

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460067

研究課題名(和文) Myosin1Eによる新規細胞運動制御機構の解明

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

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)・助教

研究者番号：90343342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、Myosin1E (Myo1E) はそのSH3ドメインを介してCavin3 (カベオラ形成調節因子) と結合することを見出した。また、Myo1EあるいはCavin3の発現を抑制すると、血清刺激に伴うカベオラの内在化が抑制されること、Aktの局所的な活性化が阻害されること、また細胞の運動能が低下することが分かった。これらの結果より、血清刺激に応答して細胞運動の先端端へ移行したMyo1Eは、Cavin3との結合を介してカベオラの内在化を誘導し、それがAktの局所的な活性化につながることで、またそれがMyo1Eによる細胞運動亢進の一因であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We have shown that SH3P2, a negative regulator of cell migration, interacts with Myosin1E (Myo1E) and prevents the localization of Myo1E to the lamellipodial tips. Dissociation of Myo1E from SH3P2 results in the induction of cell motility; however, the molecular mechanism of which still remains unknown. Here, we show that the SH3 domain of Myo1E bound to the Cavin1/3-Caveolin1 complex via the proline-rich region of Cavin3. RNAi-mediated depletion of Myo1E or Cavin3 suppressed the internalization of the Cavin1/3-Caveolin1 complex, the localized activation of Akt, and cell motility. We also revealed that Hsp90 co-chaperone proteins, UNC45 and STIP1, also interact with Myo1E and regulate the localization and expression level of Myo1E, respectively. These results suggest that the function of Myo1E is regulated by SH3P2, UNC45 and STIP1 and that Myo1E induces the localized activation of Akt through the Caveolae regulation and thus cell motility.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ミオシン カベオラ リン酸化 細胞運動

## 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、細胞内で生じる多彩で複雑な反応が時空間的に緻密かつ統合的に調節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確かな制御が失われ、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と考えられる。

我々は当初、細胞運動を抑制する新規タンパク質として SH3P2 を同定していた。また、SH3P2 は Myosin1E と特異的に結合することや、SH3P2 の Ser<sup>202</sup> が ERK 経路依存的に RSK によって直接リン酸化されると Myosin1E が解離すること、Myosin1E は血清等の刺激に応答して速やかに細胞先端端に移行すること、Myosin1E の発現抑制によって細胞運動が阻害されることを見いだしていた (図 1)。すなわち、Myosin1E は細胞運動を亢進させる分子であり、SH3P2 は Myosin1E に結合してその機能を抑制する機能を持つこと、さらに Myosin1E-SH3P2 システムは ERK 経路を介したリン酸化によって制御される細胞運動調節機構であることを明らかにしていた。

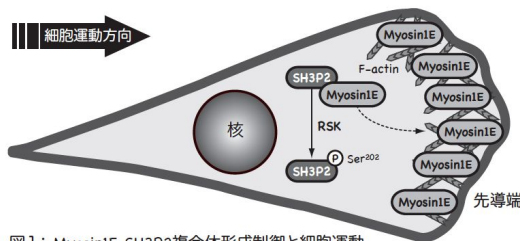


図 1: Myosin1E-SH3P2複合体形成制御と細胞運動

Myosin はアクチンフィラメント・モータータンパクで、細胞の移動、分裂、神経軸索の伸展、細胞形態の維持、細胞内小器官・小胞の輸送など多彩な様式の「運動」において本質的な役割を担っている。1 型 Myosin に属する Myosin1E は、他のミオシンファミリー分子と異なり単量体で機能する点、また C 末端側に Tail Homology (TH)1 領域(1 型 Myosin 共通領域)に加えて、TH2 領域と SH3 ドメインが存在する点で極めて特徴的である (図 2)。当初までの解析により、我々は (1) Myosin1E の SH3 ドメインにカベオラ形成調節因子 Caveolin1-Cavin1-Cavin3 が結合すること、(2) 運動能が高いがん細胞では Myosin1E、Caveolin1、Cavin1 および Cavin3 の発現が高いこと、(3) Myosin1E のモーター部位にミオシン特異的分子シャペロン UNC45-Hsp90 が結合することを突き止めていた (図 2)。

