

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590302
 研究課題名（和文） 一酸化窒素の分子病態：非受容体型チロシンキナーゼの
 レドックス依存活性化機構
 研究課題名（英文） Mechanism of nitric oxide-mediated regulation of non-receptor
 tyrosine kinases.

研究代表者
 浜口 道成 (Michinari Hamaguchi)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号：90135351

研究成果の概要：一酸化窒素は多くの蛋白の活性を制御し、様々な生理的役割を担っている。我々は非受容体型チロシンキナーゼが、一酸化窒素によるニトロソ化により、活性が制御されることを見出した。Src, FAKは一酸化窒素により活性化されるが、その活性化には保存されたシステインのニトロソ化が重要であった。このニトロソ化による活性化は細胞間接着の制御や、癌細胞の浸潤、転移に関わっていることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：一酸化窒素、チロシンキナーゼ、Src、レドックス、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

従来Srcファミリーキナーゼの活性はチロシンのりん酸化により制御されると考えられていた。SrcはN末よりSH3領域、SH2領域、キナーゼ領域を有する。キナーゼ領域のC末側にあるチロシンのりん酸化されると、そのりん酸化部位がSrcのSH2領域に結合し、そして酵素が閉じた状態となり、不活性化される。また、キナーゼ領域にある416番目のチロシンの自己りん酸化によってもその活性が制御されている。

我々は以前よりSrcにおけるシステインの役割について研究を進めていた。Srcには9つのシステインが存在し、SH2に3

つ、そしてキナーゼ領域に6つある。キナーゼ領域のC末には4つのシステインが集積している部位があり、我々はこの部位をCysteine Clustered Motif (CC motif)と名づけた。この4つのシステインのうち、2つのシステインはSrcファミリーキナーゼで保存されており、これらのシステインをアラニンに変えることで、Srcの活性の低下が観察される。

水銀はシステインのチオール基に特異的に結合する重金属である。水銀を精製したSrcに加えると、Srcの酵素活性が顕著に亢進する。この活性亢進のメカニズムを検討したところ、CC motifにあるシステインが重

要な働きをしていることが判明した。CC motif にある498番目のシステインをアラニンに変えたSrcでは水銀による活性化が観察されなかった。よって水銀は498番目のシステインに結合し、酵素の立体構造に変化をおこし、その活性を亢進すると考えられる。またこの結果より、Srcはりん酸化のみでなく、システインの修飾によってもその活性が制御される可能性が示唆された。

我々は以前に一酸化窒素(NO)がSrcの酵素活性を亢進することを報告している。しかしながら、この活性化のメカニズムはまだ不明である。NOは多くの蛋白のシステインのチオール基に結合(ニトロソ化)することで、その活性を制御することが知られている。よってSrcもシステインのニトロソ化により、その活性が制御されている可能性がある。

2. 研究の目的

SrcはNOにより活性化される。その詳細なメカニズムを解明する。NOはシステインをニトロソ化し、多くの蛋白の活性を制御する。SrcのNOによる活性化もシステインが関与していると推測されるので、NOによる活性制御に必須なシステインを同定する。また、そのシステインがニトロソ化されていることを確認する。

癌細胞をNO産生試薬であるSNAPで刺激すると、細胞運動や浸潤が亢進する。そのときにSrcなど様々なチロシンキナーゼが活性化される。NOによる浸潤の亢進などに必須なキナーゼを同定し、その活性にニトロソ化が関与しているかを明らかにする。

3. 研究の方法

NOによるSrcの活性化

Srcを細胞に発現させ、免疫沈降する。そして基質であるカゼイン、放射性ラベルしたATPを加え、15分30度で反応させる。その後SDS-PAGEゲルにながし、乾燥させ、フィルムに感光させる。基質に取り込まれた放射性ラベルされたリンの量により、Srcの活性が測定される。SNAPを加えることで、NOによるin vitroでのSrcの活性を測定する。

Srcを細胞に発現させた後、細胞の培養液にSNAPを加え、1時間培養する。その後、細胞の抽出液を作成し、Srcの416番目のチロシンのりん酸化を特異的に検出する抗体を用いて、Srcの活性化を検討する。

