

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 5 月 30 日現在

機関番号：81303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590298

研究課題名（和文）キネシンモーターリン酸化の生理的意義の解明－癌、織毛病への関与－

研究課題名（英文）Regulation of KIF3 motor by dephosphorylation.

研究代表者

島 礼 (SHIMA HIROSHI)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・がん薬物療法研究部・部長

研究者番号：10196462

研究成果の概要（和文）：我々は、低分子 2 重基質ホスファターゼの機能解析を行い、二つの分子（DUSP26 および DUSP13B）の細胞内基質とその生理的機能を明らかにすることに成功した。

DUSP26 が、KIF3A（KIF モーター複合体のサブユニット）に結合し、KIF3A を介して KAP3 を脱リン酸化することを明らかにした。さらに、DUSP26 の脱リン酸化活性は、N-Cadherin および β カテニンの細胞-細胞の境界への集積や、細胞と細胞の接着性の維持に働いていることを明らかにした。一方で脳腫瘍のグリオブラストーマにおいて DUSP26 の遺伝子発現を調べたところ、DUSP 遺伝子プロモーターに著しいメチル化とともに、発現の減少が認められ、グリオブラストーマの持つ高い浸潤性の原因の一つに、DUSP26 遺伝子メチル化/発現減少があることが考えられた。

DUSP13B を、新たな MAPK ホスファターゼとして同定した。DUSP13B は、MAPK の特に JNK と p38 を特異的に脱リン酸化する活性を持つことから、ストレス経路に働く新たな制御因子と考えられた。

研究成果の概要（英文）：We identified the protein-phosphatase DUSP26 as a novel regulator of the KIF3 motor. Dusp26 is recruited to the KIF3 motor mainly by interaction with Kif3a, and thereby dephosphorylates Kap3. Enzyme activity of the Dusp26 was shown to promote distribution of beta-catenin/N-cadherin to cell-cell junction sites, resulting in increased cell-cell adhesiveness. We also showed that DUSP26 mRNA expression was downregulated in human glioblastoma samples, and a CpG island upstream of the DUSP26 transcriptional start site was heavily methylated in glioma cell lines. These results suggest previously unidentified functions of DUSP26 in intracellular transport and cell-cell adhesion. Downregulation of DUSP26 may contribute to malignant phenotypes of glioma.

We showed that DUSP13B inactivated MAPK activation in the order of selectivity, JNK>p38>ERK in cells. Reporter gene analysis showed that DUSP13B had significant inhibitory effect on AP-1 dependent gene expression. DUSP13B is the first identified testis specific phosphatase that inhibits stress-activated MAPKs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 22 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成 23 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成 24 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：分子腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

我々は新規の低分子 2 重基質ホスファターゼを同定して LDP4 (後に DUSP26) および LDP1 (後に MKP13B) の生化学的解析を行っていた。しかし、両者の細胞内での生理的な基質、細胞内シグナリング、疾患との関係は不明であった。

KIF3 モーターの制御機構について： KIF3 複合体は、細胞質内の物質輸送を行うモーターである。KIF3A と KIF3B は、ヘテロ二量体を形成し、KAP3 を介してカーゴを積み、微小管に沿って運ぶ。KIF3 モーターは物質輸送のみならず、有糸分裂の際の紡錘糸や染色体の動きの制御にも重要な働きを持つことが示唆されていた。KIF3 複合体に含まれる KAP3 はリン酸化されるタンパクであることが知られていたが、その生理的な意味は不明であった。

MAPK シグナル経路の制御機構について： MAPK は、2 重基質キナーゼおよび 2 重基質ホスファターゼによってそのリン酸化/活性が調節されている。2 重基質ホスファターゼは、新しい分子種が見いだされてきたが、MAPK を基質にする分子種の同定が課題となっていた。

2. 研究の目的

低分子 2 重基質ホスファターゼの生理的な基質を同定すること。それらの細胞内シグナルや細胞機能の制御に関わる機能や、疾患や病態への関与を明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) 生化学・分子生物学的手法を用いたリン酸化-脱リン酸化の意義の解析。

