

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17081008

研究課題名（和文） トランスポートソームにおける scaffold 蛋白の役割の解析

研究課題名（英文） Roles of scaffolding proteins in the formation of transportsome

研究代表者

畑 裕 (HATA YUTAKA)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：80313237

研究成果の概要（和文）：細胞接着とシグナル伝達の場合である細胞間結合の裏打ち蛋白が、膜蛋白（チャネル・受容体・接着分子）と細胞内のシグナル伝達分子・細胞骨格をつなぐ scaffold（足場）蛋白として機能して、分子複合体を形成し、シグナル伝達や膜蛋白の取り込みに重要な役割を果たすことを示した。また酵素活性をもつ蛋白が複数の分子と結合して scaffold 蛋白として機能し、しかも自らの酵素活性に依存して分子複合体の構成を変える例を見出し、scaffold 蛋白の概念を新たに示した。

研究成果の概要（英文）：Cell junctions are important not only for cell adhesion but also for signal transduction. Thereby, we focused on S-SCAM(MAGI2), MAGI1, and LNX1, all of which are localized at cell junctions. We revealed the roles of S-SCAM at excitatory and inhibitory synapses, of MAGI1 at kidney diaphragm, and of LNX1 in the endocytosis of a cell adhesion molecule named JAM4 during the epithelial and mesenchymal transition. We also identified RASSF6 as a new MAGI1-binding partner, which mediates apoptosis. A protein kinase named MST2 functions as a scaffold to assemble a complex including RASSF6 and blocks RASSF6-induced apoptosis. Once MST2 is activated, RASSF6 is released from the complex. This finding implies that MST2 is a dynamic scaffold to directly regulate protein interactions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	6,700,000	0	6,700,000
2006年度	22,000,000	0	22,000,000
2007年度	13,100,000	0	13,100,000
2008年度	13,000,000	0	13,000,000
2009年度	13,000,000	0	13,000,000
総計	67,800,000	0	67,800,000

研究分野：医学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：トランスポーター、チャネル、細胞接着、細胞極性、細胞死、シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

イオンや低分子を運ぶトランスポーター、チ

ヤネルは生体の恒常性維持に重要であり、その機能の制御様式の理解は、ヒトの身体の生

理と各種疾患の病態の理解に重要である。研究開始の時点で、トランスポーター、チャネルに関しては、一次配列の決定、立体構造の解析、生理学的手法による機能解析が広く行われ、個々の分子については、その性状について詳細な知見が得られていた。しかし、トランスポーター、チャネルが他の分子と相互作用することによって、機能を修飾される事例が見出され、個々の分子の研究のみでは、トランスポーター、チャネルの機能の全体を把握するには不十分であることが認識されつつあった。そこで、トランスポーター、チャネルと直接、間接に相互作用する分子複合体をトランスポートソームとして概念化することが提唱されるに至った。

2. 研究の目的

トランスポートソームが分子実体として存在することを明らかにするのが最終目的であるが、私どもは、とくに scaffold 蛋白の視点からトランスポートソームの実体を解明することを目指した。Scaffold 蛋白は、複数の分子間相互領域をもつ蛋白で、トランスポーター、チャネル、受容体のほか、各種のシグナル伝達分子、細胞骨格と結合し、多様な分子を集積させることによって、分子間の機能連関を実現する蛋白と定義づけられる。上皮細胞間結合や神経シナプスの膜裏打ち構造に分布する MAGI ファミリー蛋白は代表的な scaffold 蛋白である。研究開始時点では、神経シナプス特異的 MAGI 蛋白 S-SCAM(MAGI2)が、NMDA 型グルタミン酸受容体、接着分子 neuroligin、カテニンなどと結合すること、上皮細胞型 MAGI 蛋白 MAGI1 が接着分子 JAM4、アダプター分子 Carom などと結合することが明らかになっていった。本研究ではさらに MAGI 蛋白の仲立ちする新しい複合体を見出し、MAGI 蛋白の生理的機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1)S-SCAM(MAGI2)、MAGI1 に結合する分子の探索を酵母ツーハイブリッド法、tandem affinity purification 法で行った。

