

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06544

研究課題名(和文) ユビキチン化を介した  $\alpha 5 \beta 1$  インテグリンの抑制機構とがん悪性化への関与

研究課題名(英文) Regulation of integrin beta1 through ubiquitin system

研究代表者

坂本 泰久 (Sakamoto, Yasuhisa)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：20613392

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々はNedd4Lの免疫沈降と質量分析によってEGF依存的なリン酸化部位を同定し、リン酸化がNedd4Lの活性化に与える影響を明らかにした。さらに浸潤性の高いがん細胞株において特定のNedd4L variantが発現することを見出し、Nedd4L variantの機能解析を行った。そしてがん細胞株においてNedd4Lの発現低下が細胞の増殖と運動を亢進することを明らかにした。また、インテグリン  $\alpha 5 \beta 1$ 、または  $\alpha 5 \beta 1$  の阻害抗体によって細胞運動が抑制されたことから、Nedd4Lノックダウンによってインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  の機能が亢進され細胞運動が促進することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞では細胞接着分子インテグリンが活性化し、細胞の増殖と運動を高め、がん悪性化の原因となる。一方で様々ながん種において、ユビキチン化酵素Nedd4Lの発現低下とがん悪性化の相関が指摘されているが、詳細は不明であった。本研究ではNedd4Lの発現低下がインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  の機能亢進を導くという直接的な結果を得た。さらにEGF受容体がNedd4Lの活性制御に関わることを明らかにした。ある種のがんではインテグリンとEGF受容体が協調的に働くことが報告されている。本研究成果はこれまで不明であったがんにおけるインテグリンとEGF受容体のクロストークを解明する手がかりになると期待される。

研究成果の概要(英文)：We identified EGFR-dependent phosphorylation site in Nedd4L by immunoprecipitation and Mass spectrometry and revealed the role of phosphorylation on molecular function. Next, we found that one of Nedd4L splice variant express in metastatic cancer cell line and characterized the splice variant. We also revealed that depletion of Nedd4L in cancer cell lines caused increase of cell migration and cell proliferation. Inhibitory antibody against integrin  $\alpha 5 \beta 1$  and  $\alpha 5 \beta 1$  blocked these phenotypes, indicating that Nedd4L suppress integrin  $\alpha 5 \beta 1$  function.

研究分野：生化学

キーワード：細胞接着 ユビキチン化 膜輸送 細胞膜

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

がん細胞の異常な増殖、生存、運動能はがん悪性化の原因となる。これには細胞接着分子インテグリンの活性化が関与する。インテグリンは $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖の2量体から成る膜貫通タンパク質で、細胞外領域を介して細胞外基質と結合する。同時にインテグリンの細胞外領域は不活性型から活性型へと構造変化する。細胞内領域はインテグリン結合分子 Talin を介して細胞骨格アクチンフィラメントと連結し、さらに細胞内シグナル伝達分子 FAK や Src が活性化する。現在、この活性化機構を抑制すべく、インテグリンの細胞外領域を標的とした抗体や低分子による抗腫瘍薬の開発が試みられているが成功には至っていない (Stupp et al. *Lancet Oncol.* 2014; Elez et al. *Ann Oncol.* 2015)。インテグリンは細胞外から活性化される (Outside-in) だけでなく細胞内からも活性化される (Inside-out)、珍しい2方向性シグナル伝達受容体である。そのため、細胞内からの制御機構を解明することで新しい癌研究が展開する可能性がある。ユビキチン化酵素 Nedd4L は多くのがんで発現が低下し、がん転移、期間生存率の低下といった悪性化と関係することから、癌抑制機能が示唆される (Guarnieri et al. *Oncogene*, 2018; Sakashita et al. *Ann Surg Oncol*, 2013)。しかし、がん抑制に関わる Nedd4L の基質は明らかにされていない。申請者は、Nedd4L がユビキチン化を介して  $\beta 1$  インテグリンを制御することを見出した。そこで本研究は、この分子レベルの相互作用を手掛かりとして、がんの悪性化にみられる Nedd4L の発現低下と  $\beta 1$  インテグリンの活性化の因果関係を問う

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、Nedd4L によるユビキチン化を介した  $\beta 1$  インテグリンの抑制機構を解明し、その破綻がいかにしてがん細胞の異常な振る舞いを引き起こすかを明らかにすることである。

### 3. 研究の方法

#### (1) Nedd4L を制御するシグナル伝達機構の解析

Nedd4L のがん抑制的な機能を解明するため、リン酸化修飾を中心としたシグナル伝達の上流探索を行う。In vitro ubiquitination assay を用いて、活性制御の分子機構をアミノ酸レベルで解析する。

#### (2) Nedd4L variant の解析

Nedd4L は様々ながんにおいて遺伝子発現の低下が報告される。一方で、遺伝子発現に変化がなくとも、本来とは異なる分子機能を発現することがある。例えば、RNA スプライシングは1つの遺伝子から機能の異なる複数の splice variant を産生する機構である。Nedd4L には複数の splice variant が存在する。ウェスタンブロットングによってがん細胞株に発現する splice variant を確認し、さらに In vitro ubiquitination assay を用いて variant の機能を評価する。