イースト 2hybrid 法によって結合タンパクを同定し、複合体を解明し、低分子 2 重基質ホスファターゼによって脱リン酸化されるタンパクを同定する。

ノックダウン、野生型または活性を持たない変異体の過剰発現の系で、低分子 2 重基質ホスファターゼの機能を解明する。

(2) 患者がん組織またはがん組織由来の細胞株を用いた解析。

臨床サンプル (手術・生検サンプル) を用いて、低分子 2 重基質ホスファターゼ複合体タンパクの発現、遺伝子異常の有無を解析する。

4. 研究成果

(1) KIF3 モーターの制御機構について：キネシンモーターの一つ KIF3 モーターは、KIF3A と KIF3B がヘテロダイマーを形成して「2本足」で微小管上を+端に向かって動く

微小管依存性モーターである。カーゴは KAP3 を介して KIF3 モーターの上に積まれ、微小管に沿って運ばれる。この機能により、KIF3 モーターが微小管に沿った物質輸送だけでなく、有糸分裂の際の紡錘糸や染色体の動きの制御にも重要な働きを持つことが示唆されている。一方でノックアウトマウス等の解析から、これらの機能不全が、癌や繊毛病と総称される症状の原因となる可能性が示された。しかし、リン酸化による制御はほとんど明らかになっていない。

我々は、2 重基質ホスファターゼのひとつ、DUSP26 の機能解明を目的として、イースト 2 ハイブリダイゼーションにより、DUSP26 が直接 KIF3A に結合することを見いだした。さらに、KIF3A を介して KAP3 を脱リン酸化することを明らかにした。KAP3 の脱リン酸化の意義を明らかにするため、KIF3 モーターのカーゴと考えられている N-Cadherin および β カテニンの細胞内局在を調べたところ、DUSP26 により N-Cadherin および β カテニンが細胞-細胞の境界に集積することが明らかとなった。一方ホスファターゼ活性をもたない DUSP26 においては、それらの集積が弱まっていた。従って、DUSP26 を脱リン酸化し、それと共に N-Cadherin の輸送を正に制御することが示された。

上記の発見と癌との関係を検討するために、脳腫瘍のグリオブラストーマにおける DUSP26 の遺伝子発現を調べたところ、著しい発現の減少が認められた。そこで、グリオブラストーマの細胞株を用いてエピジェネティック解析を行った。各種細胞株において、5-aza-dC 単独、または 5-aza-dC および TSA 処理をしたところ、DUSP26 mRNA 発現の増加が認められた。また、DUSP26 CpG アイランドにおける高率のメチル化が認められた。これらの結果より、脳腫瘍におけるエピジェネティックな変化により、DUSP26 の発現が減少していることが示唆され、発現の低下と脳腫瘍の悪性化との関連が示唆された。

(2) MAPK シグナル経路の制御機構について：DUSP13B は、低分子 2 重基質ホスファターゼである。MKP13B は、KIF3 モーターに対して、結合活性も脱リン酸化活性も示さなかった。しかし、一方で MAPK シグナル経路の活性化に阻害活性を持つ事がわかった。その特異性は JNK=p38>ERK であった、AP-1 の転写活性を著しく抑える働きを持つことがわかった。興味深いことに DUSP13 遺伝子は、異なったエクソンを使う事で 2 種類のホスファターゼ分子をコードしているが、

DUSP13AはMAPKホスファターゼ活性を持っていない。DUSP13 遺伝子より、組織特異的、シグナル特異的に、DUSP13A と DUSP13B が分別的に発現し、細胞機能を制御することが考えられた。

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 8 件)

