

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目:若手研究(B)

研究期間:2007 年度～2008 年度

課題番号:19790794

研究課題名(和文) ケラチノサイトの接着と運動における MAPKKK キナーゼ MINK の役割

研究課題名(英文) Functional analysis of a MAP4K, MINK in adhesion and movement of keratinocytes.

研究代表者

武居 公子 (TAKEI KIMIKO)

国立大学法人琉球大学・医学研究科・助教

研究者番号 90325861

研究成果の概要:

MINK は低分子量 G 蛋白質 Rap2 により活性化される。MINK 結合蛋白として足場蛋白 TANC1 を同定した。MINK は Rap2 により活性化され、TANC1 をリン酸化した。Rap2、MINK、TANC1 および TANC1 と結合する PSD95 や SAP97 等の足場蛋白もケラチノサイト細胞株の細胞間接着部位に局在したので、MINK 系は足場蛋白との結合やリン酸化によって接着や運動を制御する可能性がある。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	450,000	3,750,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目:内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード:ケラチノサイト、細胞間接着、MAPKKK キナーゼ、Rap2

1. 研究開始当初の背景

(1) MINK はストレス応答性 MAP キナーゼ (JNK, p38) を制御する MAPKKK キナーゼであり、私共は MINK に類似したキナーゼ NIK と TNIK が ras 癌遺伝子産物の類縁分子 Rap2 により活性化される標的分子であると報告した。

(2) Rap2 と MINK は培養ケラチノサイト細胞株 (Pam212) の細胞間接着部位に共局在して観察

されることから、両者はこの細胞株の接着や運動に関与する可能性が高いと考えられた。

2. 研究の目的

ケラチノサイトの接着と運動における Rap2-MINK 系の機能を解明し、創傷治癒や癌の浸潤・転移機構の一端を明らかにすること。

3. 研究の方法

(1) 低転移性株 Pam212 と Pam212 の娘株であり、

Rap2の発現を欠く高転移性株のLY-1を用いてMINK または Rap2 を RNAi して HGF による scattering や wound healing assay を行った。

(2) MINK の結合分子を検索するためラット脳を用いたアフィニティー精製をおこなった。検出された分子については免疫染色をおこない細胞内局在を観察した。

4. 研究成果

(1) Pam212 はマウスに接種すると有棘細胞癌の原発巣を形成するが殆ど転移しない低転移性株である。一方、Pam212 にはまれな転移巣から樹立された娘株が存在するが、これらはマウスに接種すると高率に転移する高転移性株である(LY-1,LY-2,LY-8,LU-1、図 1A)。Pam212 細胞は敷石状の細胞形態であるが(図 1A、パネル a)娘細胞は紡錘型で線維芽細胞様であった(図 1A、パネル b-e)。各細胞株における Rap2 の発現を Western 解析で調べた所、これら娘株では Rap2 の発現が著減していた(図 1B 上パネル)。解析のコントロールとして同じ membrane を用いて Rap2 の類縁体である Rap1 の発現も調べたが、株間での発現に差はなかった(図 1B 下パネル)。MINK と Rap2 は Pam212 の細胞間接着部位に局在するので両者の細胞接着と運動への関与が示唆された。

(2) ケラチノサイトの細胞接着と運動における MINK と Rap2 の機能を調べるために RNAi 法を用いて Pam212 細胞の MINK の発現をノックダウンした。RNAi ベクターが導入された細胞は GFP マーカーで識別した(図 2A、パネル a)。抗 MINK 抗体による免疫染色では GFP 陽性細胞に一致して MINK の発現消失が確認された(図 1A、パネル b, c)。RNAi ベクター導入による MINK ノックダウンは Western 解析でも確認された。コントロールの Pam212 細胞では 150kD 付近に MINK のバンドが検出されたが(図 2B、左パネル、レーン左側)、RNAi ベクターを導入した Pam212 細胞では MINK のバンドは検出されなかった(図 2B、左パネル、レーン右側)。LY-1 細胞でも MINK をノックダウンした。コントロールの LY-1 細胞では 150kD 付近に MINK のバンドが検出されたが(図 2B、右パネル、レーン左側)、RNAi ベクターを導入した LY-1 細胞では MINK のバンドは検出されなかった(図 2B、右パネル、レーン右側)。Pam212 細胞では Rap2 の発現もノックダウンした。RNAi ベクターが導入された細胞は GFP マーカーで識別した(図 2C、パネル a)。抗 Rap2 抗体による免疫染色では GFP 陽性細胞に一致して Rap2 の発現消失が確認された(図 1C、パネル b, c)。RNAi ベクター導入による Rap2 ノックダウンは Western 解析でも確認された。コントロールの Pam212 細胞では 20kD 付近に Rap2 のバンドが検出されたが(図 2D、左パネル、レーン左側)、RNAi ベクターを導入した Pam212 細胞では Rap2 の発現はほぼ抑制された(図 2D、左パネル、レ

