

平成 26 年 4 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370085

研究課題名(和文)細胞の運動性を制御するシグナル伝達ネットワークの解明

研究課題名(英文)Elucidating the signal transduction network regulating cell motility

研究代表者

加藤 裕教 (Kato, Hironori)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：50303847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円、(間接経費) 3,960,000円

研究成果の概要(和文)：細胞運動は、がんの転移やアレルギー性疾患などにおけるリンパ球の遊走など、様々な疾患と深く関連があり、このような疾患の治療において、細胞の運動性をコントロールする仕組みを解明し、その仕組みに関わる分子をターゲットとした治療法を確立することが重要であると考えられる。本研究では、細胞の運動性に関わるシグナル伝達の中心的な役割を持つRhoファミリーG蛋白質とその活性制御因子に着目し、幾つかの新たなシグナル伝達経路とその相互作用を見出した。

研究成果の概要(英文)：Cell migration contributes a variety of diseases including tumor metastasis and lymphocyte chemotaxis in allergic diseases. It is important to elucidate molecular mechanisms underlying the regulation of cell migration to provide new therapeutic targets. In this research, we focused on Rho family G proteins and their regulators, which play key roles in signal transduction pathways leading to regulation of cell migration, and found several novel signaling pathways and their interactions.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞・組織 シグナル伝達 癌 脳・神経

1. 研究開始当初の背景

細胞運動は、がんの転移やアレルギー性疾患などにおけるリンパ球の遊走など、様々な疾患と深く関連があり、このような疾患の治療において、細胞の運動性をコントロールする仕組みを解明し、その仕組みに関わる分子をターゲットとした治療法を確立することが重要であると考えられる。現在までも、細胞—細胞外基質間の接着分子インテグリンや、細胞外基質を壊すプロテアーゼなどをターゲットとした創薬のアプローチが実際になされているが、未だ有効な治療法がないのが現状である。したがって、様々な環境下における細胞の運動性を制御する新たな細胞内シグナル伝達経路を同定するとともに、個々のシグナル伝達経路がどのように関連し影響し合いながら細胞の運動性を制御しているかを理解することは、細胞の運動性の異常が原因となっている様々な疾患を標的とした新たな分子ターゲットを探索する上でも非常に重要であり、さらにはその疾患に対する新たな診断法や治療法の開発につながる可能性が考えられる。

これまでも細胞の運動性に関わる細胞内シグナル伝達経路については数多くの研究がなされてきており、なかでもその中心的な役割を担っているのが Rho ファミリーの低分子量 G 蛋白質である。Rho ファミリー G 蛋白質は主にアクチン細胞骨格を制御することにより、様々な刺激に応答して細胞の形態変化を引き起こすスイッチ分子の役割を果たす蛋白質ファミリーで、現在までに哺乳動物では少なくとも 15 種類存在することが確認されている。一方 Rho ファミリーを活性化する因子 (GEF) はヒトでは約 60 種類、抑制する因子 (GAP) にいたっては 80 種類存在するといわれ、細胞外からの様々な刺激に応じてこれら活性制御因子が使い分けられていると考えられている。ところがその機能や作用機序が明らかになっているものはまだほんの一部にしかすぎず、今後はどのような刺激や細胞の環境によってこれら活性制御因子が使い分けられているかを解明することが、細胞の運動性の制御機構を知る上で極めて重要である。

2. 研究の目的

これまでの我々のエフリン受容体とそのシグナル伝達を中心とした研究成果から、細胞は様々な刺激に応じて Rho ファミリー G 蛋白質活性制御因子を使い分けることで非常に多様なシグナル伝達経路を活性化し、細胞の運動性を制御していることがうかがえる。そこで本研究ではこれまでのエフリンによる細胞運動の制御に関する研究をさらに発展させるとともに、未だ機能が明らかとなっていない G 蛋白質活性制御因子群に着目し、個々の G 蛋白質活性制御因子がどのようなシグナル因子の受容体の下流において働いているのか、あるいはどのような細胞の

