

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：33902
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2021
課題番号：18K06958
研究課題名(和文) RSKキナーゼ群の機能差を生み出す分子基盤の解明と阻害剤による乳がん抑制への応用

研究課題名(英文) test

研究代表者
福田 信治 (Fukuda, Shinji)
愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：70398238
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：シグナル伝達経路を構成するリン酸化酵素群(キナーゼ)は、細胞増殖を始めとする多彩な生命現象を制御することが広く知られている。しかし、個々のキナーゼメンバーが特異的に持つ役割や、他のメンバーとの機能差を生み出す分子機構には不明な点が多い。本研究は、乳がんなど様々ながんで高発現を示すp90 Ribosomal S6 Kinase (RSK)ファミリーをモデルとして、乳腺細胞におけるRSKファミリーの役割と、それを支える分子基盤の解明を目的とする。本研究では、CRISPR-Cas9によるGFPノックイン細胞の樹立と質量分析によるRSK結合因子の同定を試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

RSKファミリーのキナーゼはEGF経路の構成因子であるため、がん促進に関与すると考えられてきた。実際、RSK1とRSK2が乳がんや前立腺がんなど様々な細胞の増殖を促進することが報告され、RSKを阻害する化合物は抗がん剤として有用と考えられてきた。しかし最近になって、高度に保存されたRSK4とRSK4は逆にがん抑制因子として作用する可能性が示唆されている。本研究テーマは、キナーゼ阻害剤をベースとした薬剤開発に重要であり、がんを始めとするシグナル伝達異常疾患の治療戦略として大きな意義を持つ。

研究成果の概要(英文)：Kinases in signal transduction pathway regulate a wide variety of biological events, including cell growth and differentiation. However, roles of individual kinase members and the molecular mechanisms that generate functional differences remain elusive. Using the p90 Ribosomal S6 Kinase (RSK) family as a model, we tried to elucidate the role of the RSK family in mammary epithelial cells. In this study, we attempted to establish GFP knock-in cells by CRISPR-Cas9 technology and to identify RSK binding proteins by mass spectrometry.

研究分野：分子生物学

キーワード：乳がん細胞 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

シグナル伝達経路を構成するリン酸化酵素群 (キナーゼ) は、細胞の増殖、運動、接着を始めとする様々な生命現象を制御することが多くの論文で報告されている。一方で、キナーゼは保存された構造を持つ分子群とファミリーを形成するが、個々のキナーゼメンバーが特異的に持つ役割は何か、というファミリーとしての包括的な理解には至っていない。この点は、学術的に重要であると同時に、薬剤の特異性や副作用に関わる疾患治療の問題でもある。申請者が研究対象とする p90 Ribosomal S6 Kinase (RSK) ファミリーは、構造的に保存された RSK1, RSK2, RSK3, RSK4 からなるセリンスレオニンキナーゼであり、MAPK 経路下流で ERK によるリン酸化を受ける。MAPK 経路は抗がん剤の標的として想定されているが、特異性の高い薬剤開発が引き続き続けられており、各分子の詳細な機能解析は依然として不可欠な状況にある。

2. 研究の目的

本研究は、乳腺上皮細胞株 MCF10A を用いて、RSK ファミリーの機能解析、及びそれを支える分子基盤を解明することを目的とする。具体的には、内在性 RSK2 の細胞内移動をイメージングするとともに、質量分析を用いて RSK2 複合体の解析を行い、RSK と特異的に相互作用する蛋白質を同定する。また米国 Vanderbilt 大学で同定された RSK 阻害剤 SL0101 を基本骨格とする派生物群について、阻害活性の評価を行い、乳がんに対する薬剤開発に貢献する。

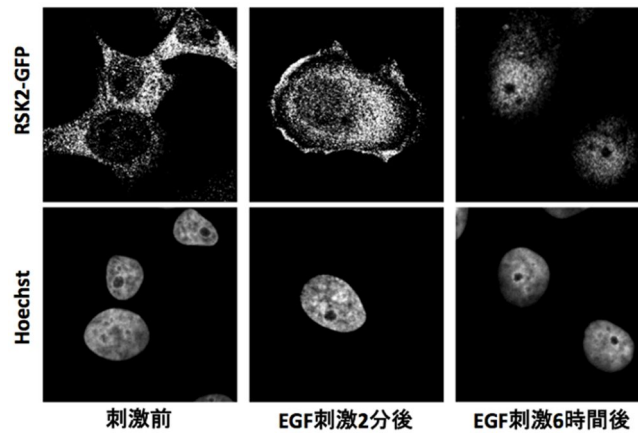
3. 研究の方法

申請者はヒト乳腺細胞株 MCF10A の細胞運動・接着制御において RSK2 が重要な役割を果たすことを報告している (Fukuda et al, Sci Rep, 2016)。また研究協力者である Deborah Lannigan 博士 (Vanderbilt 大学) は、ER 陽性乳がん細胞株 MCF7 において、RSK2 の核移行に関する分子メカニズムを明らかにしている (Ludwik et al, Cancer Res, 2018)。そこで本研究では、RSK2 の核外局在に関わるアミノ酸配列を同定するとともに、RSK2 を細胞外に留める相互作用分子について、質量分析による同定を試みた。また RSK のキナーゼ活性阻害は新たな抗がん剤候補として有用であるため、既存の RSK 阻害剤である SL0101 を元に改変化合物を合成し、阻害活性を解析した。

4. 研究成果

(1) RSK2 を可視化できる MCF10A の樹立

CRISPR/Cas9 システムを使って輝度の高い蛍光分子である super folder GFP (sfGFP) を RSK2 遺伝子座に挿入した MCF10A を樹立した。sfGFP によって標識された内在性 RSK2 は EGF 刺激によって核内に移行することが確認できた。



RSK ファミリーの分子には核外移行に関わる配列が存在することが示唆されている (J. Invest. Dermatol., 2012)。ただし当該配列が実際に機能するかどうかは報告されていないため、典型的な核外移行シグナルに重要とされるロイシンをアラニンに置換した変異体発現を構築した。レンチウイルスベクターを用いて一連のコンストラクトを MCF10A に導入し、EGF 刺激後に細胞内局在を観察したところ、いずれの変異体も核移行が認められた。したがって今回検討した配列は少なくとも核移行を妨げないが、積極的に RSK2 を核から排出させる配列ではないと考えられた。ただしアミノ酸置換によって野生型に比べて発現量の低下が認められたことから、異常な立体構造変化を引き起こしている可能性がある。

(2) 質量分析による RSK 複合体構成因子の同定

RSK2-GFP 融合タンパク質をノックインした乳腺上皮細胞 MCF10A から、GFP 抗体を使った免疫沈降により RSK2 複合体の単離を試みた。その結果、RSK2-GFP は確かに沈降されてくるものの、共沈される因子がほとんど検出されなかった。沈降の条件検討に加えて、キナーゼという RSK2 分子自体の特性から、他の分子との相互作用が一過的な可能性が高く、質量分析による因子同定が困難な可能性が考えられた。

次に、近傍標識酵素 BirA, APEX を C 末に融合した RSK2 コンストラクトを構築し、ビオチン化される分子の同定を行うこととした。この実験から、確かにビオチン化タンパクが存在することは明らかになったが、その量が想定よりも少なく、ビオチン化効率があまり高くないことが分かった。この点を改善するために、BirA 改変酵素である TurboIDc と RSK2 の融合タンパク質を発現するコンストラクトを構築した。まず 293T 細胞で検討を行ったところ、確かに BirA よりも活性がかなり高いことが分かった。この実験系はキナーゼのような一過的相互作用によって機能する分子の複合体解析に有用であると考えられる。

(3) RSK 阻害剤 SL0101 及びその派生化合物の開発

熱帯植物から単離された化合物 SL0101 は RSK ファミリー、特に RSK2 を特異的に阻害するため、複数のキナーゼに作用する化合物と比較して、特異性が高いと考えられている。この特異性を保ちつつ、さらに効果を高めるため、Vanderbilt 大学との共同研究として派生化合物の合成とキナーゼの阻害活性を測定した。このうちの 1 つ、化合物 X は特異性と効果に優れていることが明らかになったため、構造解析によってさらなる改良を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 福田信治, 福田尚代, Deborah A. Lannigan, 東山繁樹
2. 発表標題 Intracellular localization of Ribosomal S6 Kinase 2 (RSK2) and its effects on cell-cell adhesion
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田信治, 福田尚代, Deborah A. Lannigan, 東山繁樹
2. 発表標題 Ribosomal S6 Kinase 2 (RSK2) は核外移行シグナルによって核と細胞質をシャトルする
3. 学会等名 第60回日本生化学会中国四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松木依理奈, 近藤綾乃, 楠本智章, 藤原章, 坂上倫久, 前川大志, 藤崎亜耶子, 福田信治, 東山繁樹, 中山寛尚
2. 発表標題 Cullin-3ユビキチン複合体によるshedding制御
3. 学会等名 第59回日本生化学会中国四国支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shinji Fukuda, Hisayo Nishida-Fukuda, Subaru Sakamoto, Deborah A. Lannigan, Shigeki Higashiyama
2. 発表標題 Regulation of the intracellular localization of Ribosomal S6 Kinase 2 (RSK2) by EGF
3. 学会等名 プロテインアイランド松山2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福田 信治、福田 尚代、Deborah A. Lannigan、東山 繁樹
2. 発表標題 増殖因子によるRibosomal S6 Kinase 2 (RSK2)の細胞内局在制御機構
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	福田 尚代 (西田尚代)	関西医科大学・医学部・助教	
	(Fukuda Hisayo)		
	(00802703)	(34417)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Vanderbilt University		