- ① Shibahara I, Sonoda Y, Kanamori M, Saito R, Yamashita Y, Kumabe T, Watanabe M, Suzuki H, Kato S, Ishioka C, Tominaga T.
IDH1/2 gene status defines the prognosis and molecular profiles in patients with grade III gliomas.
Int J Clin Oncol.
2012 Dec;17(6):551-61
- ② Nomura M, Shiiba K-I, Katagiri C, Kasugai I, Masuda K, Sato I, Sato M, Kakugawa Y, Nomura E, Hayashi K, Nakamura Y, Nagata T, Otsuka T, Katakura R, Yamashita Y, Sato M, Tanuma N, Shima H
Novel function of MKP-5/DUSP10, a phosphatase for stress-activated kinases, on ERK dependent gene expression, and up-regulation of its gene expression in colon carcinomas
Oncol Rep. 2012 Sep;28(3):931-6
- ③ Suzuki M, Tanaka H, Tanimura A, Tanabe K, Oe N, Rai S, Kon S, Fukumoto M, Takei K, Abe T, Matsumura I, Kanakura Y, Watanabe T.
The clathrin assembly protein PICALM is required for erythroid maturation and transferrin internalization in mice.
PLoS One. 2012;7(2):e31854
- ④ Takahashi K, Mitoma J, Hosono M, Shiozaki K, Sato C, Yamaguchi K, Kitajima K, Higashi H, Nitta K, Shima H, and Miyagi T
Sialidase NEU4 Hydrolyzes Polysialic Acids of Neural Cell Adhesion Molecules and Negatively Regulates Neurite Formation by Hippocampal Neurons
J. Biol. Chem.
2012Apr27;287(18):14816-26.
- ⑤ Katagiri C, Masuda K, Nomura M, Tano ue K, Fujita S, Yamashita Y, Katakura

a R, Shiiba K, Nomura E, Sato M, Tanuma N, Shima H

DUSP13B/TMDP inhibits stress-activated MAPKs and suppresses AP-1-dependent gene expression
Molecular and Cellular Biochemistry
352(1-2): 155-162, 2011

- ⑥ Masuda K, Katagiri C, Nomura M, Sato M, Kakumoto K, Akagi T, Kikuchi K, Tanuma N, Shima H
MKP-7, a JNK phosphatase, blocks ERK-dependent gene activation by anchoring phosphorylated ERK in the cytoplasm.
Biochem. Biophys. Res. Commun.
393:201-206, 2010
 - ⑦ Yamashita Y, Kasugai I, Sato M, Tanuma N, Sato I, Nomura M, Yamashita K, Sonoda Y, Kumabe T, Tominaga T, Katakura R, Shima H
CDC25A mRNA levels significantly correlate with Ki-67 expression in human glioma samples
Journal of Neuro-Oncology
100(1):43-49, 2010
 - ⑧ Van Dessel N, Beke L, Görnemann J, Minnebo N, Beullens M, Tanuma N, Shima H, Van Eynde A, Bollen M.
The phosphatase interactor NIPPI1 regulates the occupancy of the histone methyltransferase EZH2 at Polycomb targets.
Nucleic Acids Res.
38(21):7500-7512, 2010
- [学会発表] (計 17 件)
- ① Ogoh H, Kishimoto A, Suzuki M, Hara K, Tanga N, Tanuma N, Watanabe T and Shima H
Embryonic Lethality Caused in Mice LPP6c gene
10th International Conference on Protein Phosphatase (Tokyo, 2013.2.7-9)
 - ② 田沼延公、岸本綾子、松本祥子、野村美有樹、近藤玄、国下侑里、片倉隆一、佐藤雅美、渡邊利雄、島礼
ピルビン酸キナーゼ M (PKM) の発現アイソフォーム固定したマウスの作出
第 85 回日本生化学会
(福岡, 2012.12.14-16)
 - ③ 松田俊、足立淳、井原賢、田沼延公、島礼、井倉正枝、井倉毅、松田知成
ピルビン酸キナーゼ M2 はダイオキシン受

容体の活性化補助因子である
第 35 回日本分子生物学会
(福岡, 2012. 12. 11-14)