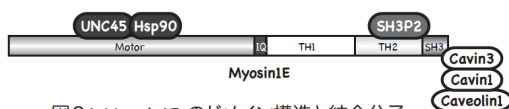


図 2: Myosin1E のドメイン構造と結合分子

カベオラは、スフィンゴ脂質とコレステロールに富んだ直径 60~80 nm の陥入構造を有する細胞膜マイクロドメインであり、特定のタンパク質が集積する「シグナル伝達のプラットフォーム」となることが示されている。また、繊維芽細胞では細胞移動の先端端でカベオラが消失すること、さらに Caveolin1 の発現とがん細胞の浸潤能の亢進 (がん悪性化) に相関が認められることなど、細胞運動における重要性を示唆する結果が報告されていた。なお、Cavin については Caveolin1 との相互作用によりカベオラの形成、安定化、輸送等を制御する新たなカベオラ形成調節因子であることが報告されていた。

これらの知見を総合的に考慮した結果、Myosin1E は UNC45-Hsp90 によって機能が調節され、さらに先端端でのカベオラ形成の調節を介して細胞運動を制御するとの作業仮説を考えるに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では上記作業仮説を検証することによって、Myosin1E による細胞運動制御機構の具体的な分子メカニズムを明らかにすることを目的として、下記 3 項目について解析を進めた。

- (1) UNC45-Hsp90 による Myosin1E 機能調節の分子メカニズム
- (2) Myosin1E によるカベオラ形成調節の分子メカニズム
- (3) Myosin1E、Caveolin1、Cavin1/3 発現調節の分子メカニズム

## 3. 研究の方法

- (1) UNC45-Hsp90 による Myosin1E 機能調節の分子メカニズム解明

UNC45-Hsp90 は 2 型 Myosin のシャペロンとして作用することで、2 型 Myosin の安定性あるいはアクチン繊維との結合を調節することが報告されていた。そこで、UNC45-Hsp90 が Myosin1E の安定性と細胞内局在に及ぼす影響に着目して解析を進めた。なお、解析には血清等の細胞外刺激依存的に応答して細胞運動が亢進されるがん細胞 (HeLa、MKN1 細胞等) を利用した。

### 安定性に及ぼす影響の解析

siRNA によって UNC45 の発現を抑制させた条件下、あるいは Hsp90 特異的阻害剤 (17-AAG) を処理した条件下における Myosin1E の発現量の変化をウエスタンブロット法により解析した。

### 細胞内局在に及ぼす影響の解析

血清刺激に応答した Myosin1E の細胞内局在の変動を、間接免疫蛍光法によって、と同条件下において比較観察した。また、細胞運動に及ぼす影響を併せて解析した。

## (2) Myosin1E によるカベオラ形成調節の分子メカニズム解明

Myosin1E とカベオラ複合体の相互作用の様式を詳細に解析するとともに、Myosin1E がカベオラ形成を調節する可能性を検証した。

Myosin1E とカベオラ複合体の相互作用の解析

Caveolin1、Cavin1 および Cavin3 の欠失変異体を作成して、カベオラ複合体のなかで Myosin1E との直接結合に必要な分子および結合領域を、免疫共沈法と GST pull down assay などを用いて特定を進めた。また、血清刺激あるいは各種阻害剤処理条件下における Myosin1E とカベオラ複合体の結合を、免疫共沈法を用いて経時的に解析した。

Myosin1E 発現抑制 / 過剰発現条件下におけるカベオラ形成の変動

Myosin1E を発現抑制 / 過剰発現させた条件下におけるカベオラ形成の変化を比較検討した。また、阻害剤を踏まえながら血清刺激に伴うカベオラ形成および各種阻害剤処理条件下におけるカベオラ形成の変動を解析した。なお、カベオラ形成の程度は、低温にて Triton X-100 不溶性となる画分中の Caveolin1 と Cavin の発現量を指標として、また Caveolin1 の間接免疫蛍光法によって評価した。

カベオラ形成抑制 / 亢進条件下における細胞運動能の変化

カベオラ複合体の構成分子を発現抑制 / 過剰発現させた条件下における細胞運動能を、Boyden chamber assay および Timelapse 顕微鏡によって比較検討した。