点変異を導入したSrcの作成

Srcのシステインをアラニンに変えるのは、PCRをもちいておこなった。変異の入ったプライマーを注文し、それを用いてPCRをおこない、増幅した遺伝子をベクター

に導入した。

ニトロソ化の検出

Srcのニトロソ化を検出するため、ビオチンスイッチ法をおこなった。細胞を1時間SNAPで刺激し、細胞を1%SDSを含むHEN bufferで可溶化する(HEN buffer; 50mM HEPES, 1mM EDTA, 0.1mM neocuproine)。さらにシステインのアルキル化剤であるMMTSを20mM加え、50度で30分反応させる。これにより、ニトロソ化されていないシステインにはMMTSが結合する。アセトン沈殿をおこない、蛋白を沈殿させたのち、1%SDSを含むHEN bufferで再び蛋白を可溶化する。そしてアスコルビン酸を加え、ニトロソ化されたシステインを還元する。そしてアピチンを結合させたHPDPを加え、還元されたシステインと反応させる。これにより、ニトロソ化されたシステインは最終的にはアピチンが結合したHPDPと結合する。そして、アピチンと結合するストレプトアビジンが結合したアガロースビーズを用いて、蛋白を免疫沈降する。この方法により、ニトロソ化された蛋白が特異的に免疫できる。その後、Srcに特異的な抗体を用いてニトロソ化されたSrcを検出する。

4. 研究成果

NOによる活性化に必須なシステインの同定

SrcはNOにより活性化されるが、その活性化に必要な領域を同定するため、SH2のみ、SH3のみ、もしくはその両方を欠損したSrcを作成し、NOによる活性化を検討した。その結果、NOによる活性化にはSH2、SH3両方とも必要でなく、キナーゼ領域のみで十分であることが明らかとなった。次にシステインがNOによる活性化に必須であることを確認するため、Iodoacetamide(IAA)を用いてSrcのシステインをアルキル化し、NOを加え、その活性化を観察した。するとNOによるSrcの活性化は観察されなかった。

Srcのキナーゼ領域のC末側にはシステインが集積した部位があり、我々は、CC motifと名づけている。この領域のシステインは他のSrcファミリーキナーゼで保存されており、水銀によるSrcの活性化に必須である。そこで、CC motifにあるシステインをそれぞれアラニンに変えたSrcを作成し、NOによる活性化を検討した。水銀と同様に、498番目のシステインをアラニンに変えたSrcではNOによる活性が観察されなかった。次に498番目のシステインがニトロソ化されているかをビオチンスイッチ法を用いて検討した。498番目のシステインをアラニンに変えたSrcでは野生型にくらべ、ニトロソ化が顕著に減少してい

た。よって、SrcはNOにより498番目のシステインがニトロソ化され、活性化されると考えられる。このシステインは他のSrcファミリーキナーゼでも保存されている。そこで、Yes, Lynなどのキナーゼを用いて同様な実験をおこなった。Yes, Lyn両方共に、NOによる活性化が観察された。次にこれらのキナーゼの498番目にあたるシステインをアラニンに変え、NOによる活性化を検討した。Srcと同様に、この部位にあるシステインを変えることで、NOによるYes, Lynの活性化は観察されなかった。NOによりSrcファミリーキナーゼは活性化されるが、その活性化には保存された498番目に当たるシステインが重要であることが示唆された。

上記の結果はすべて In vitro の系で得られた結果である。そこで、今度は細胞においてもSrcがNOによりニトロソ化され、活性化されるかを検討した。SYF細胞はSrc, そしてSrcファミリーキナーゼであるFyn, Yesの3つの遺伝子が欠損した細胞である。この細胞に野生型Src, そして498番目のシステインをアラニンに変えたSrcを導入し、恒常的な発現細胞株を作成した。そしてこれらの細胞をSNAPで刺激し、Srcの活性をウエスタンブロットにて検出した。Srcは活性化されると416番目のチロシンがリン酸化されるので、このチロシンのリン酸化特異的抗体を用いて活性を観察した。野生型SrcはSNAPの刺激により活性化されるが、変異型Srcはその活性化が野生型にくらべ、顕著に抑えられていた。また、ピオチンスイッチ法により、498番目のシステインが細胞内においても、ニトロソ化に関与していることが示唆された。

FAKはチロシンキナーゼであり、細胞が細胞外基質と接着する部分である、接着斑に局在する。そして細胞の運動などに重要な働きに関与している。我々はFAKもSNAPの刺激により活性化されることを見出した。細胞をSNAPで刺激した後、FAKに特異的なりん酸化抗体を用いてウエスタンブロットをおこなったところ、FAKのリン酸化亢進することが確認された。さらにFAKを免疫沈降し、キナーゼアッセイをおこなったところ、SNAPによるFAKの活性の亢進が明らかとなった。