ーン右側)。

(3)MINK-Rap2 系が細胞の集団遊走に与える影響を調べるために Pam212 細胞と MINK または Rap2 を RNAi した Pam212 細胞を用いて wound healing assay をおこなった。細胞をシート状に培養したのちプラスチックチップを用いて線状に細胞を除去し、24 時間後に定点観察した。Pam212 細胞では除去直後(0h、図 3A、パネル a)と比較して 24 時間後には wound の幅が 4/5 程になった(図 3A、パネル b)。MINK をノックダウンした Pam212 細胞では除去直後(0h、図 3A、パネル c)と比較して 24 時間後には wound の幅が 1/2 程になり(図 3A、パネル d)、Rap2 をノックダウンした Pam212 細胞では除去直後(0h、図 3A、パネル e)と比較して 24 時間後には wound の幅が 1/3 程になった(図 3A、パネル f)。MINK または Rap2 の RNAi により細胞遊走が促進されたことから(図 3)、Rap2-MINK 系が細胞間接着を強化し細胞運動を抑制してこの細胞株の集団遊走を負に制御すると考えた。

次に MINK-Rap2 系が細胞の HGF による遊走離散反応に与える影響をみるために Pam212 細胞および LY-1 細胞と MINK または Rap2 を RNAi した Pam212 細胞、MINK を RNAi した LY-1 細胞を用いて scattering assay をおこなった。島状にコロニーを形成した細胞に HGF を添加して 24 時間刺激し、細胞が遊走・離散する様子を定点観察した。Pam212 細胞では 0h (図 3B、パネル a)と比較して HGF 刺激 24 時間後には細胞の増殖はみられたが遊走離散反応はみられなかった(図 3B、パネル b)。MINK を RNAi した Pam212 細胞では 0h (図 3B、パネル c)と比較して HGF 刺激 24 時間後には細胞の増殖はみられたが遊走離散反応はみられなかった(図 3B、パネル d)。Rap2 を RNAi した Pam212 細胞では 0h (図 3B、パネル e)と比較して HGF 刺激 24 時間後には細胞の増殖はみられたが scattering 反応はみられなかった(図 3B、パネル f)。LY-1 細胞では 0h (図 3B、パネル g)と比較して HGF 刺激 24 時間後にはある程度の scattering 反応がみられた(図 3B、パネル h)。MINK を RNAi した LY-1 細胞では 0h (図 3B、パネル i)および LY-1 細胞の 24 時間後(図 3B、パネル h)と比較して HGF 刺激 24 時間後には細胞の scattering 反応が促進された(図 3B、パネル j)。MINK を RNAi した LY-1 細胞では HGF による scattering がより促進されたが Pam212 で MINK や Rap2 を RNAi しても HGF による scattering が見られないことから、Rap2-MINK 系以外の機構も細胞間接着の強化と細胞運動の抑制に寄与している可能性があると思われた。

(4) MINK の結合分子を検索するためにラット脳を用いたアフィニティー精製を行った。その結果、MINK の結合蛋白としてシナプス後部足場蛋白である TANC1 を同定した。MINK, Rap2, TANC1 の細胞内相互作用を確認するため、

293T 細胞に myc タグ付きの TANC1 (Myc-hTANC1)、HA タグ付きの MINK(HA-mMINK)、GFP タグ付きの Rap2 (GFP-hRap2A)を発現させて蛋白を回収し、各タグを認識する抗体を用いた Western 解析でリン酸化によるバンドシフトを観察した。Myc-hTANC1 のみを発現させたとき TANC1 はバンドシフトしなかった(図 4A、上パネル、レーン 1, 4)。Myc-hTANC1 と HA-mMINK を共発現させると TANC1 のバンドシフトが見られた(図 4A、上パネル、レーン 2)が、MINK のバンドシフトは見られなかった(図 4A、中パネル、レーン 2)。Myc-hTANC1 と HA-mMINK、GFP-hRap2A を共発現させると TANC1 のバンドシフトは HA-mMINK のみと共発現させた時よりも促進され(図 4A、上パネル、レーン 3)、HA-mMINK のバンドシフトも見られた(図 4A、中パネル、レーン 3)。以上より MINK は細胞内で Rap2 により活性化され、TANC1 をリン酸化することが明らかになった。