環境下において活性化されているかについて、様々な組織やがん由来のモデル細胞や、個体を用いた in vivo での細胞の移動など多方面からのアプローチを行うことで、細胞の運動性を制御する新たなシグナル伝達経路を同定し、さらに各シグナル伝達経路間におけるネットワークの詳細な検討を行い、細胞の運動性を決定する制御機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 乳がん細胞の浸潤性に重要な EphA2-Ephexin4 シグナルの機能解析

申請者はこれまでに、浸潤性の高い乳がん細胞において EphA2 受容体と結合する Rho ファミリー G 蛋白質活性化因子 Ephexin4 を同定し、乳がん細胞の浸潤性に参与していることを明らかにした。今回、このシグナル経路ががん細胞のアノキス耐性獲得に寄与していることを以下のような方法で解析した。細胞を回収し、1% FBS を含む DMEM に懸濁した細胞懸濁液を、細胞接着を抑制することで知られている polyhydroxyethylmethacrylate (poly-HEMA) でコーティングした 24-ウェルプレートに加え、24 時間または 48 時間浮遊培養した。その後細胞を固定後、Hoechst 33258 で細胞核を染色、Hoechst 33258 により核が染まった GFP あるいは YFP 発現細胞を解析した。

2) EGF シグナルと EphA2-Ephexin4 シグナルの相互作用の解析

RhoG の活性測定については、活性型 RhoG と特異的に結合することが知られている ELMO の N 末端領域を GST と融合させた蛋白質を精製し、この蛋白質を用いて細胞溶液内における GST-ELMO と結合する活性型 RhoG の量をイムノプロット法で解析した。細胞の運動性は、孔径 8 μm のトランスウェルフィルターの上層に細胞を加え、インキュベーション後に下層側へ移動した細胞のみ検出した。

3) 神経細胞の運動性を決定するシグナル伝達ネットワークの解析

海馬神経細胞の培養は、胎生 19 日齢のラットから海馬を摘出し、トリプシン処理後、パスツールピペットでピペッティングすることにより海馬を分散し細胞懸濁液を得た。分散した細胞を poly-L-lysine コートしたカバーガラスに加え、培養を行った。海馬ニューロンへの遺伝子導入は Lipofectamine 2000 を用いて、その添付文書に従い行った。

4) Rho ファミリー G 蛋白質活性制御因子の結合蛋白質の探索

Rho ファミリー G 蛋白質活性制御因子について、各分子の G 蛋白質結合領域以外の部分を使った酵母の two-hybrid スクリーニング

を行った。得られたクローンについては、その結合を *in vitro* や細胞内の免疫沈降の系で確認するとともに、Rho ファミリー G 蛋白質の活性に対する影響を調べた。

4. 研究成果

1) 乳がん細胞の浸潤性に重要な EphA2-Ephexin4 シグナルの機能解析

乳がん細胞の浸潤性に重要な EphA2-Ephexin4 シグナルの機能解析に関する研究において、EphA2-Ephexin4 シグナルが、がん細胞の持つアノキス耐性能の獲得に重要な役割を担っていることを新たに見いだした。上皮細胞は、細胞外マトリックス (ECM) に接着することで、細胞の増殖、生存が可能であり、正常な上皮細胞が ECM との接着を喪失すると、アノキスと呼ばれるプログラム細胞死を引き起こすことが知られている。一方で、上皮組織由来のがん細胞は、アノキスに対する耐性能を獲得しており、アノキス耐性能はがん細胞が原発巣から他の組織へと転移していく過程で必要不可欠な機能であると考えられている。このアノキス耐性能を誘導するシグナル伝達において、EphA2-Ephexin4 を介した RhoG の活性化、さらにはその下流において PI3 キナーゼ-Akt 経路の活性化が重要な役割を担っていることを明らかにした。この研究成果は、RhoG 活性化因子 Ephexin4 の新たな機能の解明につながったのみならず、がん細胞の転移に関わる分子基盤の解明に大きく貢献することが考えられる。

2) EGF シグナルと EphA2-Ephexin4 シグナルの相互作用の解析

過去の研究において、EphA2 の 897 番目のセリン (S897) のリン酸化が、がんの悪性度と深く関連があることが指摘されている。今回の研究では、EphA2 の S897 のリン酸化が EphA2 と RhoG 活性化因子である Ephexin4 との結合を促進することを見だし、EphA2 の S897 をアラニンに置換した S897A 変異体は、野生型に比べ細胞運動の促進やアノキス耐性作用が見られず、かつ RhoG を活性化できないことを明らかにした。従って、EphA2 の S897 のリン酸化が、EphA2 と Ephexin4 の結合および下流のシグナル経路の活性化に必要であり、がんの浸潤・転移につながる、がん細胞の生存や運動といった機能の発揮に重要な役割を果たすことを明らかにした。

一方、エフリンの受容体ファミリーの 1 つ EphB6 は、特に浸潤性の高いがん細胞において発現が抑制されていることが報告されている。この EphB6 が EphA2 がと細胞外で結合し、EphA2 の機能を負に制御していることを新たに見いだした。

3) 神経細胞の運動性を決定するシグナル伝達ネットワークの解析

セマフォリン受容体 Plexin-D1 の結合パ

ートナーである Rnd2 が、その標的分子の 1 つ Rapostlin を介して海馬神経細胞の樹状突起スパインの発達を制御していることを新たに見いだした。樹状突起シナプス後部構造体スパインは、樹状突起から突出した小さな突起状の構造体であり、シナプス後部においてほとんどの興奮性シナプス入力を受け取る。スパインは、ニューロンの発達やシナプス活動に応じて、形態を可塑的に変化させることが知られ、Rapostlin は膜輸送機構を介してスパインの発達制御に関与していることが示唆された。

4) Rho ファミリー G 蛋白質活性制御因子の結合蛋白質の探索

Rac 特異的活性化因子 Dock4 は、これまでのゲノムワイド関連解析から自閉症、統合失調症、失読症といった神経発達障害の発症と深く関わりがあるリスク因子である可能性を示す報告が相次いでいる。本研究では Dock4 が興奮性シナプス後部構造体である樹状突起スパインに局在が見られ、その形成を促進的に制御していることを見いだした。また Dock4 の新たな結合タンパク質としてアクチン重合制御分子 cortactin を同定し、Dock4 によるスパイン形成の制御に cortactin との結合が不可欠であることを明らかにした。

一方、以前の我々の研究において、Dock4 は乳がん細胞における運動性や浸潤性の促進に深く関わっていることが明らかになっている。ところが、がん細胞における Dock4 の活性制御の分子メカニズムについては不明であった。本研究では Dock4 の新たな結合タンパク質として、リン脂質結合タンパク SH3YL1 を同定した。SH3YL1 が Dock4 に結合することによって、Dock4 による Rac の活性化、及びがん細胞の運動性促進作用を正に制御していることが明らかになった。従って、SH3YL1 が Dock4 によるがん細胞の運動性制御に重要であり、がんの浸潤・転移につながる機能の発揮に重要な役割を果たすことが考えられる。

Rho ファミリー G タンパク質活性制御因子の 1 つ、Ephexin4 の新たな結合タンパク質として Scribble を同定し、その結合を *in vitro* や細胞内の免疫沈降の系において確認した。さらに Ephexin4 による細胞運動性の促進作用に対して Scribble が負の制御していることを新たに見いだした。

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 5 件)

1) Masakazu Kobayashi, Kohei Harada, Manabu Negishi, Hironori Katoh. (2014) Dock4 forms a complex with SH3YL1 and regulates cancer cell migration. **Cellular Signalling** Vol. 26, 1082-1088, 査読有

