

機関番号：17301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790081

研究課題名 (和文) SH3P2 はユニークな作用機構を持つ細胞運動制御因子である

研究課題名 (英文) SH3P2 is a novel regulator of cell motility.

研究代表者

谷村 進 (TANIMURA SUSUMU)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90343342

研究成果の概要 (和文)：

新規細胞運動抑制因子 SH3P2 は Myo1E と特異的に結合すること、SH3P2 (Ser²⁰²) のリン酸化によって SH3P2 から解離した Myo1E は、CD44、および MMP-3/-9 の発現調節などを介して細胞運動を制御すること、またそれには Myo1E の Ser⁷³⁶/Thr¹⁰³² のリン酸化が関与することを見いだした。すなわち、ERK-MAP キナーゼ経路の恒常的活性化が SH3P2/Myo1E 複合体形成の制御破綻を誘起し、それががん細胞の運動・浸潤能亢進に繋がる可能性を提示した。

研究成果の概要 (英文)：

We have found that SH3P2, a novel negative regulator of cell motility binds to Myo1E, which dissociates from SH3P2 in an RSK1-mediated Ser²⁰² phosphorylation-dependent manner and regulates the expression of CD44 and MMP-3/-9. These results suggest that SH3P2/Myo1E complex is an essential machinery that functions downstream of the ERK-MAP kinase pathway to modulate cell motility.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：細胞運動、ERK-MAP キナーゼ、RSK、リン酸化

1. 研究開始当初の背景

ERK-MAP キナーゼ経路は様々な細胞外刺激に応答して活性化され、細胞増殖、分化、運動性亢進など、多彩な生理応答の誘導において中心的な役割を果たしている。申請者はここ数年来、特に細胞運動制御における ERK-MAP キナーゼ経路の役割に注目して解析を進め、ERK-MAP キナーゼ経路は細胞運動を調節する分子群 (Ezrin、CD44、

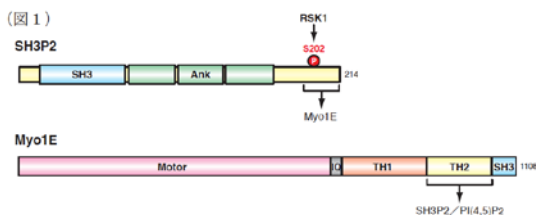
Matrix metalloproteinase [MMP]-9 等) の遺伝子発現を介して細胞運動を亢進させること、ERK-MAP キナーゼ経路の機能亢進はがん細胞の高い浸潤能獲得に連動することを見出した。

最近、申請者は ERK-MAP キナーゼの下流に位置し、細胞運動制御に関与する新規分子の探索を進めた結果、SH3 Domain を有する分子量約 30kDa のタンパク質 (SH3P2) を

見出し、それはアクチンフィラメント・モータータンパク質であるミオシンの一種、Myo1E と特異的に結合すること、RSK1 によってリン酸化されること、等を明らかにした。

ミオシンは、細胞の移動、分裂、食作用、神経軸索の伸展、細胞形態の維持、細胞内小器官・小胞の輸送等、多彩な様式の「運動」において本質的な役割を担っている。ヒトでは 12 クラス、約 40 種類からなるファミリー分子の存在が報告されており、この多様性に基づいて上記様々な生理作用が規定されている。ミオシンの基本構造は、約 80kDa の Motor Domain (N 末端)、軽鎖結合部位 (IQ Domain)、Tail Domain (C 末端) からなり、IQ Domain によって活性が、Tail Domain によって特性が規定されている。クラス 1 ミオシンに分類される Myo1E と Myo1F の Tail Domain には、それらに保存された Tail Homology (TH) 1 領域に加えて、プロリン残基に富んだ TH2 領域、および SH3 Domain が存在する点で、極めて特徴的である。重要なことは、TH2 領域と SH3 Domain が、いずれもタンパク質相互作用に関与する点である。この点に関連して、申請者は最近、Myo1E の TH2 領域には PI(4,5)P₂、あるいは SH3P2 が結合すること、SH3P2 は Myo1E と PI(4,5)P₂ の結合を阻害することを見いだしている (図 1)。