(2)S-SCAM(MAGI2)のノックアウトマウスの解析を行った。

(3)(1)のアプローチで得られた新しい相互作用分子とその関連分子について、細胞レベルの機能解析、試験管内での生化学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) S-SCAM(MAGI2)の新しい相互作用分子の同定:神経シナプスの scaffold 蛋白 S-SCAM に結合する分子として新たに dendrin を見出した。引き続き dendrin がチロシンキナーゼ

受容体の取り込みに関わる CIN85 と結合すること、S-SCAM が dendrin を介して CIN85 と複合体を形成することを明らかにした。CIN85 が神経シナプスに局在することを初めて明らかにした成果であり、S-SCAM がシナプスの受容体の取り込みに関与する可能性を示唆する。

(2)抑制性シナプスにおける S-SCAM 分子複合体の解明:ラット海馬神経細胞を用いて抑制性シナプスに S-SCAM が分布し、抑制性シナプスに特異的に発現する接着分子 neuroligin2 と dystroglycan の双方に結合し、両者を結びつける役割を果たすことを明らかにした。

(3)NMDA 型グルタミン酸受容体のシグナルを伝える scaffold 蛋白としての S-SCAM の役割の解析:S-SCAM のノックアウトマウスの解析を通じて、S-SCAM が NMDA 型グルタミン酸受容体の活性化の下流で、低分子量 G 蛋白 Rho を活性化しアクチン細胞骨格を動かし、樹状突起スパインの形態を制御する上で、必須の蛋白であることが明らかにした。

(4)接着分子 JAM4 の取り込みに関与する scaffold 蛋白の同定:JAM4 は MAGI1 の結合分子として同定された接着分子である。マウス乳腺上皮細胞 TGF を作用させると上皮細胞の間葉細胞化(EMT)が起こり、上皮細胞系接着分子の発現低下が起こる。JAM4 は EMT に際して細胞内に取り込まれる。この現象に LNX1 が必要であることを明らかにした。LNX1 は PDZ 領域をもつ scaffold 蛋白で、細胞極性の成立に重要な Numb と結合する。Numb は Notch 受容体の取り込みに関係することが知られているが、JAM4 の取り込みにも Numb が関係することを明らかにした。

(5)腎臓スリット膜の分子構築の解析:腎臓系球体スリット膜の分子実体である接着分子 nephrin と MAGI1 が直接結合し、スリット膜の中核的分子構築を提供することを明らかにした。

(6)RASSF6 と Hippo シグナル伝達系の関係の解明、および、scaffold 蛋白の概念の見直し:MAGI1 に結合する分子として新たに RASSF6 を同定した。RASSF6 は Ras 結合領域を持つ RASSF ファミリーのひとつで、C 末端に PDZ 結合モチーフをもち MAGI1 に結合する。RASSF6 は強力な細胞死誘導能を持つ一方で、蛋白リン酸化酵素 MST2 に結合し MST2 の活性を抑制する。MST2 は Hippo シグナル伝達系と命名された細胞死誘導・細胞増殖抑制をアウトプットとするシグナル伝達系の中核分子である。Hippo シグナル伝達系がオフのときは RASSF6 と MST2 は複合体を作り互いに機能を抑制しているが、Hippo シグナル伝達系をオンにする刺激が入ると RASSF6 が MST2 から乖離し、Hippo シグナル伝達系を介する細胞死と同時に、RASSF6 を介する細胞死がおこる

ことを明らかにした。MST2 はそれ自体が酵素活性を持つ分子であるが、RASSF6 のほかにも Salvador、MOB1 などのアダプター分子と結合し scaffold 蛋白としての性状をもつ。しかし、従来、scaffold 蛋白自体には積極的活性がないと理解されていたのに対して、MST2 は酵素活性をもち、結合分子をリン酸化することによって、相互作用の組換えを起こす。すなわち、MST2 は動的な scaffold 蛋白と位置づけられる。

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 14 件)

Nakagawa K, Sugahara M, Yamasaki T, Kajihō H, Takahashi S, Hirayama J, Minami Y, Ohta Y, Watanabe T, Hata Y, Katada T, Nishina H. Filamin associates with stress signaling kinases MKK7 and MKK4 and regulates JNK activation. *Biochem. J.* (2010) Epub ahead of print. 査読有

Bao Y, Sumita K, Kudo T, Withanage K, Nakagawa K, Ikeda M, Ohno K, Wang Y, Hata Y. Roles of mammalian sterile 20-like kinase 2-dependent phosphorylations of Mps one binder 1B in the activation of nuclear Dbf2-related kinases. *Genes Cells* 14 巻 12 号 1369-1381 (2009) 査読有