## (3) Myosin1E、Caveolin1、Cavin1/3 発現調節の分子メカニズム解明

各種阻害剤を処理した際の各分子の発現量をウエスタンブロット法によって解析した。また、阻害剤実験で得られた結果を踏まえながら、分子生物学的手法を用いて確認実験を行った。

## 4. 研究成果

### (1) UNC45-Hsp90 による Myosin1E 機能調節の分子メカニズム

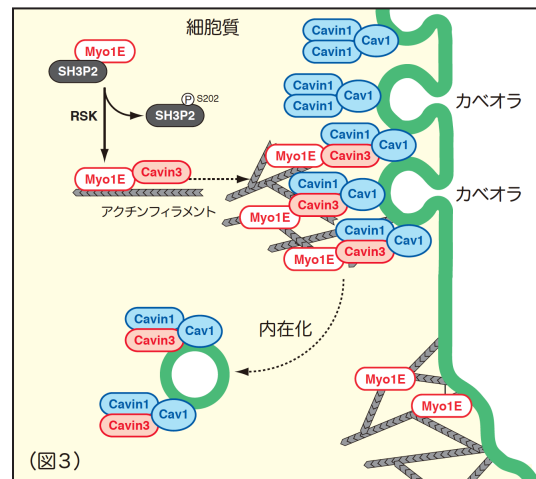
免疫共沈実験より、Hsp90 特異的阻害剤 (17-AAG) を処理すると、Myosin1E と UNC45 の結合が抑制されることが明らかとなった。siRNA によって UNC45 の発現を抑制した条件下、あるいは 17-AAG を処理した条件下において、Myosin1E の発現量には有意な変動は認められなかったが、一方、UNC45 の発現を抑制した細胞では、血清刺激に反応した Myosin1E の細胞内局在が変化すること (細胞運動先端端からの消失が遅れること) を明らかにした。またこのとき、細胞運動が阻害されることを見いだした。

Flag-Myosin1E 安定発現 293 細胞株を樹立して、免疫沈降 / 高感度質量分析法を用いた網羅的な Myosin1E 結合分子の同定を進めた結果、Hsp90 コシャペロンである STIP1 を同定した。STIP1 と Myosin1E の結合は UNC45 のそれとは異なり、17-AAG によって増加することが分かった。さらに STIP1 の過剰発現により Myosin1E の発現量が低下することを明らかにした。

現時点において具体的な分子メカニズムに関しては不明であるが、Myosin1E は UNC45-Hsp90 によってその細胞内局在が、また STIP1-Hsp90 によってその発現量が調節される可能性を見いだした。

### (2) Myosin1E によるカベオラ形成調節の分子メカニズム

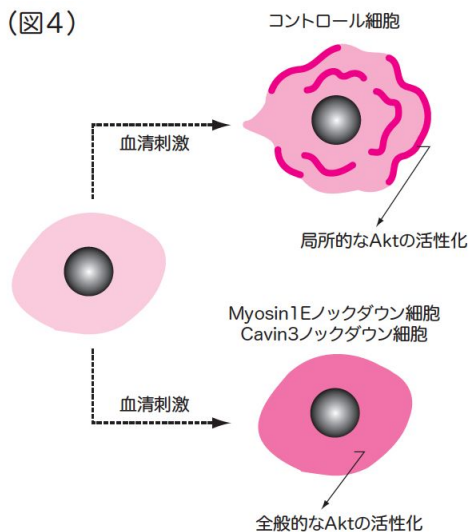
GST pull down assay および免疫共沈法により、Myosin1E はその SH3 ドメインを介して Cavin3 のプロリンリッチ領域と結合すること、また Caveolin1 と Cavin1 は Cavin3 を介して Myosin1E と間接的に結合することを見いだした。さらに、Cavin3 がカベオラの内在化および輸送に関わることを考慮し、Myosin1E がカベオラのダイナミクスに与える可能性を検討した。その結果、Myosin1E は Cavin3 との相互作用を介して血清刺激に伴うカベオラの内在化を促進すること、またそれによって細胞運動先端端からカベオラを排除する可能性を見いだした (図 3)。