#### (3) がん細胞における Nedd4L の機能解析

細胞生物学的な手法によってがん細胞株における Nedd4L の役割を明らかにする。特にインテグリン機能への関与を解明する。

### 4. 研究成果

#### (1) Nedd4L を制御するシグナル伝達機構の解析

Nedd4L のユビキチン化酵素活性は分子内相互作用によって自己抑制されている。Nedd4L の活性化は上流のシグナル分子によって制御されると考えられるがその機構には不明な点が多い。そこで我々は翻訳後タンパク質修飾の可能性を検討した。我々は細胞をインテグリン  $\beta 1$  の基質であるフィブロネクチンまたは上皮成長因子 EGF で刺激すると、Nedd4L がリン酸化されることを Phos-tag SDS-PAGE で確認した。Nedd4L の免疫沈降と質量分析によって Nedd4L のフィブロネクチン又は EGF 依存的なリン酸化領域を探索した。その結果、フィブロネクチン依存的なリン酸化は同定できなかったが EGF 依存的なリン酸化部位を同定した。次に、Nedd4L のリン酸化が分子機能に及ぼす影響を調べるため、Nedd4L の自己ユビキチン化を指標とした In vitro ユビキチン化アッセイを構築した。その結果、リン酸化領域のセリン残基をアスパラギン酸残基に置換した変異体は試験管内での自己ユビキチン化活性に影響を与えることが明らかになった。以上の結果から、Nedd4L は EGFR の下流で活性制御されることが示唆された。

## (2) Nedd4L variant の解析

我々は Nedd4L のウェスタンブロット解析から、特に浸潤性の高いがん細胞株において Nedd4L variant の発現を見出した。現在、Nedd4L variant の機能とインテグリン制御の関係を継続して研究している。

さらにデータベース解析によると Nedd4L の Splice variant は複数存在するが、一部の Splice variant では我々が同定した EGF 依存的なリン酸化部位を欠損している。このことから、Nedd4L にはリン酸化によって活性化する variant とリン酸化制御を受けない variant が存在することになる。異なる制御機構を持つ variant の発現ががん悪性化に関与する可能性がある。

様々な Nedd4L variant がどのような機能の違いを持つかを解明するため、データベースに登録されている複数の variant の組み換えタンパク質を作製し、Nedd4L の活性制御に必須であるリン脂質感受性、Ca<sup>2+</sup>感受性を調べた。その結果、Nedd4L は variant 毎に異なるリン脂質感受性、Ca<sup>2+</sup>感受性を持つことが判明した。

## (3) がん細胞における Nedd4L の機能解析

公共データベースを用いた解析から、肺癌の中でも特に肺腺癌において、Nedd4L の発現低下が 5 年生存率の低下と相関する予後不良因子であることを見出した。そこで実際に、肺腺癌細胞株 PC9 と NCIH358 において Nedd4L の発現低下と細胞の増殖と運動への影響を調べた。PC9 細胞と NCIH358 細胞において Nedd4L の発現を siRNA によって抑制した。PC9 細胞は Nedd4L のノックダウンによって細胞増殖と運動の亢進が見られた。しかし NCIH358 細胞は Nedd4L のノックダウンによる影響は見られなかった。PC9 は上皮成長因子受容体 (EGFR) 変異株であり、EGFR-チロシンキナーゼインヒビター (TKI) も著効する。一方で NCIH358 は KRas G12V の変異が見られ EGFR-TKI は効果を示さないことが知られる。これまでの我々の研究と他グループの研究 [J. Transl. Med. 20, 1-11 (2022)] から、Nedd4L は EGFR の下流であると考えられ、Nedd4L は EGFR 変異株においても細胞運動と細胞増殖を抑制的に制御すると考えられた。一方で、EGFR の下流である KRas は細胞運動と細胞増殖をより直接的に制御するため、KRas 変異を持つ細胞株において Nedd4L のノックダウンの影響は見られなかったと考察した。さらに HeLa 細胞を用い、細胞運動におけるインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  の影響を検討した。Nedd4L のノックダウンによって PC9 細胞と同じく HeLa 細胞の細胞運動が亢進するが、インテグリン  $\alpha 5$ 、または  $\beta 1$  の阻害抗体によって細胞運動が抑制された。以上のことから、Nedd4L ノックダウンによってインテグリン  $\alpha 5 \beta 1$  の機能が亢進され細胞運動が促進したことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Koji Kikuchi, Yasuhisa Sakamoto, Akiyoshi Uezu, Hideyuki Yamamoto, Kei-ichiro Ishiguro, Kenji Shimamura, Taro Saito, Shin-ichi Hisanaga, Hiroyuki Nakanishi	4. 巻 -
2. 論文標題 Map7D2 and Map7D1 facilitate microtubule stabilization through distinct mechanisms in neuronal cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2021.10.27.466197	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yasuhisa Sakamoto, Akiyoshi Uezu, Koji Kikuchi, Shiro Suetsugu, Hiroyuki Nakanishi	4. 巻 -
2. 論文標題 Activation of Nedd4L Ubiquitin Ligase by FCH2-generated Membrane Curvature	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.02.21.481372	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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 坂本泰久、菊池浩二、中西宏之
2. 発表標題 ユビキチン化酵素Nedd4Lとアダプター分子ARRDC1によるインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ のユビキチン化を介したエンドサイトーシスの制御
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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