Ikeda M, Kawata A, Nishikawa M, Tateishi Y, Yamaguchi M, Nakagawa K, Hirabayashi S, Bao Y, Hidaka S, Hirata Y, Hata Y. Hippo pathway-dependent and -independent roles of RASSF6. *Sci Signal*. 2 巻 90 号 ra59 (2009) 査読有

Hirabayashi S, Nakagawa K, Sumita K, Hidaka S, Kawai T, Ikeda M, Kawata A, Ohno K, Hata Y. Threonine 74 of MOB1 is a putative key phosphorylation site by MST2 to form the scaffold to activate nuclear Dbf2-related kinase 1. *Oncogene* 27 巻 31 号 4281-4292 (2008) 査読有

Takahashi A, Hirai S, Ohtaka-Maruyama C, Miwa A, Hata Y, Okabe S, Okado H. Co-localization of a novel transcriptional repressor simiRP58 with RP58. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 368 巻 637-642 (2008) 査読有

Iida J, Ishizaki H, Okamoto-Tanaka M, Kawata A, Sumita K, Ohgake S, Sato Y, Yorifuji H, Nukina N, Ohashi K, Mizuno K, Tsutsumi T, Mizoguchi A, Miyoshi J, Takai Y, Hata Y. S-SCAM α is a scaffold to mediate NMDA receptor-dependent RhoA activation in dendrites. *Mol. Cell. Biol.* 27 巻 12 号 4388-4405 (2007) 査読有

Ikeda M, Hirabayashi S, Fujiwara N, Mori H, Kawata A, Iida J, Bao Y, Sato Y, Iida T, Sugimura H, Hata Y. Ras-association domain family protein 6 induces apoptosis via both caspase-dependent and caspase-independent pathways. *Exp. Cell Res.* 313 巻 7 号 1484-1495 (2007) 査読有

Sumita K, Sato Y, Iida J, Kawata A, Hamano M, Hirabayashi S, Ohno K, Peles E, Hata Y. S-SCAM/MAGI-2 is associated with cell adhesion molecules at inhibitory synapses at rat hippocampal neurons. *J. Neurochem.* 100 巻 1 号 154-166 (2007) 査読有

Fujiwara N, Ikeda M, Hirabayashi S, Mori H, Shirasawa M, Kansaku A, Sunamori M, Hata Y. Monoclonal antibody 7F9 recognizes rat protein homologous to human carboxypeptidase-M in rat developing and adult lung. *Respirology* 12 巻 1 号 54-62 (2007) 査読有

Nagamatsu G, Ohmura M, Mizukami T, Hamaguchi I, Hirabayashi S, Yoshida S, Hata Y, Suda T, Ohbo K. CTX family cell adhesion molecule, JAM4, expresses in stem cell- and progenitor cell populations of both male germ cell and hematopoietic cell lineages. *Mol. Cell. Biol.* 24 巻 8498-8506 (2006) 査読有

Kansaku A, Hirabayashi S, Mori H, Fujiwara N, Kawata A, Ikeda M, Rokukawa C, Kurihara H, Hata Y. Ligand-of-Numb protein X is an endocytic scaffold for junctional adhesion molecule 4. *Oncogene* 25 巻 37 号 5071-5084 (2006) 査読有

Kawata A, Iida J, Ikeda M, Sato Y, Mori H, Kansaku A, Sumita K, Fujiwara N, Rokukawa C, Hamano M, Hirabayashi S, Hata Y. CIN85 is localized at synapses and forms a complex with S-SCAM via Dendrin. *J. Biochem.* 139 巻 5 号 931-939 (2006) 査読有

Uchida T, Shirasawa M, Ware LB, Kojima K, Hata Y, Makita K, Mednick G, Matthay ZA, Matthay MA. Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I cell injury in acute lung injury. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 173 巻 9 号 1008-1015 (2006) 査読有

Hirabayashi S, Mori H, Kansaku A, Sakai H, Shimizu F, Kawachi H, Hata Y. MAGI-1 is a component of the glomerular slit diaphragm that is tightly associated with nephrin. *Lab. Invest.* 85 巻 12 号 1528-1543 (2005) 査読有

[学会発表](計 14 件)

池田光伸、畑裕 : 「Hippo pathway-dependent and -independent roles of RASSF6」 第 82 回日本生化学会大

会 シンポジウム「細胞死・細胞増殖制御を司る新しいシグナル伝達系 Hippo pathway」2009年10月24日 神戸

Yutaka Hata: Dual roles of RASSF6 in mammalian Hippo pathway. The Hippo Tumor Suppressor Pathway: A Brainstorming Workshop. April 22, 2009. Rome, Italy.

