

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460291

研究課題名(和文) S100蛋白によるHelix Repeat Proteinを介した癌細胞増殖制御

研究課題名(英文) Regulation of Cancer cell growth by S100 proteins via Helix repeat proteins

研究代表者

山口 文徳 (Yamaguchi, Fuminori)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：40271085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：S100A2, A6蛋白質は、カテニンの1番目のアルマジロリピートに結合し、BCL9との結合を阻害した。HEK293細胞では、S100A6の過剰発現がTCF4の転写活性を阻害した。HCT116, HT29細胞のS100A6をノックダウンするとサイクリンD1の発現が増加した。S100A6の過剰発現は細胞増殖を抑制した。また、S100A1, A2, A6蛋白質は、Vitroの系でHsp90/PP5/cdc37複合体形成を阻害し、cdc37の脱リン酸化を抑制した。COS7細胞でのS100蛋白質の過剰発現でも同様にcdc37の脱リン酸化を抑制し、cdc37による蛋白成熟に影響を与えることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：S100A2 and S100A6 bound to the first armadillo repeat of beta-catenin and inhibited the beta-catenin-BCL9 interaction. Over-expression of S100A6 in HEK293 cells inhibited the transcriptional activity of TCF4. Knocking down of S100A6 in HCT116 and HT29 increased the cyclin D1 expression. And over-expression of S100A6 inhibited the cell growth. S100A2, A2, and A6 inhibited the Hsp90/PP5/cdc-37 complex formation and inhibited the dephosphorylation of cdc-37 protein in vitro. Over-expression of these S100 proteins in COS7 cells also inhibited the cdc-37 dephosphorylation that could influence the maturation of client proteins of cdc37.

研究分野：生理学

キーワード：S100 proteins Helix repeat proteins protein phosphatase 5 beta catenin cdc-37

### 1. 研究開始当初の背景

Helix Repeat Protein は他の蛋白質との相互作用の場となる反復配列を持つ一群の蛋白質であり、この中にはアルマジロリピート (AR) や テトラトリコペプチドリピート (TPR) 蛋白質が含まれる。この中で、AR をもつ カテニン は Wnt/ カテニンシグナル系を構成し、細胞の増殖・分化に關与する。

カテニンと他の蛋白質の複合体は、細胞内カテニン蛋白質の量を調節することによりターゲット遺伝子の発現調節をおこなっており、カテニンの異常な蓄積は細胞の癌化を起す。またプロテインホスファターゼ 5 (PP5) は TPR をもつ脱リン酸化酵素であり、Hsp90 や cdc37 と複合体を形成し、cdc37 のリン酸化状態を調節することにより Client 蛋白質の機能的成熟を調節している。この系の異常によっても細胞の癌化が起こることが知られている。

### 2. 研究の目的

(1) S100 蛋白質の カテニン複合体に対する効果を明らかにする：大腸菌で発現精製した蛋白質を用いて各種 S100 蛋白質がカテニン蛋白質複合体を構成する個々の蛋白質とカテニンとの結合や複合体形成にどのような効果があるかを調べる。

(2) S100 蛋白質の Wnt/ カテニンシグナル系を介した癌細胞増殖に対する効果とメカニズムを明らかにする：In Vitro の実験結果をもとに各種癌細胞を用いて、カテニン蛋白質複合体に対する S100 蛋白質の影響について調べる。各 S100 蛋白質の発現は組織特異性があるため、まずそれぞれの癌細胞における各 S100 蛋白質の発現とこのシグナル系への關与について調べる。さらに S100 蛋白質がカテニンのリン酸化を介してこのシグナル系に關与していることを確認し、癌細胞増殖に対する影響とその詳細なメカニズムを調べる。

(3) S100 蛋白質による Hsp90 複合体に対する効果を明らかにする：大腸菌で発現精製した蛋白質を用いて S100 蛋白質の Hsp90 蛋白質複合体を構成する個々の蛋白質 (PP5, cdc37, Hsp90 および Client 蛋白質) 間の結合や複合体形成に対する影響を調べ、その結合部位を明らかにする。それに加え、S100 蛋白質が cdc37 のリン酸化状態に対する影響、およびそのメカニズムを明らかにする。

(4) S100 蛋白質の Hsp90/PP5/cdc37 シグナル系を介した癌細胞増殖に対する効果とメカニズムを明らかにする：In Vitro の実験結果をもとに各種癌細胞を用いて、Hsp90/PP5/cdc37 シグナル系に対する S100 蛋白質の影響について調べる。さらに S100 蛋白質の cdc37 のリン酸化を介したこのシグナル系への關与を確認し、癌細胞増殖に対する影響と詳細なメカニズムを調べる。

### 3. 研究の方法

1 癌細胞における S100 蛋白質の発現と Wnt/ カテニンシグナル系の異常および両者の關係：

S100 蛋白質の発現は組織特異性があり、また細胞の癌化により発現が変化するため、まずそれぞれの癌細胞における各 S100 蛋白質の発現種とその量をウエスタンブロットを用いて調べる。同時に Wnt/ カテニンシグナル系の異常 (カテニン蛋白質複合体を形成する蛋白質の質 (配列異常) や量を調べる。実験に使用する癌細胞については大腸癌、肝癌、子宮癌、前立腺癌等、文献を参考にしこの系に異常があるものを優先的に用いる。

