

SH3P2 / Myosin1E 複合体による 細胞運動制御の分子機構

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科生命薬科学専攻 橋詰 淳哉

【目的】

細胞運動は、器官形成、免疫応答、創傷治癒など、多様な生命現象の調整において本質的な役割を果たしており、それが適切に制御されることは、多細胞生物の恒常性維持において極めて重要である。細胞運動制御機構の破綻は、血管性疾患、慢性炎症性疾患、がんの進展など、様々な疾患の発症、悪性化に密接に関連している。例えば、がん細胞においてその運動性が異常亢進すると、リンパ管・血管への侵入、それに引き続いて他の組織への浸潤、転移巣の形成へと連動する。すなわち、細胞運動の制御機構を分子レベルで明らかにする事は、がんの転移抑制に対する治療戦略を検討する上でも、基本的な情報を与えてくれる可能性が高く、現在の生物学における最重要研究課題の一つである。これまでに解析より、ERK-MAP キナーゼ経路や PI3 キナーゼ-Akt 経路などが、細胞運動制御において本質的な役割を果たしている事が報告されているが、一方、その詳細な分子機構に関しては未だに不明な点が多い。本研究では、細胞運動制御機構に関する分子レベルでの理解を深める事を目的として、それに関与する新規タンパク質の探索、同定、その機能解析を進めた。

【実験方法・結果】

細胞運動制御に関与する新規タンパク質を同定する目的で、ヒト子宮頸がん由来細胞株 HeLa S3 細胞の形態変化を指標として、発現クローニング法を用いて解析した。その結果、Proline-rich ドメイン、Src homology 3 (SH3) ドメイン、3つの Ankyrin repeat を含むタンパク質、SH3P2 を同定した。SH3P2 は当初、SH3 ドメインを含むタンパク質の網羅的な解析より同定されたもので、これまでに骨吸収や骨形成に関与する可能性が示唆されているが、その生理機能に関しては不明な点が多い。本研究では、SH3P2 が細胞運動制御に関与する分子である可能性に焦点を当てて検討した。

(1) SH3P2 を HeLa S3 細胞に過剰発現、あるいは RNAi 法を用いて発現を抑制した際、細胞運動が如何に影響されるかを解析したところ、SH3P2 の過剰発現によって運動能は顕著に低下し、一方、発現抑制によって運動能が大幅に亢進される事を見出した。これより、SH3P2 は細胞の運動を「負」に調節する機能を有する可能性が示唆された。そこで、運動能が亢進しているがん細胞では SH3P2 の発現が低下している可能性に着目し、様々ながん細胞株における SH3P2 の発現量と運動能の関連を解析したところ、正常細胞と比較して、幾つかのがん細胞株では SH3P2 の発現量低下、及び運動亢進が認められた。しかし、SH3P2 の発現が低下していないにも関わらず、高い運動能を有するがん細胞株が多く存在した。これより、SH3P2 の発現量自体も細胞運動能に影響を与えるが、その機能は、例えば翻訳後修飾によっても、調節される可能性が示唆された。

(2) SH3P2 の一次配列中に、様々なキナーゼによってリン酸化されうる Ser、Thr 残基が複数存在することから、SH3P2 の機能がリン酸化によって調節される可能性

に注目した。具体的には、27番目の Thr が MAP キナーゼファミリーによるリン酸化配列である Pro-X-Ser/Thr-Pro、195番目の Thr、202番目の Ser が AGC キナーゼファミリーによるリン酸化配列である Arg/Lys-X-Arg/Lys-X-X-Ser/Thr に相当する。そこで、各モチーフ配列のリン酸化 Ser / Thr を認識する抗体、各種キナーゼ阻害剤、および *in vitro* kinase assay を用いて解析した結果、SH3P2 の Ser²⁰² が ERK-MAP キナーゼの下流に位置する RSK によってリン酸化されることを明らかにした。