次に Rap2, MINK, TANC1 の細胞内局在を免疫染色で観察した。MINK は Pam212 細胞の細胞間接着部位に集積し(図 4B、パネル a)、細胞間接着部位では Rap2(図 4B、パネル b)、actin (図 4B、パネル c)と共局在した(図 4B、パネル d)。また、MINK(図 4B、パネル e)、TANC1(図 4B、パネル f)は Pam212 細胞の細胞間接着部位に共局在していた(図 4B、パネル g)。TANC1 は PSD95 や SAP97 等のシナプス後部足場蛋白と複合体を形成するが、免疫染色の結果、SAP97 も Pam212 細胞の細胞間接着部位に局在し(図 4B、パネル h)、actin(図 4B、パネル i)と共局在した(図 4B、パネル j)ので、Rap2-MINK 系は足場蛋白との結合やリン酸化によってセラチノサイトの細胞間接着や運動を制御する可能性がある。一方、Rap2 は線維芽細胞株である NIH3T3 細胞に発現させると核近傍に集積して観察される。核近傍には Golgi 体、endosome、lysosome などの細胞内小器官が有るので、これらの識別が容易な COS-1 細胞を用いて Rap2 の細胞内局在を検討した。COS-1 細胞に HA タグ付きの hRap2A と recycling endosome marker であり GFP タグ付きの Rab11、Rab8、Vamp3 を共発現して細胞内局在を観察した。COS-1 細胞では Golgi 体が環状に観察され(図 4C、パネル a-c)、その内部に recycling endosome が認められるが、HA-hRap2A は Golgi marker である GM130 の ring 内に染色された(図 4C、パネル d-f)。recycling endosome marker である Rab11(図 4C、パネル g)、Rab8(図 4C、パネル h)、Vamp3(図 4C、パネル i)はそれぞれ GM130 の ring 内に局在した。HA-hRap2A は recycling endosome marker である GFP-Rab11(図 4C、パネル j)、GFP-Rab8(図 4C、パネル k)、GFP-Vamp3(図 4C、パネル l)と共局在し、Rap2 が recycling endosome に局在することが明らかになった。一方、Myc タグ付きの Rap2 は単独で COS-1 に発

現させると recycling endosome に局在し(図 4D、パネル a)、MINK の類縁 MAP4K である HA タグ付きの hTNIK1 は単独で COS-1 に導入すると細胞質全体に瀰漫性に発現する(図 4D、パネル b)。両者を共発現すると Rap2 は recycling endosome に(図 4D、パネル c)、TNIK は細胞膜に移行するとともに(図 4D、パネル d) recycling endosome で Rap2 と共局在した(図 4D、パネル e)。私共は既に TNIK も Rap2 の effector であることを報告しており、TNIK は Rap2 との相互作用により細胞膜に配向されたと考えた。上皮系細胞では E-cadherin や integrin b が recycling endosome を経由して細胞間接着部位に配向されるので、おそらく MINK も Rap2 との相互作用により細胞間接着部位に配向され、TANC1 や SAP97 等の足場蛋白との結合およびリン酸化を介してセラチノサイトの細胞接着や運動を制御していると考えられた。本研究によって Rap2 の新規エフェクターとして MINK を同定した。MINK は Rap2 により細胞間接着部位に配向され、足場蛋白である TANC1 と結合、リン酸化することでセラチノサイトの細胞間接着や運動に関与すると考えられた。

