

論文の内容の要旨

論文題目 浸潤突起形成の分子メカニズムに関する研究
氏 名 及川 司

がん細胞は、周囲の正常組織を破壊しながら増殖し続けて腫瘍を形成し、さらに悪性度を増して周囲の組織に浸潤し、他の遠隔臓器に転移する。このようながん細胞の特性は、正常細胞において、がん遺伝子あるいはがん抑制遺伝子に何らかの変異が生じると発現する。近年、多くの細胞増殖を制御する因子の発見とその作用機構の解明によって、正常の細胞増殖におけるがん遺伝子とがん抑制遺伝子産物の作用機構や、それらの変異によるがん細胞の異常増殖機構が次第に解明されてきたが、なおその全容は理解されていない。一方、がん細胞の浸潤、転移に関しては、正常細胞の接着や運動の機構が十分に解明されていないために、がん遺伝子とがん抑制遺伝子の変異からがん細胞の浸潤、転移能の獲得に至る機構については、ほとんどわかっていない。他方、細胞のがん化、腫瘍の形成と増殖、浸潤、転移のすべての過程で、がん細胞は周囲の正常組織の細胞や細胞外基質(ECM)と密接に相互作用するが、近年の血管新生、間葉細胞、ECMの研究の進展によって、この相互作用機構が徐々に明らかになってきている。本研究ではこうしたがん細胞-周辺組織相互作用の中でも、ECMの分解に必要とされるがん細胞の浸潤突起形成機構について、時間、空間的な分子制御機構を明らかにすることを目的とした。

浸潤突起(podosome / invadopodia)は上皮由来のがん細胞や形質転換細胞に見られ、アクチンフィラメント(F-actin)のコアを持ち、接着分子、アダプター分子、ECM分解酵素など多くの分子が集積する。アクチンフィラメントのコアは、様々なタイプの動的なアクチン重合に関わるWASPファミリータンパクのひとつである、N-WASPにより重合が促進されることが知られている。本研究では、浸潤突起のモデルとして恒常的活性化型Src(Src Y530F)で形質転換した繊維芽細胞(NIH-src)を用い、N-WASPによるアクチン重合に至る分子機構について解析した。またこれまでにあまり注目されていなかった細胞膜イノシトールリン脂質についても浸潤突起形成への関わりについて検討した。

1. 浸潤突起においてアクチン重合より前に起こる、タンパク複合体形成の解析

NIH-src は ECM との接着面に、太いアクチンフィラメントのコアからなるリング状の浸潤突起を形成するが、N-WASP のアクチン重合ができない変異体(N-WASP Δ VCA)を発現させると、浸潤突起形成を抑制した (Fig.1A,B)。しかしこの N-WASP Δ VCA 自身は、浸潤突起様部位に局在できた。この部位には、浸潤突起形成に必須であることが知られるアダプター分子、Tks5/FISH も集積していたが、太いアクチンフィラメントのリングは存在していなかった (Fig.1B)。このことから

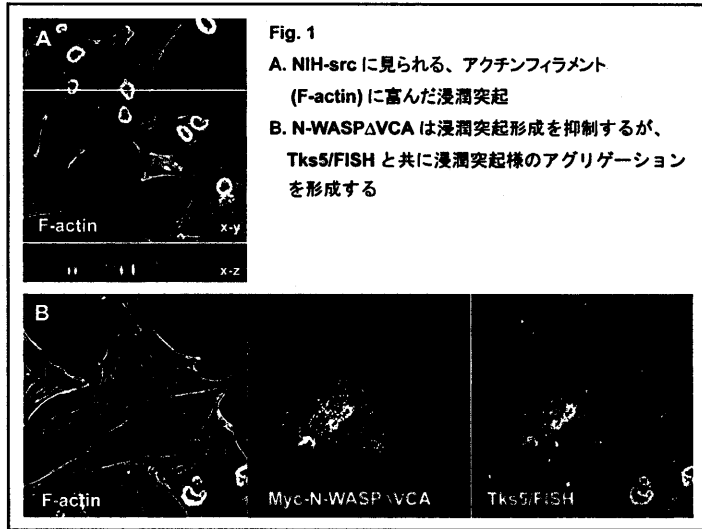


Fig. 1
A. NIH-src に見られる、アクチンフィラメント (F-actin) に富んだ浸潤突起
B. N-WASP Δ VCA は浸潤突起形成を抑制するが、Tks5/FISH と共に浸潤突起様のアグリゲーションを形成する

Tks5/FISH が N-WASP によるアクチン重合に先立って、浸潤突起の前駆体となるタンパク質複合体を形成させているのではないかと考え、Tks5/FISH の結合タンパクを探索した。Tks5/FISH の SH3 ドメインに結合するタンパク質を、質量分析装置を用いて解析した結果、N-WASP と Dynamin を同定した (Fig.2)。N-WASP は Tks5/FISH の全ての SH3 ドメインに結合することから、Tks5/FISH は浸潤突起において N-WASP の濃度を高め、アクチン重合を増強しているのではないかと考えた。SH3 ドメインの個数が違う Tks5/FISH 変異体を作成し (Fig.3A)、これと N-WASP との結合能を調べたところ、SH3 ドメインの長さ依存的に結合する N-WASP の量

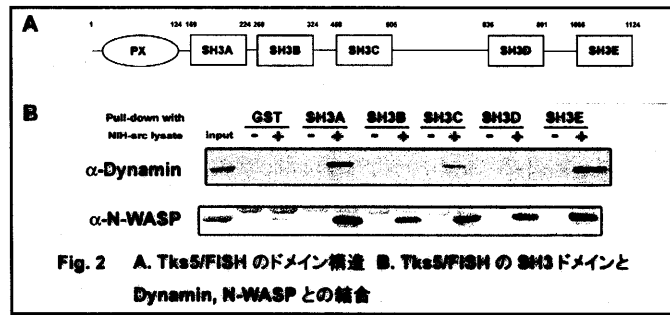


Fig. 2 A. Tks5/FISH のドメイン構造 B. Tks5/FISH の SH3 ドメインと Dynamin, N-WASP との結合

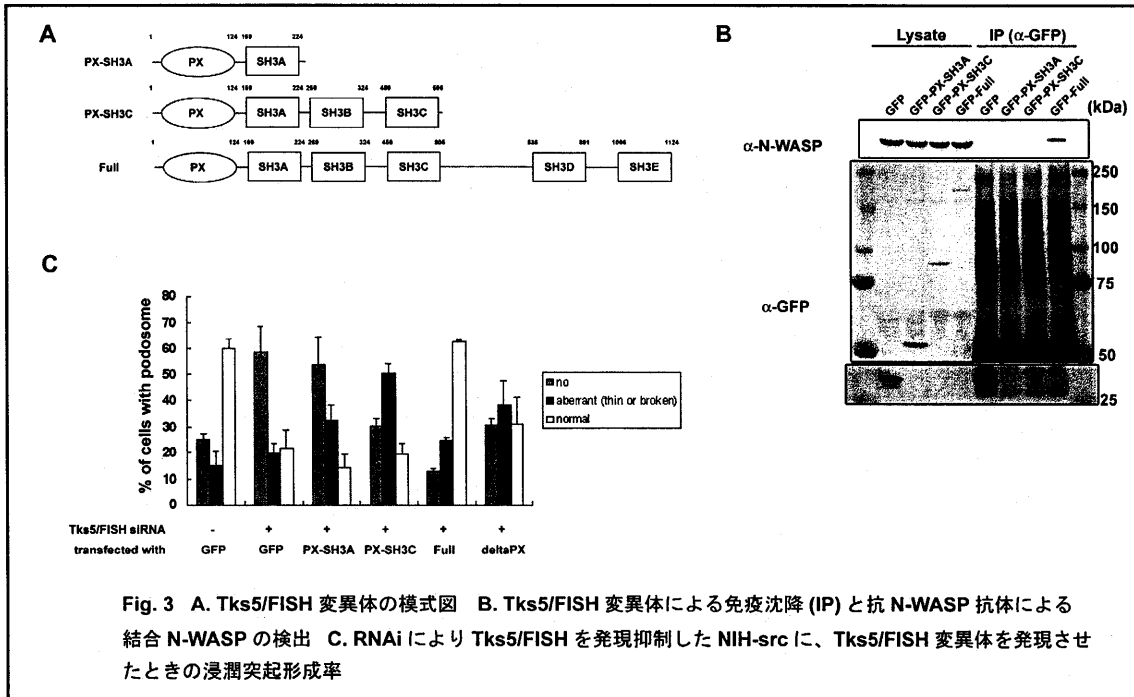


Fig. 3 A. Tks5/FISH 変異体の模式図 B. Tks5/FISH 変異体による免疫沈降 (IP) と抗 N-WASP 抗体による結合 N-WASP の検出 C. RNAi により Tks5/FISH を発現抑制した NIH-src に、Tks5/FISH 変異体を発現させたときの浸潤突起形成率

が増えた (Fig.3B)。またこれらの変異体を、RNAi により Tks5/FISH の発現を抑制した NIH-src に発現させたと、SH3 ドメインの長さ依存的に浸潤突起形成を回復した (Fig.3C)。ところが PX ドメインだけを欠いたもの(deltaPX)が十分に浸潤突起を回復させないことや、PX ドメインが PI(3,4,)P2 や PI(3,4,5)P3 を含むいくつかのイノシトールリン脂質と結合することから、Tks5/FISH はこの PX ドメインを介して FA 近傍の細胞膜へリクルートされている可能性が考えられた。RNAi による発現抑制実験の結果、Tks5/FISH と Dynamin は NIH-src において、N-WASP に依存せずフォーカルアドヒージョン(FA)に局在することがわかった。また、Dynamin の FA への局在は Tks5/FISH に依存していることもわかった。従って、Tks5/FISH が PX ドメインを介して細胞膜へ局在することが浸潤突起形成の重要なステップとなっていることが示唆された。

2. 浸潤突起においてアクチン重合より前に起こる、細胞膜イノシトールリン脂質の変化の解析

種々のイノシトールリン脂質に特異的に結合するタンパク質ドメインを細胞内に発現させると、それぞれのイノシトールリン脂質の細胞内での局在が観察できる。この方法を用いて、NIH-src におけるイノシトールリン脂質の局在を観察した。浸潤突起においては、PI(3,4)P2 に特異的に結合する Tapp1 の PH ドメインや、PI(3,4)P2 と PI(3,4,5)P3 に特異的に結合する Akt の PH ドメインが強く濃縮していた (Fig.4)。こうしたイノシトールリン脂質の浸潤突起への濃縮が浸潤突起形成以前に起こるのか、それとも浸潤突起形成の結果として起こるのかを調べる目的で、N-WASP

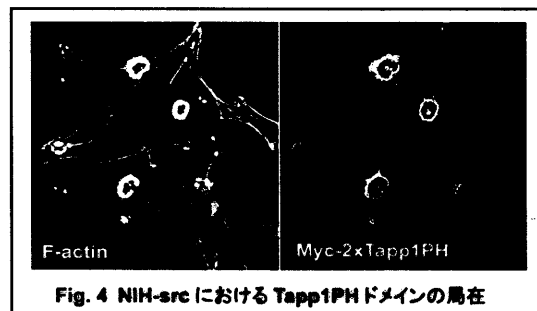


Fig. 4 NIH-src における Tapp1PH ドメインの局在

や Tks5/FISH の発現を抑制し、浸潤突起を形成できなくした NIH-src において、同様にイノシトールリン脂質の局在を観察した。その結果、N-WASP、Tks5/FISH いずれを発現抑制した NIH-src においても、Tapp1PH や AktPH の FA への濃縮が見られた (Fig.5)。PI3-kinase の阻害剤は NIH-src の浸潤突起形成とマトリゲルへの浸潤を抑えた。

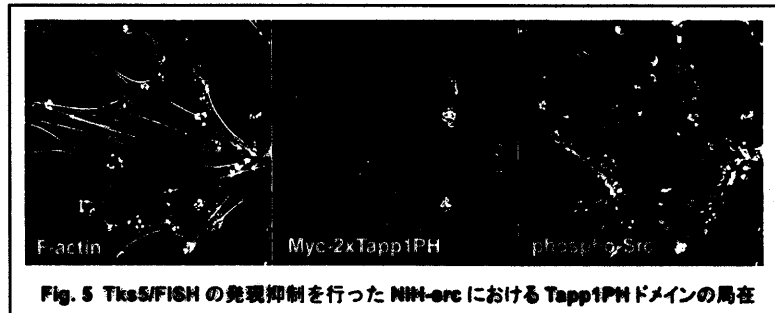


Fig. 5 Tks5/FISH の発現抑制を行った NIH-src における Tapp1PH ドメインの局在

や Tks5/FISH の発現を抑制し、浸潤突起を形成できなくした NIH-src において、同様にイノシトールリン脂質の局在を観察した。その結果、N-WASP、Tks5/FISH いずれを発現抑制した NIH-src においても、Tapp1PH や AktPH の FA への濃縮が見られた (Fig.5)。PI3-kinase の阻害剤は NIH-src の浸潤突起形成とマトリゲルへの浸潤を抑えた。

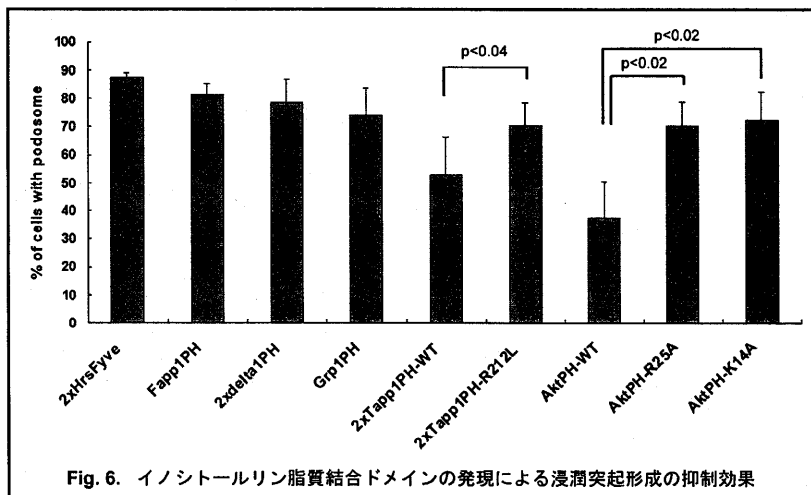


Fig. 6. イノシトールリン脂質結合ドメインの発現による浸潤突起形成の抑制効果

さらに、NIH-src における Tapp1PH や AktPH の過剰発現は浸潤突起形成を抑制した (Fig.6)。これらのことから、FA における PI(3,4)P2 や PI(3,4,5)P3 の濃縮が、Tks5/FISH を含むタンパク質

複合体の局在と活性化に必要であることが示唆された。

3. 細胞膜イノシトールリン脂質の変化とタンパク複合体形成、浸潤突起形成に至るシグナル伝達のモデル

浸潤突起において PI(3,4)P2 が強く濃縮しているのに対し、Tks5/FISH の PX ドメインの脂質結合特異性はそれほど高くない。さらに、イノシトールリン脂質結合ドメインの発現による浸潤突起形成の抑制も、劇的なものとはいえない。従って、Tks5/FISH を FA 近傍へと局在させるメカニズムとして、イノシトールリン脂質以外にタンパク質間の相互作用が重要な役割を果たしていると予想される。特に Dynamin は、アダプター分子である Grb2 との結合を介して FA へ局在できるため、PX ドメインを介して膜近傍に局在した Tks5/FISH を安定化していることも考えられる (Fig. 7)。

本研究において次のことを明らかにした。①NIH-src の浸潤突起において、アクチンフィラメントの重合が起こる以前に、浸潤突起の前段階であるタンパク質複合体(Tks5/FISH, Dynamin, N-WASP)が FA 近傍に形成される。②NIH-src では浸潤突起の形成以前に、FA 近傍の細胞膜において PI(3,4)P2 や PI(3,4,5)P3 が産生される。③Tks5/FISH は PX ドメインを介して PI(3,4)P2 や PI(3,4,5)P3 と結合し、このことが少なくとも Tks5/FISH の FA への局在化のメカニズムのひとつとなっていると考えられる。特に PI(3,4)P2 は細胞内における存在量が圧倒的に少なく、その役割が詳しくわかっていないが、浸潤突起のような特殊な構造物を作るシグナルとして使われている可能性がある。④Tks5/FISH による浸潤突起形成には、脂質結合とタンパク質複合体(Tks5/FISH, Dynamin, N-WASP など)の形成が必要である。つまり、PI(3,4)P2 の産生、あるいは PI(3,4)P2 と Tks5/FISH の PX ドメインとの間の相互作用を何らかの形で阻害できれば、浸潤突起形成を抑制できるかもしれない。しかし一方で、どのようにして Src の活性化が FA における PI(3,4)P2 の産生につながっているのかは今後の課題として残されている。