(3) 幾つかのがん細胞において、SH3P2 のリン酸化と運動能の間に相関が認められる可能性を検討した。その結果、ERK-MAP キナーゼ経路が恒常的に活性化されているがん細胞では、RSK のリン酸化 (活性化) および SH3P2 のリン酸化の亢進が認められ、それらは共通して高い運動・浸潤能を有していることを確認した。さらに、ERK-MAP キナーゼ経路が恒常的に活性化され、高い運動・浸潤能を有しているヒト繊維芽肉腫細胞株 HT-1080 細胞に、SH3P2、あるいは SH3P2 (S202A) 変異遺伝子を導入し、浸潤能がどのように影響されるかを解析した。その結果、SH3P2 発現細胞では有意な影響が認められなかったが、SH3P2 (S202A) 発現細胞では運動・浸潤能が大幅に低下する事を見出した。HeLa S3 細胞 (ERK-MAP キナーゼ経路の機能亢進が認められない) に SH3P2 を過剰発現させた際、細胞運動能が抑制されたことを考え併せた際、SH3P2 は細胞運動・浸潤能を「負」に制御する機能を有しているが、それは ERK-MAP キナーゼ経路依存的な Ser²⁰² のリン酸化によってキャンセルされる可能性が強く示唆された。

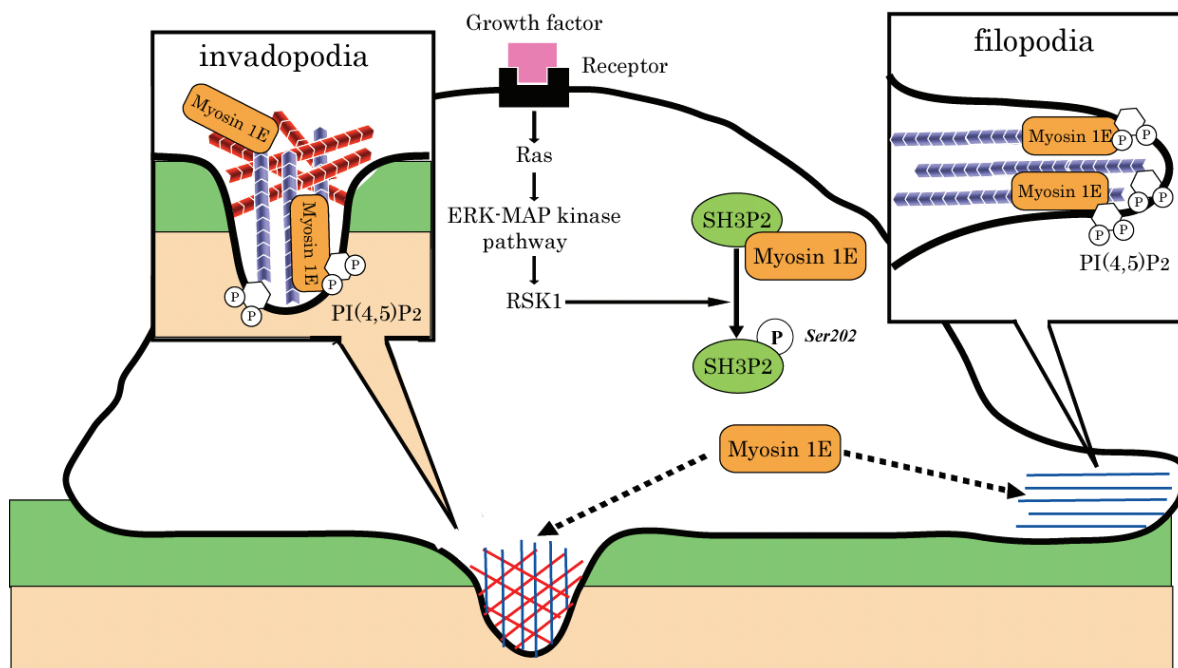
(4) SH3P2 には、他のタンパク質との相互作用に密接に関与する SH3 ドメインが存在する。そこで、SH3P2 の具体的な生理機能を解明する目的で、GST-pull down assay を用いて、SH3P2 と結合するタンパク質を探索した。その結果、SH3P2 はアクチンモータータンパク質である Myosin1E と特異的に結合することを見出した。次に、SH3P2 と Myosin1E との結合が、SH3P2(Ser²⁰²)リン酸化によって制御される可能性に着目して解析した、その結果、ERK-MAP キナーゼ経路依存的な SH3P2 のリン酸化亢進に伴って SH3P2 / Myosin1E 複合体が解離すること、この解離は非リン酸化型 SH3P2 (S202A) の過剰発現によって抑制されることを見出した。これより、SH3P2 から解離した Myosin1E が細胞運動・浸潤を亢進させること、SH3P2 は Myosin1E と結合することによってその機能を抑制し、結果的に細胞運動・浸潤を「負」に調節する可能性が示唆された。この点を確認する目的で、ERK-MAP キナーゼ経路が恒常的に活性化されているがん細胞において、RNAi 法により Myosin1E の発現を抑制したところ、顕著な運動・浸潤能の低下を認めた。以上のことから、ERK 経路が恒常的に活性化されているがん細胞株では、SH3P2 から解離した Myosin1E が豊富に存在し、これが運動・浸潤能亢進に連動している可能性が示唆された。