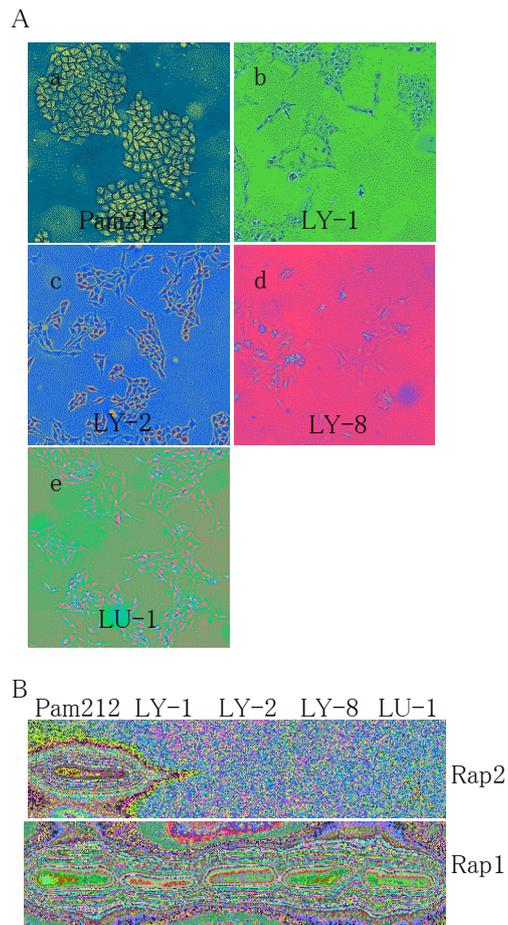


図 1. A. Pam212 および高転移性娘細胞株と B. 各細胞株における Rap2 の発現解析

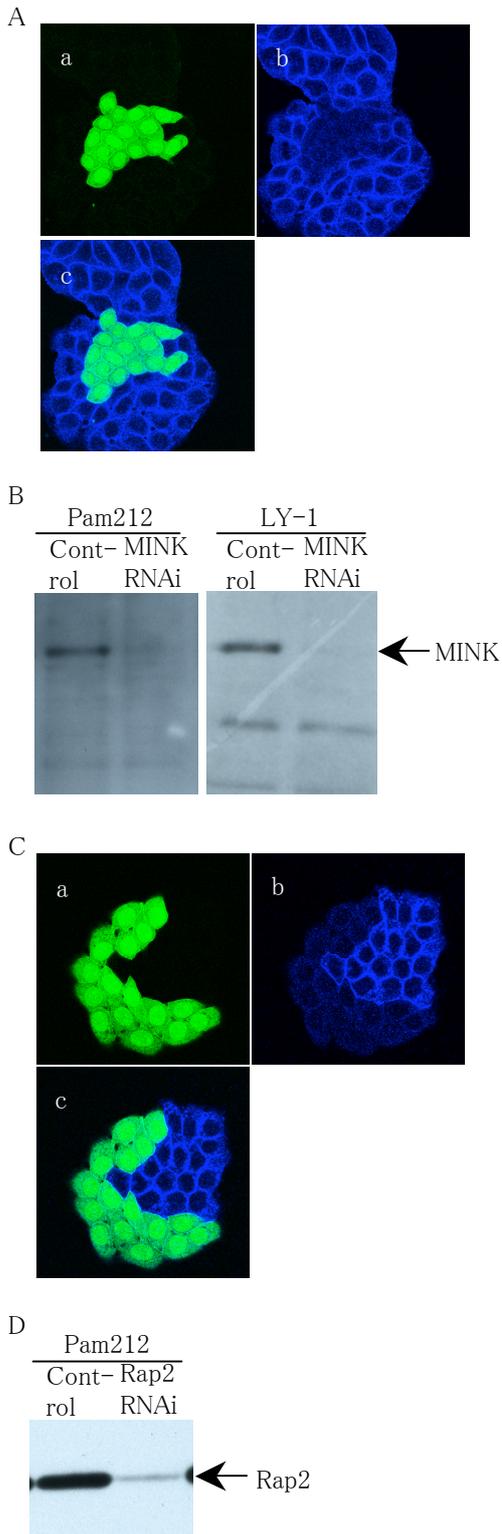


図 2. A. RNAi による Pam212 細胞接着部位の MINK の発現消失、B. RNAi による Pam212 細胞、LY-1 細胞の MINK の発現消失、C. RNAi による Pam212 細胞接着部位の Rap2 の発現消失、D. RNAi による Pam212 細胞の Rap2 の発現消失。

