

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011 年

課題番号：20380186

研究課題名（和文）

環境センサーと環境コントローラーとしての接着領域裏打ちタンパク質の生理機能の解析

研究課題名（英文） Functional analysis of focal adhesion proteins-sensors and regulators for microenvironment

研究代表者

木岡 紀幸 (KIOKA, NORIYUKI)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：90234179

研究成果の概要（和文）：

コラーゲンなどの細胞外基質と細胞間の接着領域に局在する蛋白質ビネキシンが、創傷治癒やがん細胞の移動に重要な役割を果たすこととその仕組みを明らかにした。また、ビネキシンと結合するアクチン調節因子 WAVE2 が、cAMP 依存性キナーゼを細胞膜突出部に局在化させ、膜突出を促進することも示した。さらに、別のビネキシン結合蛋白質 Dlg5 が細胞外マトリックスの分泌を調節して細胞外環境を調節できることも明らかとした。これらの結果から接着領域裏打ちタンパク質が細胞外環境のセンサーとコントローラーとして機能する仕組みを解明した。

研究成果の概要（英文）：

We have shown that vinexin, a focal adhesion protein, inhibits tumor cell migration but promotes cutaneous wound healing by controlling the localization of growth factor receptors. We have also shown that WAVE2, an actin-nucleating factor that binds to vinexin, recruits cAMP-dependent kinase to the membrane protrusion and promotes the protrusion. Furthermore, another vinexin-binding protein Dlg5 can regulate the secretion of fibronectin, a extracellular matrix. Together, these results indicate the function of focal adhesion proteins as sensors and regulators for cellular microenvironment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2009 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2011 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：

細胞接着、がん、細胞骨格、細胞外基質、シグナル伝達、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

動物細胞と細胞外基質間の接着、いわゆる細胞接着は、1)環境センサーと2)環境コントローラーという2つ重要な役割を持っている(図)。細胞は細胞接着により、周囲の細胞外基質の種類、堅さを感じ、自身の運命(生存、分化、運動)を決定している。センサーの異常はがん化に結びつき、センサーを自由に制御できれば、がん治療や再生医療に貢献できる。一方細胞は、細胞接着を介して自身を取り巻く細胞外基質の繊維化を調節し、自らの細胞外環境をコントロールしている(この細胞外環境が最終的には自らおよび周辺細胞の運命を決定する)。このコントローラーを調節できれば、細胞外環境を制御することで細胞の分化を制御し、やはり再生医療に貢献できる。細胞接着がもつこの2つの重要な機能は、いずれも接着領域に集積する細胞質タンパク質、いわゆる接着領域裏打ちタンパク質によって仲介されている。つまり、細胞接着がもつ環境センサーと環境コントローラーとしての機能を解明していくためには、接着領域裏打ちタンパク質の機能解析が必須であった。

2. 研究の目的

私たちはこれまでに接着領域裏打ちタンパク質の一つビネキシンが細胞接着の有無を感じ、環境センサーとなっている可能性を示してきた。本研究では、このビネキシンの解析を中心として、細胞接着領域が新たにでき、細胞運動が亢進する創傷治癒過程における接着領域裏打ちタンパク質の役割とそのメカニズム、がん細胞における細胞運動の調節、環境の感知後にそれを化学シグナルに変換する重要な酵素と考えられているcAMP依存性キナーゼ(PKA)の制御機構の解明を目指した。また、細胞外微小環境をコントロールする仕組みとして、細胞の増殖や生存に強く影響する細胞外マトリックスフィブロネクチンの分泌が大きく変化する上皮間葉転換現象に着目し、接着領域裏打ちタンパク質の機能解明を目指した。

3. 研究の方法

細胞外微小環境が重要な役割を持つ現象の一つとして創傷治癒過程がある。この現象への接着領域裏打ちタンパク質の機能を解

明するために、これまでに作成していたビネキシン遺伝子破壊マウスから作製した初代培養表皮細胞、培養表皮細胞株を用いて *in vitro* でメカニズム解明を行った。さらに、がん化させた細胞を用い、接着領域裏打ちタンパク質の発現レベル、リン酸化レベルの変動をウエスタンブロット法により検出し、接着領域裏打ちタンパク質ががん化により受ける影響を調べた。また、この発現レベルとリン酸化レベルの変化が細胞外環境の感知とそれに伴う細胞挙動の変化に与える影響を調べるために、接着領域裏打ちタンパク質の強制発現株や非リン酸化型変異体を作成し、解析した。

細胞の増殖や生存に強く影響する細胞外マトリックスフィブロネクチンの分泌は上皮間葉転換によって大きく変化する。そこで、上皮間葉転換に与える接着領域裏打ちタンパク質 Dlg5 の影響を調べた。Dlg5 の発現抑制細胞、強制発現細胞を作成し、フィブロネクチンをはじめとする上皮間葉転換マーカータンパク質の発現をウエスタン法で調べた。また、その仕組みを特異的なシグナルの阻害剤、優性抑制変異体を導入することで検討した。

