

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580096

研究課題名 (和文) 細胞膜-アクチンの統合的制御に関わる分子機構

研究課題名 (英文) The molecular mechanism underlying the co-regulation of plasma membrane and F-actin

研究代表者

伊原 さよ子 (IHARA SAYOKO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：80292788

研究成果の概要 (和文)：

細胞は生命活動における様々な局面でその形態を変化させる。この変化は細胞膜と骨格の統合的制御によってもたらされるが、その分子機構は必ずしも明らかではない。本研究では細胞膜、アクチンの両者に刺激依存的に結合する分子 SWAP-70 の機能解析を通じてその制御機構を明らかにすることを目的とした。SWAP-70 の結合候補分子を見出し、その解析を行った結果、SWAP-70 が細胞膜とアクチンの仲介分子としてはたらくインテグリン  $\beta 1$  と結合し、その活性を調節している可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Cells change their morphology under various physiological conditions. Co-regulation of plasma membrane and cytoskeleton is required for these changes, the mechanism of which is not fully understood. We addressed the issue by functional analysis of SWAP-70, which binds to both membrane and actin in a stimulus-dependent way. We found that SWAP-70 binds to integrin  $\beta 1$  in a pull down assay, and the activation of integrin  $\beta 1$  rescued SWAP-70-deficient phenotype, suggesting that SWAP-70 may function by activating integrin  $\beta 1$  through their interaction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：細胞応答

## 1. 研究開始当初の背景

細胞の運動、形態変化は生体の生命活動の様々な局面においてみられる現象であり、主に細胞膜、および、その内側から細胞膜を支えているアクチン細胞骨格の変化によってもたらされる。これらの現象は、多くの場合、外部刺激に伴う細胞応答として観察され、細

胞膜とアクチンが刺激に応じて連動した動きをすることで、適切な変化を引き起こしていると考えられる。近年、刺激に応じたアクチン細胞骨格制御については精力的な研究により、多くの知見が得られてきているが、細胞膜の動きとの協調性に関わる制御機構に関しては未だ多くの部分が不明である。こ

これらの制御機構を明らかにすることは、学問的に意義があるのみならず、癌に代表される細胞の形態、運動性の異常を伴うさまざまな疾患の基本的理解に対して有用な知見をもたらすことが期待される。

SWAP-70 は元来 B 細胞のクラススイッチレコンビナーゼ複合体の構成分子として同定されたタンパク質でありその生理的意義は不明であったが、後に研究代表者の所属する研究室で、刺激に伴い産生されるリン脂質 PIP<sub>3</sub> の結合分子として同定された。これまでの研究により SWAP-70 は、刺激依存的に細胞膜に移行しアクチンと共局在すること、細胞が増殖因子等の刺激を受けた際に形成されるアクチンに富む膜構造、“ラップリング”の形成に必要とされることが明らかとなっている。ラップリングは、本来基質に接着している細胞膜辺縁部がめくれあがってできる構造で、波打つような動きを伴い、生理学的にはエンドサイトーシスの一種であるマクロピノサイトーシス（飲作用）に関わりが深いと考えられているが、特に株化された細胞においては刺激に応じてその形成が誘導されるため、刺激に応じた細胞膜とアクチンの統合的制御機構を明らかにするうえでの良いモデルになるとも考えられる。前述したように SWAP-70 はこのラップリング形成に必要であり、また、刺激依存的に膜とアクチンに結合する能力をもつことから、刺激時においてアクチンと細胞膜の両者をなかだちする性質を持つことでラップリング形成に重要な鍵分子としてはたらいっているものと考えられる。

そこで、研究代表者はこれまで、SWAP-70 を切り口としてラップリング形成機構を明らかにすることで、細胞膜とアクチンの制御機構の解明を試みようとしてきた。ラップリングとの関連に焦点をあて、SWAP-70 の機能について解析をすすめてきた結果、SWAP-70 は C 末端にアクチン結合部位をもち、その部位におけるアクチン結合能を通じてラップリング形成に関与していることが明らかとなった。また、そのアクチン結合特性を調べたところ、筋型アクチン（ $\alpha$ アクチン）には結合能を示さない一方、非筋型アクチン（ $\beta$ 、 $\gamma$ アクチン）に対して結合能を示すことが明らかとなった（Ihara, S. et al, *J Cell Sci.* 119, 500, 2006）。また、非筋型アクチンのうち、特に  $\beta$ アクチンに親和性を持つ可能性が示唆されている。この性質は両者に対して結合性を示す他の多くのアクチン結合タンパク質と性質を異にする。