- ④ 松本祥子、岸本綾子、国下侑里、近藤玄、野村美有樹、渡邊利雄、島礼、田沼延公
ワールブルグ効果に関する in vivo 解析
のためのマウスモデル開発
第 35 回日本分子生物学会
(福岡, 2012. 12. 11-14)
- ⑤ 田沼延公、岸本綾子、国下侑里、松本祥子、近藤玄、坂本良美、野村美有樹、渡邊利雄、島礼
ES 細胞におけるピルビン酸キナーゼ M (PKM) アイソフォームの機能解析 - ノックイン細胞を用いて
(福岡, 2012. 12. 11-14)
- ⑥ 山下洋二、春日井勲、田沼延公、柴原一陽、園田順彦、金森政之、齋藤竜太、隅部俊宏、富永悌二、島礼、片倉隆一
悪性グリオーマ検体およびグリオーマ樹立株における PTPzeta の解析
脳神経外科学会 (大阪, 2012. 10. 17-19)
- ⑦ 田沼延公、渡邊利雄、野村美有樹、佐藤郁郎、椎葉健一、山下洋二、佐藤雅美、島礼
PKM スイッチ不可能なマウスモデル
第 71 回日本癌学会学術総会
(札幌, 2012. 9. 19-21)
- ⑧ 渡邊利雄、田沼延公、島礼
PP6 触媒サブユニット遺伝子は、胚の初期発生時期に必須である
第 71 回日本癌学会学術総会
(札幌, 2012. 9. 19-21)
- ⑨ Shima H
Protein Phosphatases in human Glioma Samples
The first Japan-Taiwan Bilateral Conference on Protein Phosphatases,
(Okazaki, 2011. 12. 2)
- ⑩ Kishimoto A, Tanuma N, Suzuki M, Sasaki, N Abe T, Kiyonari H, Aizawa S-i, Watanabe T, Shima H
Embryonic Lethality Caused in Mice Lacking the phosphatase domain of the PP6c gene
第 34 回日本分子生物学会年会
(横浜 2011. 12-16)
- ⑪野村美有樹、田沼延公、角川陽一郎、島礼

Switch of pyruvate kinase M (PKM) isoforms in human breast cancers
第 70 回日本癌学会学術総会
(名古屋, 2011. 10. 3-5)

- ⑫ Shima H
Analysis of Protein Phosphatases in Human Glioma Samples
9th International Conference on Protein Phosphatase & 1st International Symposium on Carcinogenic Spiral
(Tokyo, 2011.02.1-3)
- ⑬ Tanuma N, Nomura M, Sato M, Yamashita Y, Shiiba K, Katakura K, and Shima H
Phospho-Regulation of Spliceosomal Protein, Sap155/Sf3b1
9th International Conference on Protein Phosphatase & 1st International Symposium on Carcinogenic Spiral
(Tokyo, 2011.02.1-3)
- ⑭ 野村美有樹、田沼延公、佐々木希、島礼
Conversion of pyruvate kinase M (PKM) isozymes in human cancers - an analysis using isoform-specific antibodies
BMB 2010 第 33 回日本分子生物学会年会
第 83 回日本生化学学会大会 合同大会
(神戸 2010. 12. 7-10)
- ⑮ 田沼延公、野村美有樹、大内司、佐藤雅美、片倉隆一、島礼
Drift of pyruvate kinase M (PKM) alternative splicing associating with Warburg effect in human cancers
BMB 2010 第 33 回日本分子生物学会年会
第 83 回日本生化学学会大会 合同大会
(神戸 2010. 12. 7-10)
- ⑯ 野村美有樹、田沼延公、山下洋二、椎葉健一、角川陽一郎、佐藤郁郎、島礼
Generation of isoform-specific antibodies against pyruvate kinase (PKM)
第 69 回日本癌学会総会
(横浜, 2010. 9. 22-24)
- ⑰ 田沼延公、野村美有樹、山下洋二、椎葉健一、角川陽一郎、佐藤郁郎、島礼
Aberrant pre-mRNA splicing of pyruvate kinase M (PKM) in human cancer
第 69 回日本癌学会総会
(横浜, 2010. 9. 22-24)

[その他]

ホームページ等

<http://www.miyagi-pho.jp/mcc/kenkyu/yakubutsu.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島 礼 (SHIMA HIROSHI)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・がん薬物療法研究部・部長

研究者番号：10196462

(2) 研究分担者

山下 洋二 (YAMASITA YOUZI)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・がん薬物療法研究部・特任研究員

研究者番号：30420045

渡邊 利雄 (WATANABE TOSIO)

奈良女子大学・自然科学系・教授

研究者番号：60201208

(3) 連携研究者

菅村 和夫 (SUGAMURA KAZUO)

地方独立行政法人宮城県立病院機構宮城県立がんセンター(研究所)・発がん制御研究部・特任部長

研究者番号：20117360