4. 研究成果

本研究開始までに、接着領域裏打ちタンパク質ビネキシンのノックアウトマウスは創傷治癒過程が遅延することを明らかにしていた。ノックアウトマウスより初代表皮細胞を単離し、*in vitro* で細胞移動アッセイを行ったところ、ビネキシンノックアウト細胞で細胞運動が低下していることが分かった。細胞運動は、細胞接着による細胞外環境の感知と増殖因子シグナルが重要な役割を持っている。そこで、培養表皮細胞株を用い、ビネキシンの役割について検討した。ビネキシンの発現抑制はスクラッチ(引っかき傷)によって誘導される増殖因子受容体の活性化を抑制した。一方で、スクラッチによって誘導されるMAPキナーゼの活性化には影響しなかった。また、移動している細胞の先端部に増殖因子受容体は局在したが、ビネキシンの発現抑制によりこの局在は抑制された。以上の結果からビネキシンは創傷によってできる新しい環境(新しい細胞-細胞外基質間接着の形成など)を感知し、増殖因子受容体の局在を制御することで細胞運動を制御している可能性が示唆された。(図1)

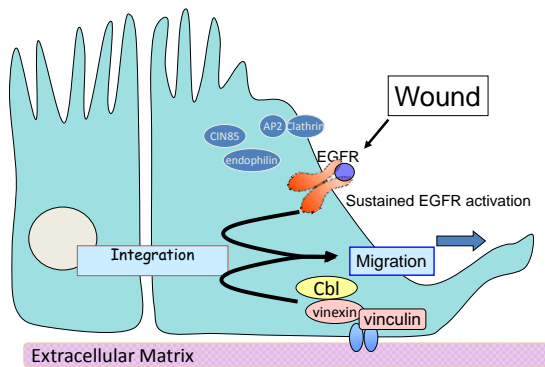


図 1

センサーの異常はがん化に結びつき、センサーを自由に制御できれば、がん治療や再生医療に貢献できる。そこでがん細胞におけるビネキシンの機能について検討した。細胞は v-src でがん化させた繊維芽細胞を用いた。v-src がん細胞ではビネキシンの発現が減少していた。ポイデンチェンバー法で測定した細胞移動能は、ビネキシンの発現により低下した。このことから、がん細胞においてビネキシンの発現が抑制され、細胞の移動能力が上昇していることが示唆された。また、がん細胞においてビネキシンのチロシンリン酸化が上昇しており、このリン酸化レベルの上昇が接着斑タンパク質ビンキュリンとの結合を阻害することがわかった。ビンキュリンは細胞接着の安定性や運動能抑制に寄与することが知られており、ビネキシンはビンキュリンとの結合を介して細胞移動能力を制御している可能性も考えられることがわかった。

cAMP 依存性キナーゼ (PKA) は細胞接着の有無により活性が調節され、しかも、細胞運動の調節にかかわる重要なシグナル分子であることから、環境センサーの一翼を担っていると考えられている。PKA は基質特異性が非常に低いため、細胞内での局所的な局在が生理機能の発揮に必須である。私たちは本研究開始までにビネキシンのアクチン重合核形成促進因子 WAVE2 と相互作用し安定化させることを示していた。本研究では、その WAVE2 が、PKA を細胞膜突出部に局在化させる機能を持っていることを明らかにした。また、WAVE2 と PKA をそれぞれ大腸菌で発現、精製し、それを用いて PKA と WAVE2 が直接結合することを示した。PKA は触媒サブユニットと制御サブユニットからなることが知られているが、WAVE2 はいずれのサブユニットとも結合した。PKA を細胞内の特定の場所に局在化させるタンパク質 (PKA アンカータンパク質) の多くは、制御サブユニットとのみ結合するので、WAVE2 は特殊な PKA アンカータンパク質であることが示唆された。これらのこ

とから、環境センサーの一翼を担う PKA の新しい制御メカニズムが明らかとすることに成功した。(図 2)