Yutaka Hata: The regulatory mechanism of RASSF6-mediated cell death. First International RASSF Symposium. February 6, 2009. Banff, Canada.

中川健太郎、包義君、工藤琢己、壽美田一貴、畑 裕：「アダプター分子 MOB1 のリン酸化が Nuclear Dbf2-related キナーゼファミリーの選択的な活性化を制御する」第 31 回日本分子生物学会年会、第 81 回日本生化学会大会平成 20 年 12 月 10 日ポスター発表、12 月 11 日口頭発表 神戸

大掛真太郎、中川健太郎、池田光伸、壽美田一貴、畑 裕：「RASSF3 による細胞死誘導の解析」第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会 平成 19 年 12 月 14 日 横浜

川田現、池田光伸、飯田純子、包義君、中川健太郎、平林享、日高志穂、畑 裕：「RASSF6 と Mammalian Sterile 20-like kinase (MST) 2 の相互作用とその機能の解析」第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会平成 19 年 12 月 14 日 横浜

日高志穂、中川健太郎、平林享、壽美田一貴、川田現、河合朋光、畑 裕：「MST2 と MOB1 による Nuclear Dbf2-related kinase 1 の活性化機構とその生理的意義の検討」第 30 回日本分子生物学会年会、第 80 回日本生化学会大会平成 19 年 12 月 14 日横浜

Yutaka Hata: Linkage of membrane proteins to the actin cytoskeleton by members of the MAGI family of junction scaffold proteins. Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin Abteilung Molekulare Neurobiologie December 13, 2006. Goettingen, Germany

平林享、藤原直之、畑裕：「新規 RASSF ファミリー分子 RASSF6 の細胞増殖制御機構の解析」第 65 回日本癌学会学術総会平成 18 年 9 月 28 日横浜

畑裕、飯田純子、壽美田一貴、川田現、佐藤勇次：「シナプス接着分子 neuroligin を裏打ちする足場蛋白 S-SCAM/MAGI-2 が司る蛋白相互作用」第 28 回日本生物学的精神医学会、第 36 回日本神経精神薬理学会、第 49 回日本神経化学会大会合同年会 NC 理事会企画オープンシンポジウム 平成 18 年 9 月 14 日 名古屋

壽美田一貴、佐藤勇次、川田現、飯田純子、大野喜久郎、畑裕：「抑制性シナプスにおける S-SCAM の解析」第 29 回日本神経科学学会大会平成 18 年 7 月 19 日京都

平林享、神作愛、池田光伸、川田現、藤原直之、森弘樹、六川千秋、栗原秀剛、畑裕：「Ligand-of-Numb protein X is an endocytic scaffold for junctional adhesion molecule 4」20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress in conjunction with 79th Annual Meeting of the Japanese Biochemical Society and 29th Annual Meeting of the Molecular Biology Society for Japan 平成 18 年 6 月 20 日 京都

平林享、神作愛、畑裕：「腎臓糸球体スリット膜を支える分子複合体の解析」生理学研究所研究会「生体膜分子複合体の分子構築と生理機能」平成 17 年 7 月 19 日 岡崎

飯田純子、畑裕：「足場蛋白 S-SCAM によるシナプス分子複合体の形成」生理学研究所研究会「分子複合体と神経シナプス機能」平成 17 年 6 月 23 日岡崎

〔図書〕(計 1 件)

Hirabayashi S, Hata Y. JAM family proteins: tight junction proteins that belong to the immunoglobulin superfamily. 43-53 "Tight Junctions" edited by Gonzalez-Mariscal, L. Landes Biosciences (Texas) Springer (New York) (2006) 査読有

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

畑 裕 (HATA YUTAKA)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・教授

研究者番号：80313237

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

中川 健太郎 (NAKAGAWA KENTARO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・助教

研究者番号：70451929

池田 光伸 (IKEDA MITSUNOBU)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・助教

研究者番号：00451930