

論文の内容の要旨

論文題目 新規細胞接着斑制御分子 ZFYVE21 に関する研究

指導教官 清木元治教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月 入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

長野 真

【背景】

接着細胞は、細胞外基質と接着することによって形態の安定性や運動時の足場を獲得している。これにとどまらず細胞-細胞外基質間接着は、細胞外環境情報を細胞内に、あるいは細胞内環境情報を細胞外へと伝達することで、細胞の分化や分化形質の発現を制御する役割も担う。このような細胞-基質間接着は、主に細胞外基質と、細胞膜に局在する特異的受容体の結合により形成され、代表的な受容体としてインテグリンが知られている。インテグリンは、細胞外領域で細胞外基質と結合する一方で、細胞内領域では、アクチン結合分子と複合体を形成し、細胞外基質とアクチン細胞骨格を連結させる。インテグリンを介した細胞外基質とアクチン骨格系の連結構造は細胞に張力を発生させ、細胞形態を維持する強固な接着構造であり、特に2次元の細胞培養条件下では細胞接着斑(接着斑)として観察される。接着斑形成によって細胞に発生する張力は、特に細胞が移動する際の動力源となることから、接着斑は個体発生時の組織構築や感染部位へのマクロファージの動員、がん細胞の浸潤・転移など、細胞運動が関与する多くの生命現象において重要であると考えられ

ている。細胞体の移動は、極性形成によって運動の方向が定められ、接着斑の形成と分解が細胞運動の方向に沿ってタイミングよく制御されることで遂行される。接着斑はインテグリンの集積により形成され、Rho 活性化によって形成されたストレスファイバーがインテグリン細胞内領域に結合しているアクチン結合分子群と連結され、強固な接着構造として安定化される。一方、接着斑分解ではアクチン骨格再編だけではなく、エンドサイトーシスを制御するダイナミン依存的な細胞表層からのインテグリンの取り込みも起こる。このような接着斑ターンオーバーは時空間的に複雑な分子間相互作用により制御され、多くの分子が段階的に関与する現象であるため、統合的理解を得るためにはさらなる研究の進展が必要とされる。本研究では、機能未知タンパク質 ZFYVE21 (以下 ZF21 と省略) による細胞-基質間接着制御の解析を行い、その結果、ZF21 が細胞接着斑の分解を促進する新たな因子であることを明らかにしたので報告する。

【結果】

ZF21 は脊椎動物で保存されており、構造上の特徴として FYVE ドメインを持つことがデータベースに登録されている。ZF21 の機能に関する研究はこれまで報告されていない。

本研究ではヒト乳癌由来 MDA-MB231、ヒト線維芽肉腫由来 HT1080、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞において、ZF21 安定ノックダウン (shZF21) 細胞および対照 (shLacZ) 細胞を作製し、細胞接着能を検証した結果、ZF21 の安定ノックダウンにより、MDA-MB231 で約 2.5 倍、HT1080 で 1.6 倍、HeLa で 1.4 倍増強することを見出した。

さらに詳細に検証するため、MDA-MB231 の shLacZ 細胞および shZF21 細胞に加え、shZF21 細胞に ZF21-myc を発現させたリバータント (Rev) 細胞の細胞外基質に対する接着能を調べた。細胞外基質は、コラーゲン I、フィブロネクチンおよびビトロネクチンを用い、ノックダウン細胞ではいずれの細胞外基質に対しても約 2 倍接着能が亢進することが明らかとなった。一方 Rev 細胞は shLacZ 細胞とほぼ同程度の接着能を示したことから、ZF21 安定ノックダウンで認められた接着能の増強は ZF21 発現抑制の結果であると考えられ、ZF21 は

MDA-MB231 細胞のインテグリンを介する細胞外基質に対する接着制御に関与していることが示唆された。

インテグリンファミリーの中で、インテグリン- $\beta 1$ はコラーゲン I、フィブロネクチンおよびビトロネクチンのいずれの細胞外基質に対しても受容体として結合することから、ZF21 とインテグリン- $\beta 1$ の基質接着の関係について解析した。インテグリン- $\beta 1$ の接着活性を阻害する中和抗体の存在下において、shLacZ、shZF21 および Rev 細胞のコラーゲン I に対する接着能を比較した結果、インテグリン- $\beta 1$ 中和抗体存在下では shZF21 細胞のコラーゲン I に対する接着能の亢進はキャンセルされ、shLacZ および Rev 細胞と同程度の接着能となった。このことから、ZF21 はインテグリン- $\beta 1$ を介した細胞接着の制御に関与していることが明らかとなった。