さらに、RNAi 法を利用して Myo1E の発現を抑制すると細胞の運動能が低下することや、PI(4,5)P₂ が細胞膜、ゴルジ体、輸送小胞に局在するホスホイノシタイドであることに注目して解析を進め、Myo1E が細胞内小胞の輸送・分泌過程に密接に関わっている可能性を示唆する結果を得た。そして、これらの知見をもとに、「静止期細胞において SH3P2 は Myo1E と結合してその機能を抑制している。血清等の刺激によって ERK-MAP キナーゼ経路が活性化されると、RSK1 によって SH3P2 がリン酸化され、その結果として Myo1E は SH3P2 から解離する。これが契機となって、Myo1E は PI(4,5)P₂ 等との結合を介して細胞内小胞 (MMP-9 等、細胞運動に関与する分子を含む) を先端端に向かって輸送し、それが細胞運動亢進に連動する」との作業仮説を考えた。



2. 研究の目的

本研究では、申請者が同定した SH3P2/Myo1E 複合体形成の生理的役割を、特に細胞内小胞の Exocytosis と関連させ、「Myo1E が F-アクチン系を利用した細胞内小胞輸送を介して、どのような機能を持つ分子を先端端に輸送し、細胞運動亢進に連動するか？」「SH3P2/Myo1E 複合体形成の制御破綻が、がん細胞の運動・浸潤能亢進に繋がる (SH3P2 が新しいタイプのがん抑制遺伝子として機能する) 可能性」、に焦点を当てる。これらの解析を通して、細胞運動制御機構に関する分子レベルでの理解を、新しい観点から深める事が、本研究の最終目的である。

3. 研究の方法

本研究では、まず (1) Myo1E を利用した小胞輸送は、どのような機能を持つ分子を輸送するか? (2) SH3P2 及び Myo1E の SH3 Domain には如何なる分子が結合するか? に重点をおいて解析を進め、SH3P2/Myo1E 複合体による細胞内小胞輸送と細胞運動制御の相関を分子レベルで明らかにする。続いて、SH3P2/Myo1E 複合体形成の生理的な役割、その制御破綻が、がん細胞の高い運動・浸潤能獲得に繋がる可能性について、(3) 様々ながん細胞を利用した解析、(4) SH3P2 遺伝子変異マウスの作製・それを利用した解析、を進め、細胞運動制御に関する総合的な理解を深める。

(1) Myo1E 輸送分子の同定

Myo1E が輸送する細胞内小胞に含まれる分子に関しては、特に細胞の接着、運動、浸潤に関与する様々な分子に焦点を当て、Myo1E による細胞内小胞輸送が抑制される条件下 (RNAi 法による Myo1E の発現抑制、SH3P2 の過剰発現など)、逆にそれが促進される条件下 (RNAi 法による SH3P2 の発現抑制、Myo1E の過剰発現など) での比較解析を進めることで、それらの同定を進める。

① 膜タンパク質に着目した解析

ここでは、代表的な接着因子であるインテグリン、CD44、及び細胞外基質等の分解に関与する細胞膜結合型プロテアーゼ MT-MMPs に着目する。上記条件下、各タンパク質の免疫染色、フローサイトメータによる細胞膜表面発現量の解析、あるいは細胞膜面分を用いたウエスタンブロットを行うことで、それらの量的変動を比較する。

② 分泌タンパク質に着目した解析

がん細胞の浸潤と密接に関連する分泌タンパク質として MMPs、及びプラスミノゲンアクチベータに着目する。上記条件下、細胞培養上清を回収、濃縮し、Zymography、あるいはウエスタンブロット法で各タンパク質の量的変動を比較する。

(2) SH3P2 及び Myo1E の SH3 Domain 結合分子の同定

SH3P2 及び Myo1E の各種欠失変異体を用いた結合実験により、SH3P2/Myo1E 複合体形成には SH3P2 の C 末端領域と、Myo1E の TH2 領域が必要であることを確認している。一方、SH3P2 は N 末端に、Myo1E は C 末端にいずれも SH3 Domain を有することから、そこには何らかの分子が結合する可能性が極めて高い。そこで、各 SH3 Domain に結合する分子を、GST 融合 SH3 Domain タンパク質を用いた GST pull-down assay、GFP 融合 SH3 Domain タンパク質を用いた免疫共沈法によって見出し、それらについて MALDI-TOF を利用して同定を進める。さらに、同定した分子が SH3P2、Myo1E、あるいは SH3P2/Myo1E 複合体の機能に及ぼす影響等に注目して解析する。

(3) SH3P2/Myo1E 複合体形成制御の破綻とがん細胞運動・浸潤能亢進の関連

Migration assay (Boyden chamber を利用)、Matrigel invasion assay などによって、細胞の運動・浸潤能を評価する。なお、これまでに約 40 種類のがん細胞株について、SH3P2 と Myo1E の発現量、及び ERK-MAP キナーゼ経路の活性レベルを比較解析している。本項目では、上記各解析に基づいた細胞の運動・浸潤能を、SH3P2 と Myo1E の発現量、ERK-MAP キナーゼ経路の活性レベルと比較することで、それらの相関を明らかにする。

(4) SH3P2 遺伝子変異マウスの解析

現在、熊本大学・発生医学研究センター・荒木喜美准教授の技術指導、協力のもと、SH3P2 遺伝子変異マウスの作出を進めている。具体的には、SH3P2 遺伝子にトラップベクターが挿入された ES 細胞クローン (XH892; International Gene Trap Consortium より入手) を C57BL/6 の胚盤胞に注入してキメラマウスを作製し、得られたキメラマウスを C57BL/6 マウスと交配してラインを樹立しているところである。これを利用して、SH3P2、及び SH3P2/Myo1E 複合体形成の個体レベルでの生理的意義、及び役割の解明を目指す。

具体的には、まずヘテロ接合体同士の交配により、SH3P2 遺伝子変異のホモ接合体を作出、その表現型を解析する。ホモ個体が胚性致死となる場合には、いつどのような異常により致死に至るのかを発生学的手法によって解析する。ホモ個体が出生した場合には、マウスの生育過程を経時的に観察する。

4. 研究成果 (図 2)

(1) Myo1E 輸送分子の同定

N-Ras の変異によって ERK-MAP キナーゼ経路が恒常的に活性化されている HT-1080 細胞を用いて、EGFP、EGFP-SH3P2、あるいは EGFP-SH3P2 (S202A) (非リン酸化変異体) を安定発現させた細胞株を樹立して解析を進めた。その結果、HT-1080 細胞では内在性 SH3P2、および EGFP-SH3P2 のいずれも Ser²⁰² がリン酸化されており、このとき Myo1E との結合は認められなかった。一方、EGFP-SH3P2 (S202A) では、Myo1E との結合が確認できた。

さらにこれらの細胞株を用いて、① 膜タンパク質および② 分泌タンパク質に着目して解析を試みた結果、CD44、MMP-3、および MMP-9 が SH3P2/Myo1E によって発現、分泌調節される可能性を見いだした。なお、インテグリンβ1、MT1-MMP、あるいは MMP-2 に関しては有意な影響は認められなかった。

(2) SH3P2 及び Myo1E の SH3 Domain 結合分子の同定

① SH3P2 の SH3 Domain 結合分子の同定

GST pull down assay によって SH3P2 と特異的に結合する分子の同定を進めた結果、分子量約 230 kDa のタンパク質 (p230) が SH3P2 の SH3 Domain に結合する可能性を見出した。

② Myo1E の SH3 Domain 結合分子の同定

①と同様にして、Myo1E の SH3 Domain と特異的に結合する分子の同定を進めた結果、分子量約 40 kDa (p40)、および 55 kDa (p55) のタンパク質が結合すること、さらにそれは運動能の高い細胞において認められることを確認した。また、MALDI-TOF を利用して同定を進めた結果、p40 は SRBC (sdr-related gene product that binds to g-kinase) であることが明らかとなった。なお、SRBC はごく最近、カベオラの形成に関与することが報告されており、現在その点との関連に着目して解析を進めている。

p230、および p55 については、同定を進めている。

(3) SH3P2/Myo1E 複合体形成制御の破綻とがん細胞運動・浸潤能亢進の関連

① SH3P2 のリン酸化

SH3P2 の Ser²⁰² リン酸化を認識する抗体を作成して、各種がん細胞株における SH3P2 のリン酸化状態を比較検討した結果、ERK-MAP キナーゼ経路が恒常的にリン酸化/活性化されているがん細胞株では、RSK1 のリン酸化とともに、SH3P2 の Ser²⁰² のリン酸化が亢進していること、さらにそれは PD184352 (MEK 阻害剤)、あるいは

BI-D1870 (RSK 阻害剤) によって抑制されることを確認した。また、それらの細胞株では共通して高い運動・浸潤能を有することを明らかにした。

② Myo1E のリン酸化

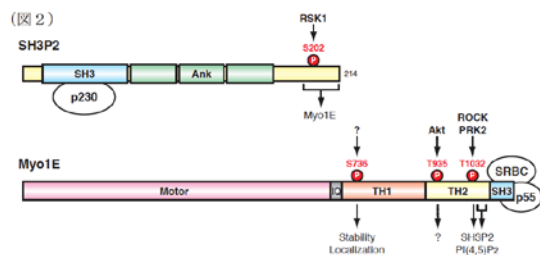
Myo1E がリン酸化によって機能制御される可能性に着目して解析を進めたところ、細胞外刺激に応答して Ser⁷³⁶、Thr⁹³⁵、および Thr¹⁰³² がリン酸化されることを見いだした。また、各種阻害剤、および非リン酸化変異体 (S736A、T935A、T1032A) を利用した解析により、Thr⁹³⁵ のリン酸化には PI3K-Akt 経路が、Thr¹⁰³² のリン酸化には RhoA-ROCK、あるいは Rac1-PRK2 経路が関与することを明らかにした。なお、Ser⁷³⁶ に関しては上記経路、および ERK-MAP キナーゼ経路に依存しない、他の経路によってリン酸化される可能性が示唆された。(現在、各部位の特異的リン酸化抗体を作成中。)

③ Myo1E のリン酸化と機能制御

Myo1E のリン酸化の意義を明らかにするために、Myo1E 非リン酸化変異体などを利用しながら解析を進め、Ser⁷³⁶ のリン酸化は Myo1E の細胞内局在、細胞膜ラッピング形成、および Myo1E 分子の安定性に関与すること、Thr⁹³⁵ のリン酸化は細胞膜ラッピング形成に関与することを見いだした。一方、Thr¹⁰³² のリン酸化は SH3P2 との結合に関与することを見いだした。

(4) SH3P2 遺伝子変異マウスの解析

ヘテロ接合体同士の交配により、SH3P2 遺伝子変異のホモ接合体を作出した。作出したホモ接合体は正常に出生、生育することが確認された。現在、マウスの生育過程を経時的に観察している。



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 6 件)

- ① Susumu Tanimura, Junya Hashizume, Yukiko Kurosaki, Kanako Sei, Aiko Gotoh, Rika Ohtake, Michihiro Kawano, Kazushi Watanabe and Michiaki Kohno, SH3P2 is a negative regulator of cell

motility whose function is inhibited by ribosomal S6 kinase-mediated phosphorylation, Genes Cells, in press, 2011, 査読有

- ② Kazushi Watanabe, Susumu Tanimura, Aya Uchiyama, Toshiaki Sakamoto, Takumi Kawabata, Kei-ichi Ozaki and Michiaki Kohno, Blockade of the extracellular signal-regulated kinase pathway enhances the therapeutic efficacy of microtubule-destabilizing agents in human tumor xenograft model. Clin. Cancer Res., 16, 1170-1178, 2010, 査読有

- ③ Kei-ichi Ozaki, Masaki Kosugi, Nobuyuki Baba, Kohsuke Fujio, Toshiaki Sakamoto, Shinya Kimura, Susumu Tanimura and Michiaki Kohno, Blockade of the ERK or PI3K-Akt signaling pathway enhances the cytotoxicity of histone deacetylase inhibitors in tumor cells resistant to gefitinib or imatinib, Biochem. Biophys. Res. Commun., 391, 1610-1615, 2010, 査読有

- ④ Satoru Tamura, Yuuhi Hattori, Masafumi Kaneko, Nobuhiro Shimizu, Susumu Tanimura, Michiaki Kohno and Nobutoshi Murakami, Peumusolide A, unprecedented NES non-antagonistic inhibitor for nuclear export of MEK., Tetrahedron Lett., 51, 1678-1681, 2010, 査読有

- ⑤ Yasuko Okumura, Noriyuki Sugiyama, Susumu Tanimura, Masashi Nishida, Kenji Hamaoka, Michiaki Kohno and Takahiko Yokoyama, ERK Regulates Renal Cell Proliferation and Renal Cyst Expansion in inv Mutant Mice., Acta. Histochem. Cytochem., 42, 39-45, 2009, 査読有

- ⑥ Eli Kakiashvili, Pam Speight, Faiza Waheed, Romy Seth, Monika Lodyga, Susumu Tanimura, Michiaki Kohno, Ori D. Rotstein, Andra's Kapus and Katalin Sza' szi, GEF-H1 mediates tumor necrosis factor- α -induced Rho activation and myosin phosphorylation: role in the regulation of tubular paracellular permeability., J. Biol. Chem., 284, 11454-11466, 2009, 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① 谷村 進、橋詰 淳哉、後藤 愛依子、河野 通宏、大竹 里佳、渡邊 一石、河野 通明、Myosin 1E は invadopodia の形成を介してがん細胞の浸潤を調節する、第 69 回 日

本癌学会学術総会、2010年9月23日、
大阪国際会議場、リーガロイヤルホテル大阪

- ② 谷村 進、大竹 里佳、河野 通宏、橋詰 淳哉、後藤 愛依子、黒崎 由希子、瀬井 香奈子、河野 通明、新規タンパク質SH3P2による細胞運動制御の分子機構、第83回日本生化学会大会、2010年12月8日、神戸ポートアイランド
- ③ 河野 通宏、橋詰 淳哉、森田 和幹、金丸 雄祐、谷村 進、河野 通明、新規細胞運動制御因子SH3P2はMyosin 1Eと結合する、第27回 日本薬学会九州支部大会、2010年12月11日、長崎大学
- ④ 大竹 里佳、橋詰 淳哉、中原 康子、谷村 進、河野 通明、Myosin 1Eによる細胞運動制御の分子機構、第27回 日本薬学会九州支部大会、2010年12月11日、長崎大学
- ⑤ 谷村 進、橋詰 淳哉、後藤 愛依子、渡邊 一石、河野 通明、SH3P2はMyosin 1Eの機能抑制を介して細胞運動を阻害する、第68回 日本癌学会学術総会、2009年10月3日、パシフィコ横浜
- ⑥ 橋詰 淳哉、後藤 愛依子、大竹 里佳、瀬井 香奈子、黒崎 由希子、谷村 進、河野 通明、SH3P2はMyo1Eの機能調節を介して細胞運動を制御する、第82回 日本生化学会大会、2009年10月22日、神戸ポートアイランド
- ⑦ 後藤 愛依子、大竹 里佳、河野 通宏、橋詰 淳哉、谷村 進、河野 通明、SH3P2とMyosin 1Eの相互作用による細胞運動・浸潤の制御、第24回 日本薬学会九州支部大会、2009年12月13日、九州大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷村 進 (TANIMURA SUSUMU)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：90343342

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし