

癌浸潤突起における細胞膜の形態形成機構の研究

東京大学 分子細胞生物学研究所
末次 志郎

1. 背景と目的

がん細胞の転移を担う浸潤突起のひとつにポドソームがある。1つのポドソームは直径1 μm 小さいが、集まることでリング状の特徴的な形態を表す(図1)。ポドソームにメタロプロテアーゼMMP2およびMMP9の活性化因子であるMT1-MMPが局在することによって細胞外基質を分解し、N-WASPによるアクチン重合の駆動力を用いて細胞が浸潤する。ポドソーム形成については、古くからチロシンキナーゼであるSrcとアクチン細胞骨格の重要性が知られている。N-WASPおよび脂質膜と結合するタンパク質にBARドメインタンパク質がある。

BARドメインタンパク質は膜の形態を制御するタンパク質であるため、膜の突起構造であるポドソームでの役割を明らかにすることは重要である。BARドメインタンパク質のうちいくつかは、エンドサイトーシスにおいて生じる陥入構造や、カベオラなどの細胞の多様な膜構造形成に関与するが、近年ポドソーム形成への寄与が複数報告されている。ポドソーム形成における役割の未解明なBARドメインタンパク質のうち、比較的研究が進み、立体構造が明らかになっているIRSp53に着目した。IRSp53はBARドメインの3つのサブタイプのうちの一つ、I-BARドメインを持つ。I-BARドメインはバナナ型の立体構造をしており、カーブの外側に正電荷のアミノ酸残基を持つ。正電荷のアミノ酸残基と負電荷を持つ細胞膜が相互作用することで、細胞の突起構造を形成する。また、IRSp53はSH3ドメインを介してN-WASPと結合する。本研究ではポドソームにおけるIRSp53の役割を明らかにすることを目的とした。

2. 方法と結果

IRSp53ノックダウンによってポドソーム形成およびSrcの活性が低下する。

モデル細胞として恒常的活性化型Src (Src Y530F) を導入したNIH-3T3細胞を用いた。リポフェクション法によってIRSp53のsiRNAを導入した。IRSp53 siRNA導入細胞は、ポドソームを有する細胞の割合が低下すること、およびリン酸化チロシン(p-Tyr)量が低下することが細胞の免疫蛍光染色によって判明した。また、p-Tyr抗体のウェスタンブロットを行い、チロシンがリン酸化されたタンパク質量の低下を確認した。一般にリン酸化チロシンはシグナル伝達に用いられる。そこでがん細胞浸潤・増殖のシグナル伝達の上流に位置するSrcの活性を調べたところ、Src活性の指標となるp-Tyr416 Src量が低下

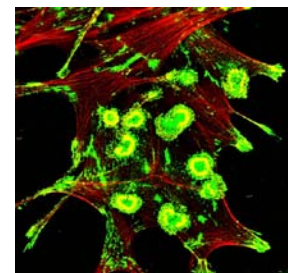


図1 NIH-Src 細胞
リング状のポドソーム

することが判明した。この低下は導入したSrc Y530Fではなく、内在性のSrcの活性低下に起因した。一方、活性化型・不活性化型Srcの全体量は変化しないことが全長Src抗体のブロットによって判明した。このことから、IRSp53はSrcの活性制御に関わっていることが示唆された。また、IRSp53のノックダウンはMatrigelアッセイにおける細胞の浸潤能を低下させた。

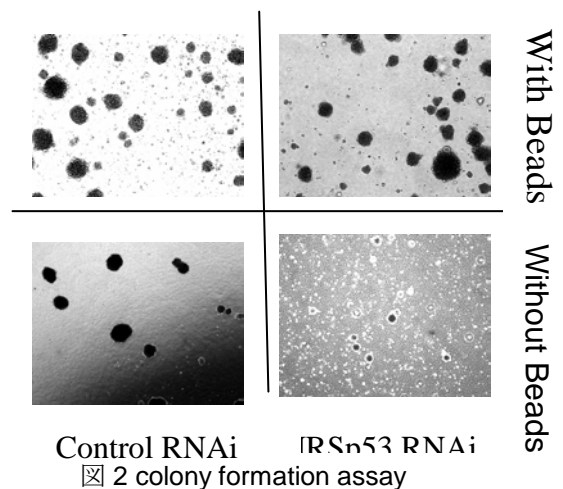
IRSp53ノックダウンによってがん細胞の増殖能力が低下する。I-BARDメイン部分が増殖に関わる。

colony formation assayによってNIH-Src細胞の足場非依存性増殖能力を測定した。足場非依存性増殖はがん細胞の特徴である。IRSp53のsiRNAを導入したものは、コントロールに比べ、コロニーの数が減少した。IRSp53のsiRNAと同時に、IRSp53のI-BARDメインを発現するベクターを導入すると、siRNAのみに比べ、コロニーの数が増加した。また、足場依存性増殖もこれらの処理で同様の傾向を示した。このことからIRSp53のI-BARDメイン部分ががん細胞の増殖に関わっていることが明らかとなった。ここまでの結果からIRSp53はSrcの活性を制御することで、がん細胞でのポドソームの形成と増殖の両方に関わることが示唆される。

IRSp53はSrcの集積または安定性に関わり、がん細胞の増殖能力を変化させる。

免疫共沈降法により、IRSp53は野生型SrcおよびSrc Y530Fと結合することが判明した。

次に細胞外表面抗原CD16および細胞膜貫通領域CD7を融合したSrc Y530Fタンパク質を発現するベクターをNIH-3T3細胞に導入し、恒常的に発現する細胞を作製した。この細胞はCD16抗体ビーズによってCD16抗原を人為的に集合させることができる。そのため間接的にCD16を融合したSrcを集合させることが可能である。IRSp53 siRNA導入後CD16ビーズによってSrcを集合させ、colony formation assayを行った。CD16抗体ビーズを加えたものは、IRSp53 siRNAを導入してもコロニー数が減少しなかった (図2)。この結果から、Srcが膜上の微小領域に集積することが細胞増殖に重要であると考えられ、その集積をIRSp53が担っていることが示唆される。



3. 考察

以上の結果から、IRSp53はSrcの集積・安定性に関わり、活性を制御することによってがん細胞のポドソーム形成と増殖の両者に関わることが示唆される(図3モデル図)。本研究は2つの新規性がある。1つは別々の機構が明らかになっていた、がん細胞の浸潤・増殖について、両者をクロスリンクさせるタンパク質があるということである。もう1つはシグナル伝達装置の局在である。現在までシグナル伝達について、どのシグナル因子が重要であるかについて焦点が当てられてきた。本研究ではシグナル伝達装置の細胞内局在が、その活性に重要である、という新しい知見である。

4. 発表論文

Safari F, Suetsugu S.

The BAR Domain Superfamily Proteins from Subcellular Structures to Human Diseases
Membranes. 2012 2(1):91-117. Epub 2012 Feb 27.

Suetsugu S, Gautreau A.

Synergistic BAR-NPF interactions in actin-driven membrane remodeling.
Trends Cell Biol. 2012 Mar;22(3):141-50.

Suetsugu S.

Activation of nucleation promoting factors for directional actin filament elongation:
allosteric regulation and multimerization on the membrane.
Semin Cell Dev Biol. 2013 in press

Oikawa T, Okamura H, Dietrich F, Senju Y, Takenawa T, Suetsugu S.

IRSp53 mediates podosome formation via VASP in NIH-Src cells
PloS ONE 2013 in press