ZF21 ノックダウンがインテグリン- $\beta 1$ の発現量および細胞表層量に与える影響をタンパク質レベルで調べた結果、インテグリン- $\beta 1$ の発現量は、shLacZ、shZF21 および Rev 細胞間で違いが認められなかった。しかしながら、ビオチンで標識し、プルダウンにて回収した細胞表層のインテグリン $\beta 1$ 量が、shZF21 細胞では shLacZ 細胞に比べて約 2.5 倍に増加しており、Rev 細胞では shLacZ 細胞とほぼ同程度であった。他の膜タンパク質であるトランスフェリン受容体や MT1-MMP はインテグリン- $\beta 1$ のような顕著な増加は認められなかったことから、ZF21 が細胞表層のインテグリン- $\beta 1$ 量に特異的な影響を与えていることが示唆された。

現在までに提唱されている細胞表層のインテグリン- $\beta 1$ 量の特異的な調節メカニズムは、細胞膜近傍での small GTPase Arf6 の活性化によるエンドサイトーシスと接着斑の分解に伴うエンドサイトーシスである。そこで、ZF21 がこれら細胞表層のインテグリン- $\beta 1$ 量の調節機構に及ぼす影響について解析を行った結果、ZF21 は Arf6 の活性化には影響しない一方で、接着斑の形成と分解の繰り返し(ターンオーバー)に関与することが示唆された。

そこで shLacZ、shZF21 および Rev 細胞の接着斑分解能の比較を行った。Ezrattyらの方法に従って微小管重合阻害剤ノコダゾールで細胞を処理して接着斑の分解を抑制し、ノコダゾールを除去して一定時間後の接着斑数、面積を比較した。接着斑は、同部位に局在す

る FAK-397 番目チロシンのリン酸化体 (pY-397-FAK) の免疫染色で検出した。その結果、ZF21 ノックダウン細胞では ZF21 発現細胞と比較して、接着斑数は約 2 倍、接着斑面積比では約 4 倍の接着斑分解の遅延が観察された。加えて、接着斑の分解に伴って脱リン酸化が誘導される pY397-FAK 量の比較を行った結果、ZF21 ノックダウン細胞では ZF21 発現細胞と比較して、ノックアウトを除去して一定時間後の pY397-FAK の脱リン酸化が抑制されていた。以上から、ZF21 が接着斑ターンオーバーにおいて重要な役割を担うことが示唆された。

ZF21 が細胞-細胞外基質間の接着に重要な接着斑の分解制御に関与することが明らかとなった。続いて、ZF21-m1Venus および接着斑マーカーとして mCherry-Zyxin を安定発現した MDA-MB231 および HeLa 細胞を作製し、細胞膜近傍の分子を選択的に検出可能な全反射鏡顕微鏡 (Total Internal Reflection Fluorescent Microscopy, TIRFM) を用いて、ZF21 の接着斑への局在について検証した結果、ZF21 は接着斑近傍に集積することが明らかとなった。

接着斑ターンオーバーの低下は細胞運動能の低下の原因となるため、shLacZ、shZF21 および Rev 細胞における細胞運動能を比較した。その結果、shZF21 細胞では shLacZ 細胞と比較して運動能が約 60% 低下し、ZF21 を発現させた Rev 細胞では shLacZ 細胞と同程度まで運動能が回復した。以上より、接着斑分解を亢進する ZF21 は、細胞運動の亢進にも関与することが明らかとなった。

【結論】

本研究によって、機能未知タンパク質 ZF21 が細胞-基質間の接着制御、細胞運動の制御に関与する分子であることが明らかとなり、その制御メカニズムは、細胞接着斑のターンオーバーの亢進によることが示唆された。