Myosin1E ノックダウンあるいは SNX9 ノックダウンによって細胞伸展が抑制され、SH3P2 ノックダウンでは細胞伸展が促進された。さらに、SH3P2 ノックダウンによる細胞伸展の促進効果は、Myosin1E あるいは SNX9 ノックダウンによってキャンセルされた。よって、SNX9 は Myosin1E による細胞伸展の調節に関与する可能性が考えられた。

新たに樹立した HeLa-TetON-SH3P2 細胞について細胞運動能を検討した結果、ドキシサイクリン添加によって SH3P2 の発現を誘導した条件下では、細胞運動が抑制されることが分かった。また、Myosin1E ノックアウト HeLa 細胞では、細胞の伸展が抑制される傾向が認められたことから、ノックアウト細胞系においても Myosin1E が細胞伸展に影響を及ぼすことが示唆された。

SH3P2 ノックアウトマウス由来マクロファージでは、RANKL 刺激による破骨細胞への分化が野生型と比較して促進されることを見いだした。この破骨細胞分化促進が細胞運動の上昇に起因するのかわ不明であるが、破骨細胞の融合過程が促進されていることから、破骨細胞の伸展、運動、あるいは融合過程において SH3P2 が抑制的に働いていると予想される。これは、SH3P2 の生理的な機能を示唆する興味深い結果であると考えられる。

前項に記載したように、siRNA によるノックダウンでは、各標的分子の発現抑制効果が部分的であったことから、今後は各分子のノックアウト細胞について、細胞伸展と細胞運動に対する影響を検討することが必要である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Yamaguchi A, Ishikawa H, Furuoka M, Yokozeki M, Matsuda N, Tanimura S, Takeda K Cleaved PGAM5 is released from mitochondria depending on proteasome-mediated rupture of the outer mitochondrial membrane during mitophagy. *J Biochem* 165, 19-25 (2019) 査読有 doi: 10.1093/jb/mvy077

Honda S, Sadatomi D, Yamamura Y, Nakashioya K, Tanimura S, Takeda K WP1066 suppresses macrophage cell death induced by inflammasome agonists independently of its inhibitory effect on STAT3. *Cancer Sci* 108, 520-527 (2017) 査読有 doi: 10.1111/cas.13154

Sadatomi D, Nakashioya K, Mamiya S, Honda S, Kameyama Y, Yamamura Y, Tanimura S, Takeda K Mitochondrial function is required for extracellular ATP-induced NLRP3 inflammasome activation. *J Biochem* 161, 503-512 (2017) 査読有 doi: 10.1093/jb/mvw098

〔学会発表〕(計9件)

福田 香凜、酒井 康介、中邨 翔太、武田 弘資、谷村 進：細胞運動阻害タンパク質 SH3P2 の新規結合分子の探索 . 第 35 回 日本薬学会九州支部大会 2018/11/18 (福岡)

谷村 進、武田 弘資：1 型ミオシン myosin 1E と細胞膜変形タンパク質 SNX9 の相互作用を介した細胞運動制御 . 第 77 回 日本癌学会学術総会 2018/9/28 (大阪)

中邨 翔太、増山 律子、酒井 康介、福田 香凜、武田 弘資、谷村 進：Myosin1E の細胞質アンカータンパク質 SH3P2 は破骨細胞の分化を制御する . 平成 30 年度 日本生化学会九州支部例会 2018/7/1 (福岡)

谷村 進、中邨 翔太、田川 克希、酒井 康介、福田 香凜、武田 弘資：ERK シグナルによる細胞運動制御を担う SH3P2-Myosin1E 複合体 . 日本薬学会 第 138 年会 2018/3/27 (金沢)

谷村 進、田川 克希、有近 直也、山中 智絵、福田 香凜、武田 弘資：1 型ミオシン myosin 1E と細胞膜変形タンパク質 SNX9 による細胞運動制御 . ConBio2017 (生命科学系学会合同年次大会) 2017/12/6 (神戸)

中邨 翔太、増山 律子、酒井 康介、貞富 大地、武田 弘資、谷村 進：Myosin 1E の細胞質アンカータンパク質 SH3P2 による破骨細胞の分化制御 . ConBio2017 (生命科学系学会合同年次大会) 2017/12/6 (神戸)

有近 直也、鳥羽 由希子、武田 弘資、谷村 進：細胞膜変形タンパク質 SNX9 とアクチンモーター Myosin1E の相互作用 . 第 39 回 日本分子生物学会年会 2016/12/2 (横浜)

谷村 進、有近 直也、河野 通明、武田 弘資：ERK 経路は Myosin1E の葉状仮足移行を誘導することで細胞運動を促進する . 第 39 回 日本分子生物学会年会 2016/12/2 (横浜)

谷村 進、河野 通明、武田 弘資：SH3P2 は Myosin 1E を細胞質に止めることで細胞運動を抑制する . 第 75 回 日本癌学会学術総会 2016/10/6 (横浜)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ph.nagasaki-u.ac.jp/lab/cell/index-j.html>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：武田 弘資

ローマ字氏名：TAKEDA, Kohsuke

所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬学総合研究科 (薬学系)

職名：教授

研究者番号 (8桁)：1 0 3 1 3 2 3 0

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。