2. 癌細胞における S100 蛋白質の カテニン蛋白質複合体形成および カテニンのリン酸化状態および癌細胞増殖に対する効果：

カテニンシグナル系に影響を与える S100 蛋白質を細胞内に過剰に発現、または siRNA によりロックダウンし、イオノマイシン等のカルシウムイオノフォアで刺激した後に、免疫沈降によりカテニン複合体の形成に S100 蛋白質が影響していることを明らかにする。またこの結果としてカテニンの量やリン酸化状態に変化があるかどうかをウエスタンブロットにて明らかにする。また TCF とカテニンの結合による転写活性に対する影響についてはターゲットとなる遺伝子の reporter gene プラスミドを発現させて確認する。

同時に癌細胞の増殖や細胞死に対する S100 蛋白質の影響、シグナル系の変化を細胞周期の解析、アポトーシス解析、リアルタイム PCR やウエスタンブロットにて明らかにする。

3. 癌細胞における S100 蛋白質の発現と Hsp90/PP5/cdc37 シグナル系の異常および両者の關係：Hsp90/PP5/cdc37 シグナル系に異常がある各種癌細胞を用いて、カテニンと同様に各 S100 蛋白質の発現種とその量をウエスタンブロットを用いて調べ、S100 蛋白質と關連があるかどうか比較する。同時にこのシグナル系の異常 (蛋白質複合体を形成する蛋白質の質 (配列異常) や量) について詳細に調べる。

4. 癌細胞における S100 蛋白質の Hsp90/PP5/cdc37 蛋白質複合体形成および cdc37 のリン酸化状態や癌細胞増殖に対する効果：カテニンと同様に S100 蛋白質の過剰発現またはロックダウン後に、カルシウムイオノフォアで刺激し、免疫沈降により蛋白質複合体の形成に S100 蛋白質が影響していることを明らかにする。またこの結果として cdc37 の量やリン酸化状態に変化があるかどうかを明らかにする。この系では機能的に成熟した Client 蛋白質が癌細胞の増殖に影響を与える。癌化に關与する重要な Client 蛋白質の発現量や活性化について S100 蛋白質の影響を調べる。

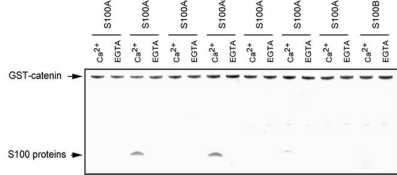
同時に癌細胞の増殖や細胞死に対する S100 蛋白質の影響、シグナル系の変化を細胞周期の解析、アポトーシス解析、リアルタイム PCR

やウエスタンブロットにて明らかにする。

#### 4. 研究成果

(1) S100 蛋白質の カテニン複合体に対する効果：大腸菌で発現精製した カテニンと S100 蛋白質を用いてカルシウム存在/非存在下でプルダウンアッセイをおこなったところ、S100A2 と A6 が カテニンに結合した。さらに カテニンに結合する蛋白質に対する影響を検討したところ、S100 蛋白質が BCL9 と  $\beta$  カテニンの結合を阻害することが明らかになった。

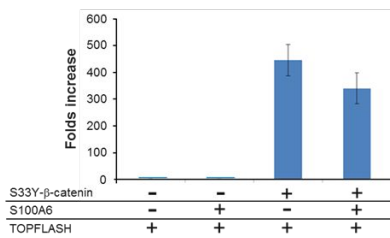
A



B

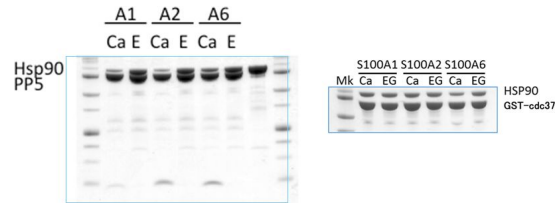


(2) S100 蛋白質の Wnt/ カテニンシグナル系を介した癌細胞増殖に対する効果：癌細胞における S100 蛋白質の発現を検討したところ、HEK293 では S100A1, COS-7, HT29 と HCT116 細胞では S100A6 が多量に発現していた。S100 蛋白質の カテニンシグナル系への影響を検討するため、HEK293 細胞に TCF レポータージーンを導入し、ルシフェラーゼアッセイをおこなったところ、S100A6 蛋白質の過剰発現は TCF のプロモータ活性を抑制することがわかった。