$\beta$ アクチンは細胞膜直下に豊富に存在し、細胞形態変化の際にみられるダイナミックなアクチン再構成に重要な役割を果たすと考えられている。そこで、 $\beta$ アクチンに特異的結合特性を示す SWAP-70 は、厳密な制御

のもと、ダイナミックな形態変化がおきる特別な局面にはたらくタンパク質である可能性が考えられ、この分子の細胞形態変化における機能解析をおこなうことで、細胞膜—細胞骨格制御の新たな知見を得られる事が期待される。

## 2. 研究の目的

このような背景のもと、本研究では、細胞膜、アクチンを統合的に制御する分子、SWAP-70 の機能解析を行い、細胞膜—細胞骨格の制御機構に関する新たな知見を得る事を目的とする。具体的には SWAP-70 の新たな結合分子を同定し、その結合による機能への影響をみる、SWAP-70 のアクチン結合が細胞へ及ぼす影響を解析する、ことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 結合タンパク質の取得および解析

SWAP-70 の刺激依存的細胞膜/アクチン結合に関連すると予想された分子について、SWAP-70 との結合の可能性の有無を、抗体による共免疫沈降法、または試験管内プルダウンアッセイによる共沈降法により検討した。この結果、結合の可能性が示唆された分子について、刺激時、非刺激時の COS7 細胞内における SWAP-70 との共局在の有無を、間接蛍光抗体法による免疫染色によって検討した。

### (2) 結合領域の決定

SWAP-70 との試験管内における結合が示されたインテグリン  $\beta$  1 について、各種欠変異体を GST 融合タンパク質として精製し、グルタチオンビーズに結合させた。このビーズを用いて SWAP-70 を Flag タグ融合型として発現させた細胞抽出液に対して試験管内プルダウンアッセイを行い、ウェスタンブロットティングにより結合の有無を調べた。

### (3) 発現抑制細胞株の作製

SWAP-70 および候補結合分子を標的とする shRNA を発現するレトロウイルスベクターを構築し、Plat GP 細胞を用いてウイルスを産生させた。得られた RNAi ウイルスを COS7 細胞に感染させ、薬剤選択により安定抑制細胞株を取得した。

### (4) 細胞接着面積の測定

COS7 細胞播種後、2.5 時間後にパラホルムアルデヒドで固定し、アクチン染色を行った。蛍光顕微鏡下で得られた画像をもとに細胞接着面積を Image J により測定した。

### (5) SWAP-70 発現抑制細胞におけるインテグリン $\beta$ 1 活性化の影響の検討

コントロール細胞および SWAP-70 発現抑制細胞の細胞懸濁液に、インテグリン  $\beta$  1 に対する活性化抗体を加え、37°C、15 分間インキュベートした。培地を加えて細胞播種し、2.5 時間後の接着面積の測定を行った。

#### (6) アクチン結合活性測定

単量体アクチンを重合化反応により重合させたのち、大腸菌で調製した組み換え体精製タンパク質 SWAP-70 を加えた。室温で 30 分間静置した後、超遠心により、重合アクチンとその共沈物を含む沈殿画分、それ以外を含む上清画分に分離し、それぞれの画分を SDS-PAGE に供し、CBB 染色を行った。沈殿画分に移行した SWAP-70 の割合をバンドの濃さから算出し、結合活性の指標とした。