DOI:10.1016/j.cellsig.2014.01.027

2) Shuhei Ueda, Manabu Negishi, Hironori Katoh. (2013) Rac GEF Dock4 interacts with cortactin to regulate dendritic spine formation. **Molecular Biology of the Cell** Vol. 24, 1602-1613, 査読有
DOI:10.1091/mbc.E12-11-0782

3) Hiromu Kawai, Masakazu Kobayashi, Nao Hiramoto-Yamaki, Kohei Harada, Manabu Negishi, Hironori Katoh. (2013) Ephexin4-mediated promotion of cell migration and anoikis resistance is regulated by serine 897 phosphorylation of EphA2. **FEBS Open Bio** Vol. 3, 78-82, 査読有
DOI:10.1016/j.fob.2013.01.002

4) Kohei Harada, Nao Hiramoto-Yamaki, Manabu Negishi, Hironori Katoh. (2011) Ephexin4 and EphA2 mediate resistance to anoikis through RhoG and phosphatidylinositol 3-kinase. **Experimental Cell Research** Vol. 317, 1701-1713, 査読有
DOI: 10.1016/j.yexcr.2011.05.014

5) Yohei Wakita, Tetsuhiro Kakimoto, Hironori Katoh, Manabu Negishi. (2011) The F-BAR protein Rapostlin regulates dendritic spine formation in hippocampal neurons. **The Journal of Biological Chemistry** Vol. 286, 32672-32683, 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M111.236265

〔学会発表〕(計 9 件)

1) 赤田麻衣、原田耕平、根岸 学、加藤裕教、がん細胞における EphA2 と EphB6 の相互作用の解析、第 86 回日本生化学会大会 2013 年 9 月 13 日 パシフィコ横浜

2) 小林大師、原田耕平、根岸 学、加藤裕教、Dock4 と SH3YL1 との結合によるがん細胞の運動制御、第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日、パシフィコ横浜

3) 原田耕平、根岸 学、加藤裕教、Ephexin4-RhoG シグナル制御における Scribble の役割、第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 16 日 福岡国際会議場

4) 川合宏武、小林大師、平本-山木奈央、原田耕平、根岸 学、加藤裕教、EphA2 の 897 番目のセリンのリン酸化は、Ephexin4/RhoG によるがん細胞の運動とアノイクス耐性を制御する、第 85 回日本生化学会大会 2012 年 12 月 16 日 福岡国際会議場

5) 上田修平、根岸 学、加藤裕教、海馬ニューロンの樹状突起スパイン形成における Rac 活性化因子 Dock4 の役割、第 84 回日本

生化学会大会 2011 年 9 月 24 日 京都国際会議場

6) 上田修平、根岸 学、加藤裕教、Rac1 活性化因子 Dock4 は海馬ニューロンの樹状突起スパイン形成を制御する、第 34 回日本神経科学大会 2011 年 9 月 17 日 パシフィコ横浜

7) 脇田洋平、柿本哲宏、加藤裕教、根岸 学、The F-BAR ドメイン蛋白質 Rapostlin は海馬ニューロンにおいてエンドサイトーシスと樹状突起スパイン形成を制御する、第 34 回日本神経科学大会 2011 年 9 月 15 日 パシフィコ横浜

8) Shuhei Ueda, Manabu Negishi, Hironori Katoh. The Rac-specific GEF Dock4 controls dendritic spine formation in hippocampal neurons. The 41th annual meeting of the Society for Neuroscience 2011 Nov. 12 to 16 in Washington, DC.

9) Yohei Wakita, Tetsuhiro Kakimoto, Hironori Katoh, Manabu Negishi. The role of F-BAR protein Rapostlin/FBP17 in dendritic spine formation in hippocampal neurons. The 41th annual meeting of the Society for Neuroscience 2011 Nov. 12 to 16 in Washington, DC.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/negishi/j/toppu.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤裕教 (KATOU, Hironori)

京都大学・大学院生命科学研究科・准教授

研究者番号：50303847

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：