



# Down-modulation of keratin 8 phosphorylation levels by PRL-3 contributes to colorectal carcinoma progression

水内, 恵理

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2010-07-13

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙3120

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003120>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	水内 恵理
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博ろ第 3120 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位授与の 日 付	2010 年 7 月 13 日

【 学位論文題目 】

Down-modulation of keratin 8 phosphorylation levels by PRL-3 contributes to colorectal carcinoma progression(PRL-3 による keratin 8 のリン酸化制御を介した細胞運動能の解析)

審 査 委 員

主 査	教 授	林 祥剛
	教 授	平井 みどり
	准教授	黒田 大介

(論文博士関係)

## 学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Down-modulation of keratin 8 phosphorylation levels by PRL-3  
contributes to colorectal carcinoma progression  
( PRL-3 による keratin 8 のリン酸化制御を介した細胞運動能の解析 )

指導教員：神戸大学大学院医学研究科医科学専攻 横崎 宏 教授

水内 恵理

【背景】チロシンフォスファターゼ Phosphatase of regenerating liver-3 (PRL-3)は、大腸癌の肝転移巣において高発現することが特徴で、これと反対に正常大腸上皮では殆ど発現がなく、進行原発巣では中等度の発現がみられる。PRL-3 は二重特異性フォスファターゼに特徴的な C(X)<sub>5</sub>R モチーフを有し、構造的に Rho ファミリーCdc42 や癌抑制遺伝子 PTEN と類似し、癌の浸潤・転移において重要な役割を担うことが明らかになっており、酵素活性中心 (C104) を変異させることにより細胞浸潤が抑制されたことから、PRL-3 により制御される癌細胞の転移・浸潤にはフォスファターゼ活性が必須であると考えられている。さらに、PRL-3 の酵素活性が epithelial-mesenchymal transition (EMT; 上皮間葉移行)において促進的に作用することも報告されている。しかしながら、現在のところ PRL-3 の標的タンパク質としては細胞間接着因子 integrin  $\alpha 1$  及び細胞骨格支持因子である ezrin が同定されているにとどまっており、PRL-3 の機能に関しては依然として不明な点が多い。今回、申請者は PRL-3 のエフェクタータンパク質を同定し、PRL-3 による細胞運動能上昇の機序を明らかにする目的で、プロテオーム解析を行った。

【結果】まず、大腸癌細胞株 SW480 にて、phosphatase 活性のない PRL-3 発現ベクター (pEGFP-C104S) 及び PRL-3 阻害剤を用い、PRL-3 フォスファターゼ活性が細胞の運動能亢進に作用することを *in vitro* で確認した。次に、PRL-3 標的タンパク質として脱リン酸化されるものを同定するため、SW480 細胞に野生型及び C104S 変異型 PRL-3 発現ベクターを導入し、それぞれの細胞溶解液を用いて二次元電気泳動を行った。二次元電気泳動後のゲルをリン酸化タンパク質に結合する蛍光色素(ProQ Diamond)による染色を施し、両者の泳動結果の比較解析を行ったところ、C104S 変異型 PRL-3 発現ベクターを導入した細胞で有意に高いリン酸化レベルを示すタンパク質として、細胞内中間径フィラメント keratin 8 (KRT8)を同定した。この結果は、PRL-3 阻害剤を添加した SW480 細胞において KRT8 のセリン残基 S73 及び S431 でのリン酸化レベルが、阻害剤の濃度依存的に上昇することからも確認され、野生型 PRL-3 ベクター導入細胞においても同様の結果が得られた。更に、pEGFP-PRL-3 あるいは pEGFP-C104S を高発現させた培養細胞を用い、抗 KRT8 抗体で免疫沈降を行った結果、KRT8 は wild-type の PRL-3 との結合を示したが、PRL-3-C104S がより強固な結合を示した。また、培養細胞を用いて蛍光免疫染色では、PRL-3 と KRT8 はラメリボディアなどの細胞辺縁に共局在したが、PRL-3 阻害剤によりこの局在は解消され KRT8 が構成するフィラメントが細胞質に広く分散することを示した。最後に、これまでの結果を大腸癌の原発巣及び肝転移巣の組織切片を用い免疫組織化学的に検証した。これまでの報告どおり、PRL-3 発現量は、原発巣、浸潤先端部、肝転移巣と癌の進行に連れて高発現したが、これと反対に KRT8 発現量は変化しないものの、リン酸化 KRT8 (S73 及び S431) の発現は低下していることが確認された。

【考察】これまでに PRL-3 標的タンパク質の同定のために酵母を用いた two-hybrid システムや免疫沈降タンパク質による一次元電気泳動が行われているが、今回申請者は、二次元電気泳動によるプロテオーム解析を行うことにより、PRL-3 により脱リン酸化される標的タンパク質として KRT8