#### 4. 研究成果

本研究ではまず SWAP-70 の結合分子の同定を試みた。SWAP-70 とアクチン、細胞膜との結合が刺激依存的であり、それらの結合がダイナミックな細胞形態変化に必要であることから、この機能に必要である可能性が高いと考えられた分子群、ミオシンファミリータンパク質、インテグリンファミリータンパク質に注目し、SWAP-70 との結合の可能性について検討した。試験管内プルダウンアッセイを行った結果、SWAP-70 はミオシンファミリーについてはミオシン 1C と、インテグリンファミリーについてはインテグリン  $\beta$  1 と結合する可能性が示された。SWAP-70 との共局在の有無を免疫染色により検討した結果、ミオシン 1C、インテグリン  $\beta$  1 とともに刺激時に COS7 細胞において形成されるラップリング膜で SWAP-70 との共局在が検出された。従って両者は刺激により活性化された SWAP-70 と結合する可能性が示唆される。

ミオシン 1C について COS7 細胞の発現抑制細胞株を作製し、その表現形を観察したところ、SWAP-70 発現抑制細胞と同様、刺激時のラップリング形成が抑制された。そこで SWAP-70 の下流でミオシン 1C がはたらく可能性について、SWAP-70 発現抑制細胞によるラップリング形成抑制がミオシン 1C により回復されるかどうかという観点から検討を行ったが、回復はみられなかった。ミオシン 1C との相互作用の意義については今後さらに検討する必要があると考えられる。

一方、インテグリン  $\beta$  1 について SWAP-70 との結合領域の決定を行ったところ細胞内膜近位領域 9 アミノ酸で十分であることが明らかとなった。この領域は  $\beta$  1 サブユニットが  $\alpha$  サブユニットと塩橋構造を形成する部位に相当し、構造上、インテグリン活性に重要であるとされているため、SWAP-70 との相互作用がインテグリン活性

に影響を及ぼす可能性が高いと考えられた。そこで、SWAP-70 発現抑制細胞株の表現型をインテグリンの活性化によって回復できるかどうかについて検討をおこなった。細胞接着能に異常を示す SWAP-70 発現抑制細胞株にインテグリン  $\beta$  1 に対する活性化抗体を作用させたところ、細胞接着能の回復がみられたことから、SWAP-70 はインテグリン  $\beta$  1 との結合を通じてインテグリン  $\beta$  1 の活性化をもたらすことで細胞-基質間接着能に影響を与える可能性が示唆された。今後 SWAP-70 のインテグリン  $\beta$  1 活性制御における役割をさらに検討することで膜骨格制御を通じた細胞接着の新たな分子機構が明らかになることが期待される。

また、SWAP-70 のアクチン結合活性が細胞に与える影響について解析をおこなった。野生型 SWAP-70 は刺激時のみアクチン結合能を示すが、様々な点変異体 SWAP-70 のアクチン結合活性を解析する過程で、刺激非依存的に恒常的にアクチン結合活性を示す変異体を取得した。この変異体をマウス繊維芽細胞に発現させると、野生型細胞と異なり、形質転換細胞様形態、増殖速度増加、接触抑制といった癌化細胞にみられる様々な表現型を示した。このことから SWAP-70 はそのアクチン結合能を通じて細胞癌化に役割を果たしていると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① M. Ishihara, Y. Suda, I. Inoue, T. Tanaka, T. Takahashi, X.D. Gao, Y. Fukui, S. Ihara, A.M. Neiman, H. Tachikawa. Protein phosphatase type 1-interacting protein Ysw1 is involved in proper septin organization and sporopore membrane formation during sporulation. *Eukaryot Cell* 8 (2009) 1027-1037.
- ② Y. Fukui, S. Ihara. A mutant of SWAP-70. A phosphatidylinositoltrisphosphate binding protein, transforms mouse embryo fibroblasts, which is inhibited by sanguinarine. *PLoS One* 5 (2010) e14180.

[学会発表] (計 2 件)

- ① Yuko Kase, Tsutomu Oka, Yasuhisa Fukui, Sayoko Ihara  
Rap1 activation is required for DEF6-mediated cell shape change.  
日本細胞生物学会大会、2008 年 6 月 30 日、  
パシフィコ横浜

②加勢優子、高原有未、岡努、福井泰久、  
伊原さよ子

Rac1 結合タンパク質 DEF6 の機能解析  
日本分子生物学会、日本生化学会合同大会、  
2008年12月9日、神戸ポートアイランド

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊原さよ子 (IHARA SAYOKO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：80292788