細胞運動において重要な役割を果たす Akt の活性化に着目したところ、Myosin1E あるいは Cavin3 の発現を抑制すると、細胞全体における Akt の活性化の程度には変化が認められなかったが、Akt の局所的な活性化が阻害されることが明らかとなった (図 4)。

また、Cavin3(dLZ) (Cavin3 のオリゴマー化を阻害した変異体) を発現させた細胞でも Akt の局所的な活性化が認められないこと、SH3P2(S202A) (Myosin1E の細胞膜への移行を阻害する変異体) を発現させた細胞でも Akt の局所的な活性化が抑制されることが分かった。さらに、Myosin1E、Caveolin1、あるいは Cavin1/3 の発現を抑制した条件下では細胞の運動能が低下したことから、細胞運

動先端端へ移行した Myosin1E が Cavin3 との結合を介してカベオラの内在化を誘導し、それによって Akt の局所的な活性化が引き起こされることが、Myosin1E による細胞運動亢進の一因となることが明らかとなった。



### (3) Myosin1E、Caveolin1、Cavin1/3 発現調節の分子メカニズム

各種阻害剤を用いた解析により、Cavin3 はメチル化阻害剤によって発現量が増加することを明らかにした。また、各種シグナル伝達阻害剤が Myosin1E および Cavin3 の発現に及ぼす影響を検討したが、いずれの阻害剤によっても有意な影響は認められなかった。

相対的に細胞運動能が高いがん細胞株では共通して Myosin1E、Cavin1/3 および Caveolin1 の発現が上昇していること、また Myosin1E、Cavin3 あるいは Caveolin1 の発現抑制によって細胞運動が阻害されることから、Myosin1E を介したカベオラ形成調節ががん細胞の運動能の制御において重要な役割を果たす可能性が示された。

## 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2件)

(1) Furuoka M, Ozaki K, Sadatomi D, Mamiya S, Yonezawa T, Tanimura S, Takeda K. TNF- $\alpha$  induces caspase-1 activation independently of simultaneously induced NLRP3 in 3T3-L1 cells. *J Cell Physiol*, in press, 2016. 査読有  
DOI: 10.1002/jcp.25385

(2) Ozaki K, Awazu M, Tamiya M, Iwasaki Y, Harada A, Kugisaki S, Tanimura S, Kohno M. Targeting the ERK signaling pathway as a potential treatment for insulin resistance and type 2 diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 310, E643-E651, 2016. 査読有  
DOI: 10.1152/ajpendo.00445.2015

〔学会発表〕(計7件)

(1) 谷村 進、Myosin 1E はカベオラの極性を誘導することで細胞運動を亢進させる、BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会・合同大会)、平成27年12月1日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

(2) 有近 直也、SH3P2 は Myosin 1E の細胞質アンカーとして機能する、BMB2015 (第38回日本分子生物学会年会・第88回日本生化学会大会・合同大会)、平成27年12月2日、神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

(3) 谷村 進、Myosin1E による Caveolin1 の極性は間葉系様がん細胞の ERK 経路依存的な細胞運動を亢進させる、第37回日本分子生物学会年会、平成26年11月27日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(4) 谷村 進、Myosin 1E は局所的な Akt / S6K の活性化を引き起こすことで細胞運動を亢進する、第73回日本癌学会総会、平成26年9月26日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(5) 浜松 絢子、Myosin1E は Akt の局所的な活性化を介して細胞運動を亢進する、平成26年度日本生化学会九州支部例会、平成26年5月17日、九州大学病院キャンパス(福岡県・福岡市)

(6) 谷村 進、Myosin1E は Caveolin1-Cavin1/3 複合体の安定化を介して細胞運動を促進する、第86回日本生化学会大会、平成25年9月11日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

(7) 谷村 進、Myosin1E-SH3P2 複合体による細胞運動制御の分子機構、平成25年度日本生化学会九州支部例会、平成25年5月18日、佐賀大学本庄キャンパス(佐賀県・佐賀市)

## 6. 研究組織

### (1) 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)・助教  
研究者番号: 90343342

### (2) 研究分担者

武田 弘資 (TAKEDA, Kohsuke)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(薬学系)・教授  
研究者番号: 10313230

### (3) 研究協力者

有近 直也 (ARICHIKA, Naoya)  
浜松 絢子 (HAMAMATSU, Ayako)