を同定することに成功した。また、免疫沈降による確認実験で、野生型 PRL-3 と比較してフォスファターゼ活性ドメイン変異型 PRL-3 の方が KRT8 との結合が強固であったが、これは KRT8 が PRL-3 の基質であるという結果を強く裏付けるものである。PRL-3 阻害剤を用いた KRT8 リン酸化レベルの検討では、阻害剤の添加により KRT8 セリン残基 S73 及び S431 でのリン酸化レベルの上昇を認めた一方、チロシン残基のリン酸化レベルに変化はみられなかった。この結果は一見チロシンフォスファターゼとしての性質と矛盾するようであるが、近年 ezrin のチロシン残基が PRL-3 により脱リン酸化されることから、PRL-3 はチロシン残基及びセリン・スレオニン残基の両者を脱リン酸化することのできる二重特異性を有していると考えられる。Keratin は中間径フィラメントの構成成分として細胞骨格を形成しており、その細胞内での形態は kinase 及び phosphatase により制御されている。今回の結果より、PRL-3 は KRT8 のリン酸化レベルの制御を介して中間径フィラメントの可溶化及び重合の状態を変化させ、癌細胞の転移・浸潤の促進に関与している可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	乙 第2084号	氏 名	水内 恵理
論文題目 Title of Dissertation	Down-modulation of keratin 8 phosphorylation levels by PRL-3 contributes to colorectal carcinoma progression  PRL-3 による keratin 8 のリン酸化制御を介した細胞運動能の解析		
審査委員 Examiner	主 査 林 祥剛 Chief Examiner 副 査 平井 みとく Vice-examiner 副 査 黒田 大介 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

## 要旨

チロシンフォスファターゼ Phosphatase of regenerating liver-3 (PRL-3)は、大腸癌の肝転移巣において高発現することが特徴で、これと反対に正常大腸上皮では殆ど発現がなく、進行原発巣では中等度の発現がみられる。現在のところ PRL-3 の標的タンパク質としては細胞間接着因子 integrin・1 及び細胞骨格支持因子である ezrin が同定されているにとどまっており、PRL-3 の機能に関しては依然として不明な点が多い。今回、申請者は PRL-3 のエフェクタータンパク質を同定し、PRL-3 による細胞運動能上昇の機序を明らかにする目的で、プロテオーム解析を行った。まず、大腸癌細胞株 SW480 にて、phosphatase 活性のない PRL-3 発現ベクター (pEGFP-C104S) 及び PRL-3 阻害剤を用い、PRL-3 フォスファターゼ活性が細胞の運動能亢進に作用することを *in vitro* で確認した。次に、PRL-3 標的タンパク質として脱リン酸化されるものを同定するため、SW480 細胞に野生型及び C104S 変異型 PRL-3 発現ベクターを導入し、それぞれの細胞溶解液を用いて二次元電気泳動を行った。二次元電気泳動後のゲルをリン酸化タンパク質に結合する蛍光色素 (ProQ Diamond) による染色を施し、両者の泳動結果の比較解析を行ったところ、C104S 変異型 PRL-3 発現ベクターを導入した細胞で有意に高いリン酸化レベルを示すタンパク質として、細胞内中間径フィラメント keratin 8 (KRT8) を同定した。この結果は、PRL-3 阻害剤を添加した SW480 細胞において KRT8 のセリン残基 S73 及び S431 でのリン酸化レベルが、阻害剤の濃度依存的に上昇することからも確認され、野生型 PRL-3 ベクター導入細胞においても同様の結果が得られた。更に、pEGFP-PRL-3 あるいは pEGFP-C104S を高発現させた培養細胞を用い、抗 KRT8 抗体で免疫沈降を行った結果、KRT8 は wild-type の PRL-3 との結合を示したが、PRL-3-C104S がより強固な結合を示した。また、培養細胞を用いて蛍光免疫染色では、PRL-3 と KRT8 はラメリボディアなどの細胞辺縁に共局在したが、PRL-3 阻害剤によりこの局在は解消され KRT8 が構成するフィラメントが細胞質に広く分散することを示した。最後に、これまでの結果を大腸癌の原発巣及び肝転移巣の組織切片を用い免疫組織化学的に検証した。これまでの報告どおり、PRL-3 発現量は、原発巣、浸潤先端部、肝転移巣と癌の進行に連れて高発現したが、これと反対に KRT8 発現量は変化しないものの、リン酸化 KRT8 (S73 及び S431) の発現は低下していることが確認された。これまでに PRL-3 標的タンパク質の同定のために酵母を用いた two-hybrid システムや免疫沈降タンパク質による二次元電気泳動が行われているが、今回申請者は、二次元電気泳動によるプロテオーム解析を行うことにより、PRL-3 により脱リン酸化される標的タンパク質として KRT8 を同定することに成功した。また、免疫沈降による確認実験で、野生型 PRL-3 と比較してフォスファターゼ活性ドメイン変異型 PRL-3 の方が KRT8 との結合が強固であったが、これは KRT8 が PRL-3 の基質であるという結果を強く裏付けるものである。PRL-3 阻害剤を用いた KRT8 リン酸化レベルの検討では、阻害剤の添加により KRT8 セリン残基 S73 及び S431 でのリン酸化レベルの上昇を認めた一方、チロシン残基のリン酸化レベルに変化はみられなかった。この結果は一見チロシンフォスファターゼとしての性質と矛盾するようであるが、近年 ezrin のチロ

シン残基が PRL-3 により脱リン酸化されることから、PRL-3 はチロシン残基及びセリン・スレオニン残基の両者を脱リン酸化することのできる二重特異性を有していると考えられる。Keratin は中間径フィラメントの構成成分として細胞骨格を形成しており、その細胞内での形態は kinase 及び phosphatase により制御されている。今回の結果より、PRL-3 は KRT8 のリン酸化レベルの制御を介して中間径フィラメントの可溶化及び重合の状態を変化させ、癌細胞の転移・浸潤の促進に関与している可能性が示唆された。

本研究は、二次元電気泳動を用いたプロテオーム解析で、PRL-3 により脱リン酸化する標的タンパク質の同定を試み、従来明らかでなかった標的タンパク質として細胞内中間径フィラメント keratin 8 (KRT8) を同定し、かつ癌浸潤における PRL-3 の役割を明らかにしようとする研究であり、重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があると認める。