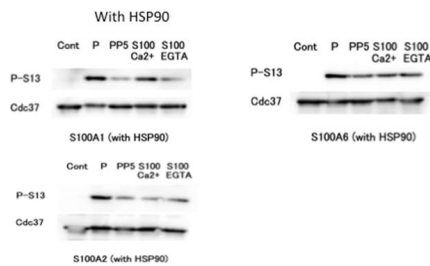


HT29 細胞に S100A6 の SiRNA をトランスフェクションし S100 蛋白質の発現を抑制したところ、カテニンシグナル系のターゲット蛋白質であるサイクリン D1 の発現が増加した。サイクリン D1 は細胞周期調節蛋白質であり、S100A6 の発現抑制によりサイクリン D1 が増加することは S100A6 が カテニンシグナル系による癌細胞増殖に抑制的に働いていることが示唆された。また HEK293 細胞において カテニンと S100A6 または Mock(ベクター-only)を過剰発現したところ、コントロールと比較して S100A6 の過剰発現は細胞増殖を抑制した。このことから S100A6 が カテニンシグナル系に作用して癌細胞増殖を抑制することがわかった。

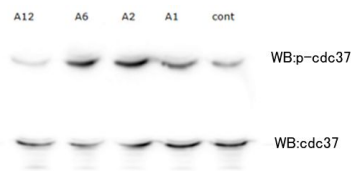
(3) S100 蛋白質による Hsp90 複合体に対する効果：細胞内では PP5/Hsp90/cdc37 が複合体を形成し各種蛋白質の成熟に参与している。まず、大腸菌にて Hsp90、PP5、cdc37、S100 蛋白質を発現・精製し、カルシウム存在/非存在下にてプルダウン実験をおこなったところ、S100A1,A2,A6 がカルシウム依存性に Hsp90 と PP5 の結合を阻害したが、Hsp90 と cdc37 の結合には影響を与えなかった。



また大腸菌からのリコンビナント cdc37 蛋白質をリン酸化したものを用いて PP5 による脱リン酸化を各種 S100 蛋白質存在下で検討したところ、S100A1,A2 存在下では PP5 によるリン酸化 cdc37 の脱リン酸化が阻害されることがわかった。



(4) S100 蛋白質の Hsp90/PP5/cdc37 シグナル系を介した癌細胞増殖に対する効果とメカニズム：COS7 細胞に S100A1, S100A2, S100A6,S100A12 を過剰発現させ cdc37 のリン酸化状態を検討したところ、S100A1>S100A2=S100A6 の順で cdc37 の脱リン酸化が抑制された。また、COS7 細胞に PP5、cdc37、および S100 蛋白質を過剰発現させて、Hsp90/PP5/cdc37 複合体形成に対する S100 蛋白質の影響を検討したところ、S100A1 や S100A2 ではカルシウム依存性に著明に複合体形成が阻害された。



これらの結果から、S100 蛋白質は細胞内において Hsp90/PP5/cdc37 複合体形成を阻害し、cdc37 の脱リン酸化を抑制することにより、クライアント蛋白質の成熟やガン細胞増殖に影響を与えることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Yamaguchi F., Yamamura S, Shimamoto S, Tokumitsu H, Tokuda M., Kobayashi R: Suramin is a Novel Activator of PP5 and Biphasically Modulates S100-Activated PP5 Activity. Appl. Biochem. Biotechnol. 172(1): 237-247, 2014.

Tsuchiya M, Yamaguchi F., Shimamoto S, Fujimoto T, Tokumitsu H, Tokuda M, Kobayashi R: Oxidized S100A4 inhibits the activation of protein phosphatase 5 through S100A1 in MKN-45 gastric carcinoma cells. Int. J. Mol. Med. 34(6): 1713-1719, 2014

[学会発表](計 4 件)

山口文徳、土屋光正、嶋本聖子、藤本智仁、徳光浩、小林良二、徳田雅明  
酸化ストレスはS100蛋白質によるPP5の活性化を阻害する Oxidative Stress Inhibits the Activation of Protein Phosphatase 5 by S100 Proteins  
第93回日本生理学会大会  
札幌, 2016

山口文徳、平田祐子、ホセインアクラム、神鳥和代、董有毅、野口知里、片木絢子、徳田雅明  
S100蛋白質によるHelix Repeat蛋白質の機能制御- カテニンを介した癌細胞増殖の調整機構-  
第91回日本生理学会大会  
鹿児島, 2014

Yamaguchi F., Umeda Y., Tsuchiya M., Tokumitsu H., Tokuda M.  
Modulation of protein phosphatase 5 function by S100 proteins  
11th International Conference on Protein Phosphatase  
仙台, 2014

山口文徳、平田祐子、ホセインアクラム、神鳥和代、董有毅、徳田雅明  
S100蛋白質によるHelix Repeat蛋白質の機能制御- カテニンを介した癌細胞増殖の調整機構-  
第65回日本生理学会中国四国地方会  
岡山, 2013

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 文徳 (YAMAGUCHI, Fuminori)  
香川大学・医学部・細胞情報生理学・准教授  
研究者番号: 40271085

(2)研究分担者

徳田 雅明 (TOKUDA, Masaaki)  
香川大学・医学部・細胞情報生理学・教授  
研究者番号: 10163974

神鳥 和代 (KAMOTORI, Kazuyo)

香川大学・医学部・細胞情報生理学・助教  
研究者番号: 40457338

董 有毅 (Dong Youyi)

香川大学・医学部・細胞情報生理学・助教  
研究者番号: 90457341