(5) 細胞運動が起こる際には、アクチン骨格の再編成に伴って filopodia (糸状仮足)、および lamellipodia (葉状仮足) の形成が、一方、細胞が浸潤する際には、invadopodia (浸潤突起) の形成が認められ、それらが細胞運動・浸潤の推進力になる。近年、これらの構造体を形成する上で、細胞膜構成脂質の一種であるホスホイノシタイド (filopodia、invadopodia の形成においては PI(4,5)P₂、lamellipodia の形成において PI(3,4,5)P₃) が重要な役割を果たしていることが報告されている。そこで、Myosin1E が PI(4,5)P₂、PI(3,4,5)P₃ との相互作用を介して、細胞運動・浸潤能を調節する可能性に注目した。まず、細胞分画法を用いて Myosin1E の細胞内局在を検討したところ、Myosin1E は細胞質および細胞膜に存在した。次いで、PIP beadsTM (各種ホスホイノシタイドが結合したビーズ) を用いた解析より、Myosin1E は PI(4,5)P₂ および

PI(3,4,5)P₃に結合し、特にPI(4,5)P₂に高い親和性を持つことを明らかにした。次に、Myosin1EがPI(4,5)P₂との結合を介して、filopodia、およびinvadopodiaの形成を促進する可能性を検討する目的で、HeLa S3細胞にMyosin1Eを過剰発現させ、糸状に突き出たF-actinをfilopodiaの指標として、免疫染色法で観察した。その結果、filopodiaにMyosin1Eが局在すること、さらにfilopodiaの形成はMyosin1Eの過剰発現によって顕著に増加することを見出した。なお、Myosin1Eの過剰発現によって誘導されたfilopodiaはSH3P2の共発現によって抑制された。また、ヒト乳がん細胞株MDA-MB-231細胞を蛍光標識したgelatinの上に播種し、gelatinが分解されて蛍光が脱落した部分をinvadopodiaの指標として免疫染色法を行ったところ、invadopodiaにMyosin1Eが集積することを見出した。また、Myosin1Eの発現を抑制すると、顕著にinvadopodiaの形成も抑制された。

【結論】

細胞運動制御においてERK-MAPキナーゼ経路が必須の役割を果たしている事が報告されていたが、ERK-MAPキナーゼ以降の反応系の詳細は不明であった。本研究において、ERK-MAPキナーゼ経路の下流に位置する分子としてSH3P2を同定し、それはMyosin 1Eとの複合体形成を介して、細胞運動制御において中心的な役割を果たす分子である事を見出した。すなわち、(1) SH3P2はMyosin1Eに結合し、それが不適切なタイミングで機能しないように制御する役割を担っている事、(2) ERK-MAPキナーゼ経路の活性化に伴ってRSKが活性化されると、SH3P2のSer²⁰²のリン酸化を介してSH3P2 / Myosin1E複合体が解離する事、(3) ここで解離したMyosin1Eはfilopodiaおよびinvadopodiaに集積し、それらの形成を促進する事で、脂肪運動能亢進に連動する、という一連の反応系の概要を明らかにした。



【基礎となった学術論文】

1. Tanimura* S, Hashizume* J, Kurosaki Y, Sei K, Gotoh A, Ohtake R, Kawano M, Watanabe K & Kohno M. *Genes Cells*. (in press), 2011. (* 第一著者)