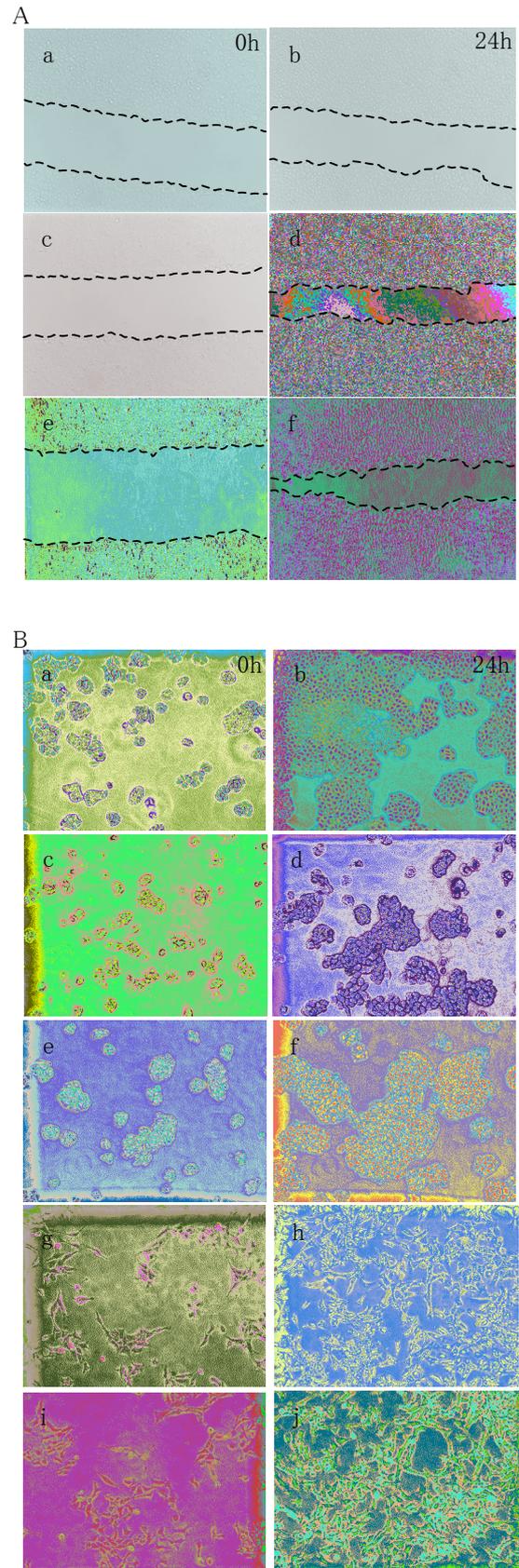


図 3. 細胞接着と運動に対する MINK, Rap2 の RNAi の影響。A. wound healing assay、B scattering assay

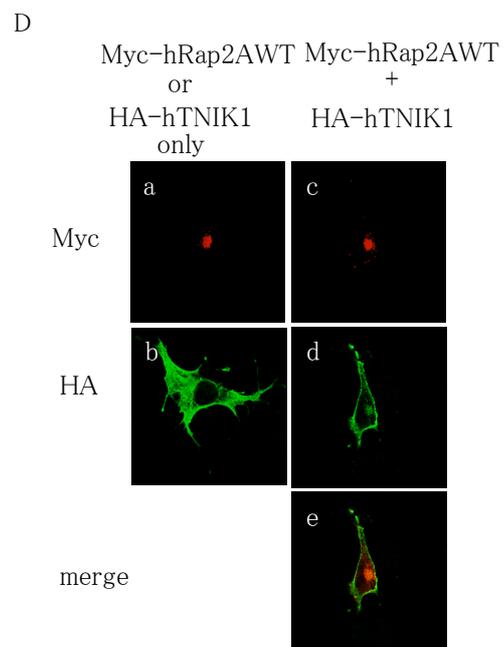
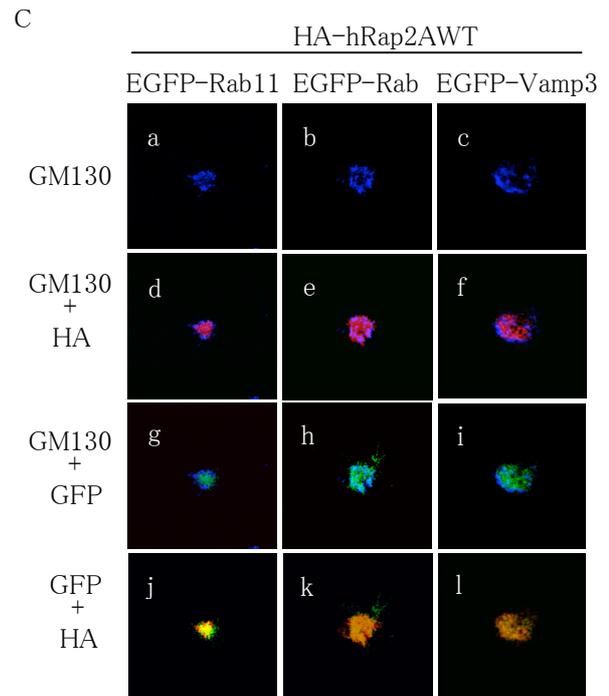
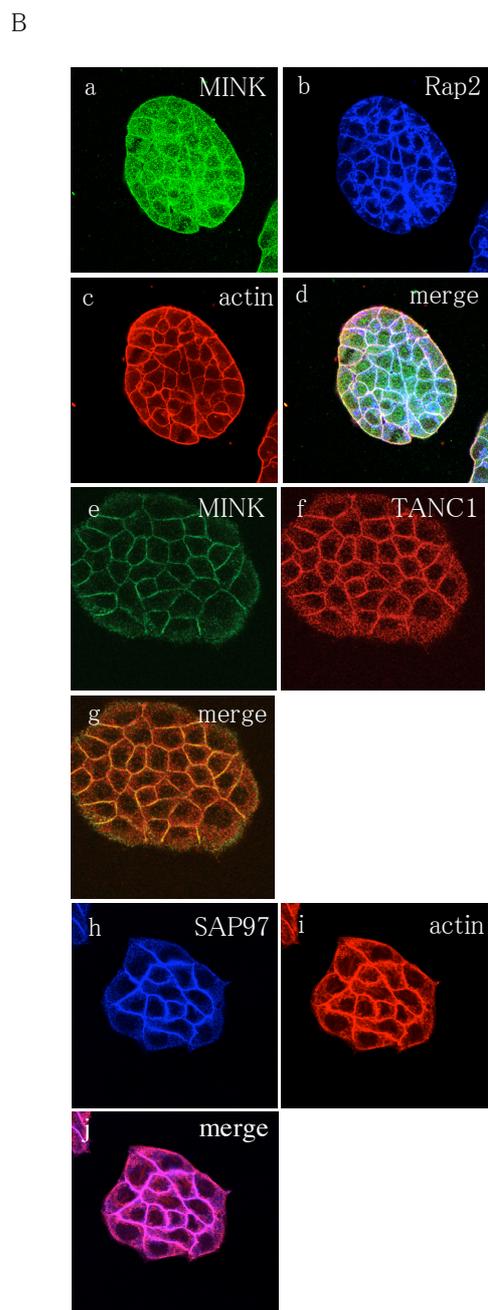
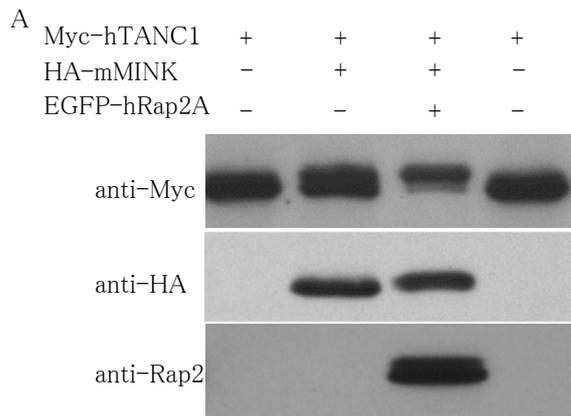


図4. A. MINKとRap2によるTANC活性化への相乗効果と B. Pam212細胞におけるMINK, TANC1, Rap2, SAP97の共局在、C. COS-1細胞におけるRap2の細胞内局在、D. COS-1細胞におけるRap2によるTNIKのrecruit

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)
Nonaka, H., Takei, K., Umikawa, M., Oshiro M.,

Kuninaka, K., Bayarjargal, M., Asato, T., Yamashiro, Y., Uechi, Y., Endo, S., Suzuki, T., Kariya, K. MINK is a Rap2 effector for phosphorylation of the postsynaptic scaffold protein TANC1.

Biochem.Biophys.Res.Commun., 査読有 377, 573-578, 2008

Uechi, Y., Bayarjargal, M., Umikawa, M., Oshiro, M., Takei, K., Yamashiro, Y., Asato, T., Endo, S., Misaki, R., Taguchi, T., Kariya, K. Rap2 function requires palmitoylation and recycling endosome localization.

Biochem.Biophys.Res.Commun., 査読有 378, 732-737, 2009

6. 研究組織

(1)研究代表者

武居 公子 (TAKEI KIMIKO)

国立大学法人琉球大学・医学研究科・助教

研究者番号:90325861

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし