

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：21601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K20641

研究課題名（和文）KIF1Cモータータンパク質を介した浸潤突起伸長の分子機構解明

研究課題名（英文）Analysis of molecular mechanisms of KIF1C-mediated invadopodia formation

研究代表者

佐事 武 (Saji, Takeshi)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90906281

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：KIF1Cはkinesin-3ファミリーの一員であり、破骨細胞などが有するポドソーム形成に重要であることが知られている。一方、がん細胞では、ポドソームと類似した細胞膜突起である浸潤突起がECMの分解に関与しているが、浸潤突起形成におけるKIF1Cの関与については不明な点である。我々は新たにc-SrcによるKIF1Cのリン酸化がPTPD1との結合を増強させ、浸潤突起の形成を促進することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、KIF1Cを介した新たな浸潤突起の形成制御に関わる分子機構が見出されたことは、社会的に意義が大きい。また、その詳細な分子機構としてc-SrcによるKIF1Cのリン酸化がPTPD1との結合を介してKIF1Cの活性化に関与していることを見出したことは細胞生物学的知見として重要である。本研究成果は今後KIF1Cのリン酸化をターゲットとした有効ながん浸潤・転移を阻害する治療方法を開発するための重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：KIF1C is a member of kinesin-3 family involved in the formation of dynamic actin-rich structures in normal cells called podosomes, which are essential for extracellular matrix (ECM) degradation. However, the role of KIF1C in formation of invadopodia, podosome-like protrusions observed in cancer cells, remains elusive. We found that c-Src-mediated phosphorylation of KIF1C may relieve auto-inhibited KIF1C by enhancing the association of KIF1C with PTPD1, possibly promoting MTs-based transport within invadopodia.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：KIF1C 浸潤突起 PTPD1 c-Src

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

浸潤突起は高浸潤性がん細胞に認められる細胞膜突起構造であり、細胞外基質を分解しながら伸長することで、がん細胞の浸潤を駆動する。がん細胞が浸潤突起を形成する過程では、多数の短い突起から1本の長い突起へと成熟し、長い突起にのみ微小管が貫入することが知られている。しかし、浸潤突起は極めて微小な構造であるため、短い突起から長い突起に成熟する仕組みはほとんど解明されていない。申請者はc-Srcキナーゼとキネシンモータータンパク質KIF1Cが成熟した浸潤突起似て特異的に共局在することを発見し、c-SrcキナーゼによるKIF1Cのリン酸化・活性化が浸潤突起の伸長に必要なことを見出した。

2. 研究の目的

本研究では、KIF1Cによる浸潤突起の動態解析とKIF1Cリン酸化依存的な新たな結合分子を明らかにすることで、浸潤突起の伸長・成熟の分子基盤の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) KIF1Cリン酸化依存的な結合タンパク質の解析

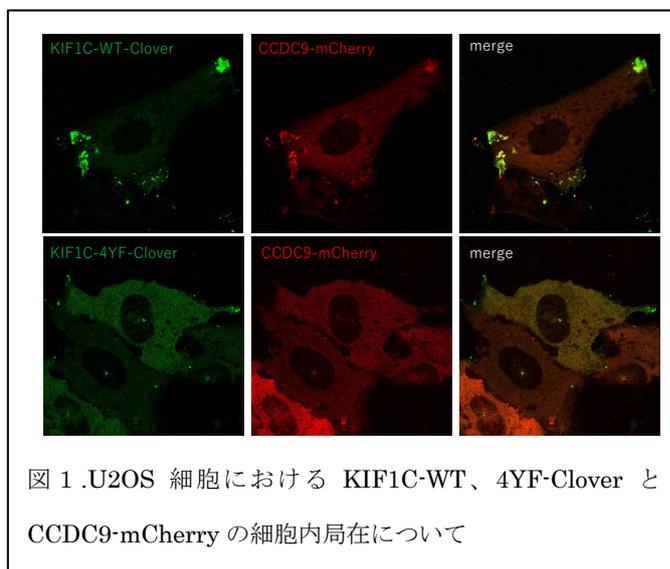
申請者はc-SrcによってKIF1Cストローク領域内の4つのチロシン残基がリン酸化されることを見出している。これらのチロシン残基をフェニルアラニンに置換したKIF1C-4YF変異体およびKIF1C-WT(野生型)をAirID(ビオチン化転移酵素)発現ベクターに挿入しKIF1C-WT, 4YF-AirID発現プラスミドを構築した。これらの発現プラスミドをKIF1CノックアウトHela-S3細胞に導入し、安定発現株を樹立した。その安定発現株に50 μ Mビオチンを含むHBSS溶液(Hanks平衡塩類溶液)で6h培養した。その後、細胞抽出液を回収し、ビオチン化タンパク質のプロテオーム解析を行った。

(2) Lattice Light Sheet Microscope (LLSM)を用いた浸潤突起の動態解析

申請は、KIF1C-WT-Cloverを導入したSaOS2細胞とsiRNAを用いてKIF1C遺伝子を抑制したSaOS2細胞を厚く塗布したマトリゲル上で培養し、その際に形成される浸潤突起についてLLSMを用いて解析した。浸潤突起についてはF-アクチンプローブであるLifeactを発現させ観察を行った。

4. 研究成果

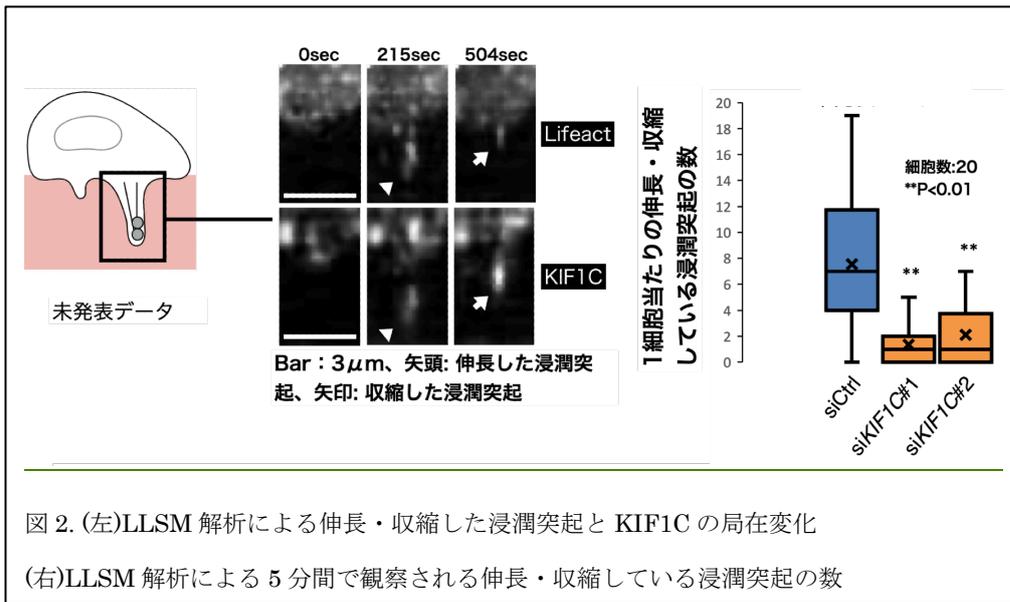
(1) 回収したビオチン化タンパク質を網羅的に解析し、KIF1C-WTとKIF1C-4YFとの比較からKIF1C-WTで最も高いスコアで検出されたタンパク質としてCCDC9が候補タンパク質として同定された。実際にCCDC9-mCherryをKIF1-WT、KIF1C-4YFのそれぞれと共発現させ細胞内での局在を観察した(図1)。その結果、KIF1C-WTとCCDC9は細胞辺縁部で強く共局在する様子が確認できた。一方でKIF1C-4YFとCCDC9ではその共局在が減少していることが示された。また、共免疫沈降法を用いて両者の生化学的相互作用について解析した結果からも、4YFはWTと比較してCCDC9との相互作用が減弱していることを見出した。これらの結果より、CCDC9はc-SrcによるKIF1Cのリン酸化・活性化依存的に結合する候補タンパク質として同定された。



(2) 浸潤突起は半減期が1~3時間と比較的安定な構造と考えられている(Flynn et al., Breast Cancer., 2008)。しかし、そのような結果は、がん細胞を薄い細胞外基質上で培養した際に見られる浸潤突起の観察から得られたものであり、生体内の三次元環境とは大きく異なる。そのため、本研究ではLLSMを用いて三次元環境のがん細胞が形成する浸潤突起の動態を高時間分解能でライブイメージング解析を行った。その結果、三次元マトリゲル中のがん細胞のライブイメージングからKIF1Cが局在する長い浸潤突起が動的に伸長と収縮を繰り返していることを見出した。また、KIF1Cの遺伝子発現の抑制はこれらの動的な浸潤突起の形成が抑制されることが明らかになった(図2)。

申請者は、c-SrcによるKIF1Cによるリン酸化が浸潤突起の伸長に必要なことを見出した。また、そのような浸潤突起は(2)の結果より、伸長と収縮を繰り返す動的な浸潤突起であり、

それらの形成にはKIF1Cが必要である。今後は、(1)で見出したKIF1Cリン酸化依存的に結合するCCDC9が動的な浸潤突起の形成に関わるのかについて解析をする。また、CCDC9がKIF1Cに結合することによって、KIF1Cのモーター活性や微小管との結合にどのような影響を与えるのかについて精製タンパク質を用いた *in vitro* の実験系などを用いて検討したいと考えている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 0件）

1. 著者名 Saji Takeshi, Nishita Michiru, Ikeda Kazuho, Endo Mitsuharu, Okada Yasushi, Minami Yasuhiro	4. 巻 298
2. 論文標題 c-Src mediated phosphorylation and activation of kinesin KIF1C promotes elongation of invadopodia in cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102090 ~ 102090
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jbc.2022.102090	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 佐事 武、西田 満、遠藤 光晴、岡田 康志、南 康博
2. 発表標題 c-Src mediated phosphorylation and activation of KIF1C promotes invadopodia maturation in cancer cells
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021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
---------	---------