

令和 5 年 6 月 24 日現在

機関番号：34521

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K07213

研究課題名(和文) Sav1-Hsp60蛋白質複合体の細胞がん化・転移能獲得への関与の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the implication of the Sav1-Hsp60 protein complex in the processes of cell carcinogenesis and the acquisition of metastatic capability.

研究代表者

酒井 伸也 (Sakai, Nobuya)

姫路獨協大学・薬学部・講師

研究者番号：30525077

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：Hippo経路において、Sav1はアダプター蛋白質として主要な役割を担っている。我々は以前、Sav1がHsp60と相互作用する事を明らかとした。本研究では、近位依存性ビオチン標識(BioID)を用いて、Sav1-Hsp60と相互作用する蛋白質複合体の同定、および細胞がん化・転移能獲得への関与の解明を目的とした。BioID-Sav1融合蛋白質を発現するHEK293細胞を用いて、精製した融合Sav1蛋白質複合体を得た。これらの精製蛋白質を質量分析で解析した結果、Hsp90を含む新たな相互作用蛋白質のシグナルを検出した。今後、これらの蛋白質複合体の細胞生理学的な役割を明らかにして行く予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Hippoがん抑制情報伝達経路におけるアダプター蛋白質として知られるSav1は、詳細な細胞生理学的機能について不明点が多く解明が待たれる。本研究では、近位依存性ビオチン標識(BioID)を用いて、Sav1-Hsp60と相互作用する蛋白質複合体の同定、および細胞がん化・転移能獲得への関与の解明を目的とした結果、Hsp90を含む新たなSav1相互作用蛋白質のシグナルを質量分析により検出した。今後、これらの蛋白質複合体の細胞生理学的な役割が明らかになれば、がん細胞の発生、がん細胞の転移・進展を制御する新たな分子メカニズムの解明、ひいては再生医療や新たな分子標的薬の開発に貢献できると期待される。

研究成果の概要(英文)：In the Hippo signaling pathway, Sav1 assumes a crucial role as an adapter protein. Previously, we have demonstrated the interaction between Sav1 and Hsp60. Within this investigation, our objective was to discern the protein complex that interacts with Sav1-Hsp60 and elucidate its implications in cell carcinogenesis and the acquisition of metastatic potential through the utilization of proximity-dependent biotin identification (BioID). HEK293 cells that expressed the BioID-Sav1 fusion protein were employed to obtain a purified fusion Sav1 protein complex. Subsequent analysis of these purified proteins via mass spectrometry identified novel signals indicating interactions with previously unidentified proteins including Hsp90. Our future endeavors involve the elucidation of the cellular physiological functions exhibited by these intricate protein complexes.

研究分野：分子生物学

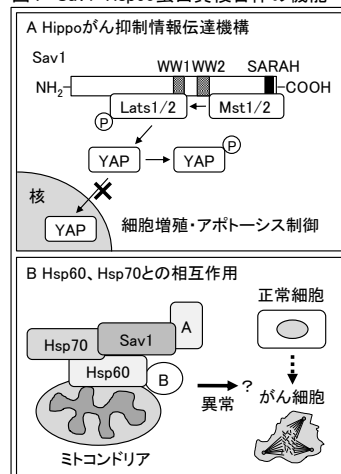
キーワード：Hippo経路 Sav1 BioID

1. 研究開始当初の背景

変異体ショウジョウバエの研究より、高度に保存された Hippo がん抑制情報伝達経路 (Hippo、Salvador、Warts) が見出された。Hippo 情報伝達分子の哺乳動物ホモログ (Mst1/2、Sav1、Lats1/2) はリン酸化カスケードにより、細胞増殖・アポトーシスの制御に関与している。特に、Sav1 は2つの WW ドメイン、SARAH (Salvador、RASSF1、Hippo) ドメインを有し、Hippo 情報伝達経路のアダプター蛋白質として主要な役割を担っている (図1 A、Nat Rev Cancer. 2015, 15: 73-9.)。

我々はタンデムアフィニティー精製により、分子シャペロン (Hsp60、Hsp70) が、Sav1 の新規結合蛋白質であることを見出した (図1 B、第33回日本分子生物学会年会 2010 発表、アメリカ生化学・分子生物学会年会 2012 発表)。Hsp60 はミトコンドリア分子シャペロンとして、Hsp70 と協調してミスフォールド蛋白質のリフォールディング、アグレソームの分解の他、細胞のがん化ならびに転移の過程にも関与する事が明らかとなっている (Nature. 2017, 543: 443-6.、Trends Pharmacol Sci. 2017, 38: 226-56.)。しかし、Sav1-Hsp60 蛋白質複合体形成と細胞がん化・転移能獲得との関連についての詳細は不明である。

図1 Sav1-Hsp60蛋白質複合体の機能



2. 研究の目的

近年、BioID が開発され、共免疫沈降法では検出が困難な一過性あるいは弱い相互作用を有する蛋白質複合体形成を、生細胞でモニターする事が可能である。

本研究は、当初ヒト乳腺上皮細胞 MCF10A に BioID をノックインし、①Sav1-Hsp60 と相互作用する、新たなミトコンドリア蛋白質複合体を高感度で同定し、②Sav1-Hsp60 蛋白質複合体の細胞がん化・転移能獲得への関与を明らかにすることを目的とした。本研究は、申請者のこれまでの研究成果ならびに独自のアイデアに基づいており、Hippo がん抑制情報伝達経路が作用する新機軸を見出す事を目指した。

3. 研究の方法

Sav1-Hsp60 蛋白質複合体の同定

① BioID-Sav1 融合蛋白質の一過性発現による予備実験

近年、*E. coli* 由来のビオチンリガーゼ : BirA_R118G (BioID、321aa) に比較して、分子量が小さくビオチン化の効率が低い、超好熱性真正細菌由来のビオチンリガーゼ (BioID2、233aa) が見出された (Mol Biol Cell. 2016, 27: 1188-96.、発現プラスミドは Addgene より入手)。

予備実験として、遺伝子導入効率の高い HEK293 細胞に、BioID2-Sav1 融合蛋白質を一過性発現させ、ウェスタン・ブロッティング法にて融合蛋白質の発現を確認した。

② BioID を用いた Sav1 蛋白質複合体の同定

(a) BioID2 ノックイン細胞の作製

申請者らは細胞分画法を用いた生化学的解析により内在性 Sav1 が当初予想されていたより様々な細胞内小器官に局在しうる可能性が示唆されたため、当初の実験計画を修正し BioID-Sav1 融合蛋白質を発現する構築を作製し、HEK293 細胞のゲノム上に相同組換えにより挿入し BioID-Sav1 融合蛋白質を発現する細胞を作製した。免疫組織化学的手法を用いて細胞内局在を可視化させた所、細胞分画法を用いて得られた結果と同様の結果を見出したが、遺伝子発現誘導後 48 時間以上経過すると融合蛋白質の凝集が観察された。この結果を踏まえて、融合蛋白質の発現量を減じるなどの条件検討を行い、大量培養を行った。

(b) Sav1-Hsp60 蛋白質複合体の同定

ビオチン化した遺伝子改変 HEK293 細胞を可溶化し、ストレプトアビジンビーズを用いてビオチン化蛋白質を精製した。精製した融合 Sav1 蛋白質複合体を電気泳動で分離後銀染色を行い相互作用蛋白質のバンドを検出した。これらの精製蛋白質をさらに夾雑物を減じる条件検討を行い、質量分析で解析した結果、Hsp90 を含む新たな相互作用蛋白質のシグナルを検出した。今後、これらの蛋白質複合体の細胞生理学的な役割を明らかにして行く予定である。

4. 研究成果

Hippo がん抑制情報伝達経路におけるアダプター蛋白質として知られる Sav1 は、詳細な細胞生理学的機能について不明点が多く解明が待たれる。本研究では、近位依存性ビオチン標識 (BioID) を用いて、Sav1-Hsp60 と相互作用する蛋白質複合体の同定、および細胞がん化・転移能獲得への関与の解明を目的とした。

内在性 Sav1 が当初予想されていたより様々な細胞内小器官に局在しうる可能性が示唆されたため、当初の実験計画を修正し BioID-Sav1 融合蛋白質を発現する構築を作製し、HEK293 細胞のゲノム上に相同組換えにより挿入し BioID-Sav1 融合蛋白質を発現する細胞を作製した。ビオチン化した遺伝子改変 HEK293 細胞を可溶化し、ストレプトアビジンビーズを用いてビオチン化蛋白質を精製した。これらの精製蛋白質を質量分析で解析した結果、結果、Hsp90 を含む新たな Sav1 相互作用蛋白質のシグナルを質量分析により検出した。

我々は以前、Hsp60、Hsp70 が Sav1 結合蛋白質である事を見出したが、今回新たに Hsp90 が、Sav1 相互作用蛋白質であることが示唆された。これらの熱ショックタンパク質と Sav1 との相互作用によって、熱ショックタンパク質が Hippo 経路の標的タンパク質や関連する因子を安定化することが考えられるほか、Hippo 経路のシグナル伝達において熱ショック応答が調節される可能性がある。また、Hippo 経路がストレス応答と結び付けられた機能にも関与している可能性も考えられる。この相互作用が Hippo 経路の活性化や抑制にどのように関与するかは、さらなる研究が必要である。

今後、これらの蛋白質複合体の細胞生理学的な役割が明らかになれば、がん細胞の発生、がん細胞の転移・進展を制御する新たな分子メカニズムの解明、ひいては再生医療や新たな分子標的薬の開発に貢献できると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内田和彦、酒井伸也、柴田克志
2. 発表標題 Sav1とダイナミックに相互作用する 新規結合タンパク質の同定の試み
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022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	柴田 克志 (Shibata Katsushi) (70296565)	姫路獨協大学・薬学部・教授 (34521)	

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
---------	---------