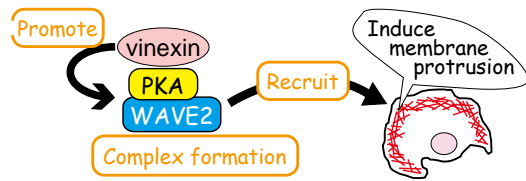


図 2

Dlg5 はビネキシンの相互作用する細胞間接着領域裏打ちタンパク質であり、炎症性腸疾患の一つクローン病の発症のしやすさと関連しているタンパク質である。Dlg5 と同じファミリーに含まれる遺伝子は、上皮細胞が間葉系細胞に変換する上皮間葉転換という現象を制御することで、細胞外マトリックスの一種フィブロネクチン分泌を調節することが知られている。そこで、フィブロネクチンの分泌をはじめ、上皮間葉転換現象に与える Dlg5 の影響を調べた。Dlg5 の発現を抑制すると、フィブロネクチンの分泌が上昇し、E-カドヘリンの発現が低下するなど、Dlg5 は上皮間葉転換を抑制していることがわかった。また、Dlg5 が TGFβ 受容体を介したシグナル伝達を抑制していることを明らかにした。これらの結果から、細胞間接着領域の裏打ちタンパク質 Dlg5 は、TGFβ 受容体シグナルを調節することで細胞外マトリックスフィブロネクチンの量を調節する環境コントローラーとして機能できることがわかった(図 3)。フィブロネクチンは細胞の生存や増殖を引き起こすため、Dlg5 を発現する細胞が周囲の細胞の増殖、生存の調節に関わる可能性も考えられる。

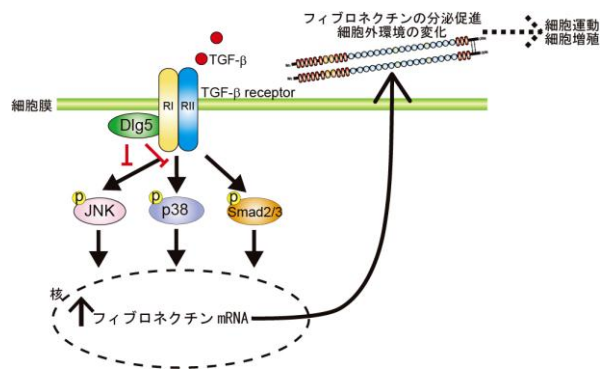


図 3

以上のように、本研究により接着領域裏打ちタンパク質、特にビネキシンを中心としたタンパク質軍により、細胞がその周囲の微小

環境を感知してから細胞運動を調節するまでの仕組み、および、フィブロネクチンの分泌を調節することで細胞外環境を調節する仕組みを明らかとした。

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 12 件)

- ① Sezaki, T., K. Inada, T. Sogabe, K. Kakuda, L. Tomiyama, Y. Matsuno, T. Ichikawa, M. Matsuo, K. Ueda, and N. Kioka. Role of Dlg5/lp-dlg, a membrane-associated guanylate kinase family protein, in epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One* 査読有 7: e35519. 2012. doi:10.1371/journal.pone.0035519
- ② Yamashita, H., K. Ueda, and N. Kioka. WAVE2 Forms a Complex with PKA and Is Involved in PKA Enhancement of Membrane Protrusions. *J Biol Chem*. 査読有 286:3907-3914. 2011. doi: 10.1074/jbc.M110.145409
- ③ Kioka, N., T. Ito, H. Yamashita, N. Uekawa, T. Umemoto, S. Motoyoshi, H. Imai, K. Takahashi, H. Watanabe, M. Yamada, and K. Ueda. Crucial role of vinexin for keratinocyte migration in vitro and epidermal wound healing in vivo. *Experimental cell research*. 査読有 316:1728-1738. 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.03.019>
- ④ Umemoto, T., T. Inomoto, K. Ueda, M. Hamaguchi, and N. Kioka. v-Src-mediated transformation suppresses the expression of focal adhesion protein vinexin. *Cancer Lett*. 査読有 279:22-29. 2009.
- ⑤ Umemoto, T., K. Tanaka, K. Ueda, and N. Kioka. Tyrosine phosphorylation of vinexin in v-Src-transformed cells attenuates the affinity for vinculin. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有 387:191-195. 2009.

[学会発表] (計 50 件)

- ① 2012.3.22-26 木岡紀幸 天然変性領域を介した蛋白質間相互作用と細胞外環境の感知 2012年度日本農芸化学会 京都
- ② 2012.3.22-26 市川 尚文、山下 寛、木村

泰久、植田 和光、木岡 紀幸 ビネキシンはビンキュリンの活性化を促進する 2012年度日本農芸化学会 京都

- ③ 2012.3.22-26 瀬崎 拓人、市川 尚文、Lucia Tomiyama、植田 和光、木岡 紀幸 クローン病関連タンパク質 Dlg5 と TGF- β I 型受容体の結合部位の同定 2012年度日本農芸化学会 京都
- ④ 2012.3.22-26 長里 彩花、山下 寛、市川 尚文、植田 和光、木岡 紀幸 接着斑タンパク質ビンキュリンは脂質ラフトに局在する 2012年度日本農芸化学会 京都
- ⑤ 2011.9.21-24 瀬崎 拓人、Lucia Tomiyama、稲田 康輝、植田 和光、木岡 紀幸 クローン病関連タンパク質 Dlg5/lp-dlg による TGF- β 受容体の分解制御 第 84 回日本生化学会大会 京都
- ⑥ 2011.9.21-24 市川 尚文、山下 寛、木村 泰久、植田 和光、木岡 紀幸 ビネキシンはビンキュリンとアクチン繊維の複合体形成を促進する 第 84 回日本生化学会大会 京都
- ⑦ 2011.9.21-25 山下 寛、市川 尚文、長里 彩花、植田 和光、木岡 紀幸 ビンキュリンはビネキシンに依存して脂質ラフトと相互作用する Vinculin-dependent interaction of vinculin with lipid rafts. 第 84 回日本生化学会大会 京都
- ⑧ 2011.6.27-29 T. Sezaki, K. Inada, T. Sogabe, K. Ueda, N. Kioka Crohn's disease associated protein Dlg5/lp-dlg controls TGF- β signals. 第 63 回日本細胞生物学会大会 札幌
- ⑨ 2011.6.29 Hiroshi Yamashita, Daisuke Matsuyama, Takafumi Ichikawa, Kazumitsu Ueda, Noriyuki Kioka Vinculin interaction is involved in the vinculin-mediated mechanosensing. 第 63 回日本細胞生物学会大会 札幌
- ⑩ 2011.5.1-6 Noriyuki Kioka, Hiroshi Yamashita, Takafumi Ichikawa, Kazumitsu Ueda Vinculin interaction is involved in the vinculin-mediated mechanosensing. Gordon Research conferences on Fibronectin, Integrins & Related Molecules Lucca (Barga) Italy
- ⑪ 2011.3.25-28 市川 尚文、山下 寛、松山 大輔、植田 和光、木岡 紀幸 ビネキシン-ビンキュリン相互作用の生化学的解析 日本農芸化学会 2011 年度大会 京都
- ⑫ 2011.3.25-28 山下 寛、松山 大輔、市川 尚文、植田 和光、木岡 紀幸 メカノセンサーとしてのビネキシン-ビンキュリン相互作用 日本農芸化学会 2011 年度大会 京都

- ⑬ 2010.11.09 T. Sezaki, K. Inada, T. Sogabe, K. Ueda, N. Kioka Crohn's disease associated protein Dlg5/lp-dlg controls epithelial mesenchymal transition in LLCpK1. 第8回 iCeMS 国際シンポジウム 京都
- ⑭ 2010.11.09 Hiroshi Yamashita, Kazumitsu Ueda, Noriyuki Kioka PKA forms a complex with WAVE2 and controls lamellipodia formation. 第8回 iCeMS 国際シンポジウム 京大
- ⑮ 2010.10.3 木岡紀幸、伊東卓也、山下寛、上川奈津子、梅本勉、本吉創、今井裕、高橋健造、渡辺秀人、山田雅保、植田和光 表皮細胞の運動と創傷治癒における細胞接着関連タンパク質ピネキシンの重要性 2010 年度日本農芸化学会関西支部大会 近畿大学、奈良
- ⑯ 2010.7.11-16 Noriyuki Kioka Vinexin binding regulates the vinculin dynamics at adhesion sites. Gordon Conferences "Signaling by adhesion receptor" Waterville, ME, USA
- ⑰ 2009.12.5-9 H. Yamashita, K. Ueda, N. Kioka PKA Forms a Complex with WAVE2 and Controls Lamellipodia Formation. ASCB 49th Annual Meeting San Diego
- ⑱ 2009.12.5-9 N. Kioka, T. Ito, N. Uekawa, T. Umamoto, S. Motoyoshi, H. Yamashita, H. Imai, K. Takahashi, H. Watanabe, M. Yamada, K. Ueda Crucial Role of Vinexin for Keratinocyte Migration In Vitro and Epidermal Wound Healing In Vivo ASCB 49th Annual Meeting San Diego
- ⑲ 2009.12.5-9 T. Sezaki, K. Inada, T. Sogabe, K. Kakuda, K. Ueda, N. Kioka Crohn's Disease Associated Protein Dlg5/Lp-Dlg Controls Epithelial Mesenchymal Transition in LLCpK1 ASCB 49th Annual Meeting San Diego
- ⑳ 2009.12.5-9 N. Kioka, T. Ito, N. Uekawa, T. Umamoto, S. Motoyoshi, H. Yamashita, H. Imai, K. Takahashi, H. Watanabe, M. Yamada, K. Ueda Crucial Role of Vinexin for Keratinocyte Migration *in vitro* And Epidermal Wound Healing *in vivo* 49th ASCB Annual Meeting, San Diego, USA

[その他]

ホームページ等

<http://www.biochemistry.kais.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木岡 紀幸 (KIOKA, NORIYUKI)

京都大学・農学研究科・准教授

研究者番号：90234179

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

松尾 道憲 (MATSUO MICHINORI)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：00335308