MCF7細胞の形態変化、浸潤の亢進における一酸化窒素, Src, FAKの役割

MCF7細胞は乳癌由来の癌細胞である。この細胞を性ホルモンであるエストロゲンで刺激すると、細胞の形態変化、浸潤の亢進などが観察される。そこでエストロゲンの刺激によりSrc, FAKが活性化されるかをウエスタンブロットを用いて検討したところ、両

方の蛋白ともに、活性化されることが明らかとなった。エストロゲンによりNO産生酵素であるeNOSの発現の亢進が報告されている。我々はそこで、エストロゲン刺激によるeNOSの発現亢進をウエスタンブロットにて確認した。次にDAF2という試薬を用いてNOの産生の亢進を観察した。細胞をエストロゲンで刺激した後、DAF2を加え、細胞を一定時間培養した後、蛍光顕微鏡でNOの産生を観察した。エストロゲン刺激して24時間後に顕著なNOの産生が見られた。次に、このNOの産生がSrc, FAKの活性化に関与しているかを検討した。エストロゲンで細胞を刺激し、さらにNO産生阻害剤であるL-NMMAを加え、Src, FAKの活性を調べた。するとL-NMMAによりエストロゲンによるSrc, FAKの活性化が抑制されることが判明した。

エストロゲンにより、MCF7細胞における細胞間接着が阻害される。細胞間接着の破壊は癌の浸潤や転移に重要な働きをしている。そこで、NOがエストロゲンによる細胞間接着の阻害に関与しているかを検討した。細胞をエストロゲンで刺激し、さらにL-NMMAを加え、カドヘリン抗体を用いて免疫染色をおこなった。この実験により、NOが細胞間接着阻害に関与していることが明らかとなった。またSrcの阻害剤を用いることにより、細胞間接着の阻害が抑えられた。以上より、エストロゲンはNOを介してSrcを活性化し、細胞間接着を阻害していると考えられる。

エストロゲンにより、MCF7細胞の浸潤が亢進する。そこで同様に、NO, SrcがMCF7細胞の浸潤の亢進に関与しているかを検討した。細胞の浸潤はボイデンチャンバーを用いておこなった。細胞をチャンバーの上部にまき、エストロゲンで刺激する。24時間後にマトリゲルを破壊し、チャンバーの下側に出てくる細胞の数を数えることで、細胞の浸潤を検討した。L-NMMA, またSrc阻害剤であるPP2を細胞に加えることで、細胞の浸潤が抑制された。以上の結果より、NOによるSrcの活性化は癌細胞の浸潤に関与していることが推測される。

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 4 件)

1. A role for AP-1 in matrix metalloproteinase production and invadopodia formation of v-Crk-transformed cells. Hasegawa H, Senga T, Ito S, Iwamoto T, Hamaguchi M. Exp Cell Res. in press 2009

2. The cysteine-cluster motif of c-Yes, Lyn and FAK as a suppressive module for the kinases. Rahman MA, Senga T, Oo ML, Hasegawa H, Biswas MH, Mon NN, Huang P, Ito S, Yamamoto T, Hamaguchi M. **Oncol Rep.** 2008 Apr;19(4):975-80. 査読あり
3. The cysteine-cluster motif of c-Src: its role for the heavy metal-mediated activation of kinase. Senga T, Hasegawa H, Tanaka M, Rahman MA, Ito S, Hamaguchi M. **Cancer Sci.** 2008 Mar;99(3):571-5. 査読あり
4. A role for SHPS-1/SIRPalpha in Concanavalin A-dependent production of MMP-9. Ruhul Amin AR, Uddin Biswas MH, Senga T, Feng GS, Kannagi R, Agarwal ML, Hamaguchi M. **Genes Cells.** 2007 Sep;12(9):1023-33. 査読あり

[学会発表] (計2件)

1. Focal Adhesion Kinase regulates proinflammatory cytokine IL-1beta-dependent MMP-9 production
Naing Naig Mon, Satoko Ito, Takeshi Senga, Michinari Hamaguchi
日本癌学会
平成20年10月29日 名古屋
 2. 千賀 威 ラーマンアミナー、浜口道成
NOシグナルと癌の浸潤転移
日本癌学会
平成20年10月28日 名古屋
6. 研究組織
(1)研究代表者
浜口 道成 (Michinari Hamaguchi)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90135351