

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23580130

研究課題名(和文) 新たな重合分子を介した細胞形態制御機構

研究課題名(英文) The mechanism underlying the cell shape change mediated by an oligomerizing molecule

研究代表者

伊原 さよ子 (Ihara, Sayoko)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：80292788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞は外部刺激に応じて適切に形態を変化させる。SWAP-70はこの過程において細胞膜とアクチン骨格をなかだちし、形態を制御することが明らかになってきたが、アクチン骨格非依存的な制御については不明であった。本研究では、SWAP-70がアクチン重合に先立って刺激依存的に重合すること、この重合には活性化型Racとの結合が重要であることを示し、刺激依存的なSWAP-70の重合が細胞形態変化に寄与している可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Cells change their morphology in response to the outer stimuli. SWAP-70 has been known to play an important role in the regulation of cell shape change through the binding to both of the cell membrane and actin cytoskeleton. In this study, we show that SWAP-70 oligomerizes prior to actin polymerization in response to growth factor stimulation. The binding to activated Rac was shown to be required for the oligomerization of SWAP-70 and growth factor-induced cell shape change, suggesting the contribution of oligomerization of SWAP-70 to the stimulus-dependent cell shape change.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞膜

## 1. 研究開始当初の背景

細胞は外部からの刺激に応じて適切に形態を変化させることで、生体内において、細胞分化、組織形成、創傷治癒といった様々な応答に重要な役割を果たす。刺激による細胞形態制御の分子機構の解明にむけては精力的な研究が行われているものの、限られた分子が対象とされており、全貌の解明には至っていない。

SWAP-70 は B 細胞クラススイッチレコンピナーゼ複合体の構成因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、増殖因子等の刺激に伴い細胞内で産生されるセカンドメッセンジャー、ホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸の結合分子として同定された。その後の解析により、SWAP-70 は刺激に伴い細胞膜に移行するとともに、刺激依存的に形成される“ラッフリング”とよばれるアクチンに裏打ちされる膜の動的構造の形成に参与すること、その C 末端を通じて細胞骨格、アクチンと結合することが明らかとなった。一方、個体レベルでは、SWAP-70 欠損マウスにおける肥満細胞の接着性の異常、リンパ球の遊走性の異常が報告されている。また、悪性化型腫瘍において SWAP-70 が高発現しているとの報告や、癌遺伝子 v-src による細胞癌化に SWAP-70 が必要であること、活性化型 SWAP-70 が細胞癌化を引き起こすとの報告もあり、細胞癌化への関与も注目されていた。

このように、SWAP-70 は細胞形態変化を通じて生体に重要な様々な応答に関与すると考えられるが、その分子機構の詳細については明らかになっていなかった。特にこれまでは、アクチンへの作用の側面が注目されてきたが、この機能のみで SWAP-70 の多彩な役割について説明するには十分ではなかった。

このような状況下、研究代表者は SWAP-70 が細胞刺激時に重合する可能性を見出したため、新たな SWAP-70 の分子機能に迫るべく、研究を開始した。

## 2. 研究の目的

本研究では、SWAP-70 がそれ自体、重合体を形成し、細胞形態変化に寄与する可能性に着目し、刺激依存的 SWAP-70 の重合の性質を明らかにし、細胞形態変化における意義を探ることを目的とする。

具体的には重合アッセイ系を確立し、重合の制御機構を明らかにする。さらに重合能欠失変異体の作製を行い、変異体を発現させた細胞の形態変化に与える影響を観察する。またアクチン制御との関連性について明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 重合体 SWAP-70 の検出

増殖因子により刺激した培養細胞に膜透過型架橋剤 DSP を添加し、インキュベート後、

界面活性剤入りバッファーにより可溶化のちホモゲナイズし、細胞抽出液を得た。サンプルを SDS-PAGE に供し、抗 SWAP-70 モノクローナル抗体によるウェスタンブロットングを行った。重合体は、多量体の位置のバンドの検出の有無により確認した。

細胞レベルにおいては、増殖因子で刺激した細胞を PFA で固定後、上記抗 SWAP-70 モノクローナル抗体による蛍光免疫染色を行い、その繊維状の構造を確認した。

### (2) in vitro 重合活性の検出

ヒスチジンタグ融合型 SWAP-70 を大腸菌にて組み換え体タンパク質として作製し、ニッケルカラムにて精製を行った。精製タンパク質を低塩濃度バッファーに透析した。得られたサンプルについて、抗ヒスチジンタグ抗体を用いた蛍光染色を行い、蛍光顕微鏡下で観察した。

### (3) SWAP-70 安定発現細胞株の作製

GFP-SWAP-70 遺伝子および、その変異体を発現するレトロウィルスベクターを構築し、Plat E 細胞を用いてウィルスを産生させた。得られたウィルスを SWAP-70 欠損マウス胎児繊維芽細胞に感染させ、puromycin による薬剤選択により安定発現細胞株を取得した。

### (4) SWAP-70 の刺激依存的動態の観察

GFP-SWAP-70 安定発現細胞株をガラスベースディッシュに播種し、血小板由来成長因子刺激後の細胞の形態変化および、GFP-SWAP-70 の動態を、蛍光顕微鏡下でタイムラプス観察を行った。

### (5) 重合および細胞形態変化に必要なシグナルの解析

マウス胎児繊維芽細胞に各種シグナル分子の阻害剤を作用させた後、血小板由来成長因子で刺激し、その後の SWAP-70 の繊維状の構造の有無を抗 SWAP-70 抗体による免疫染色で調べるとともに、アクチン構造についても TRITC-ファロイジン染色により、調べた。

また、GFP-SWAP-70 安定発現細胞株をコントロールとし、シグナル分子と結合不能の変異体 SWAP-70 の GFP 融合型安定発現細胞株の重合形成能、および、形態変化の有無を観察した。

## 4. 研究成果

### (1) SWAP-70 の刺激依存的重合活性

SWAP-70 タンパク質の特定の領域 (378-452aa) を認識するモノクローナル抗体を用いた蛍光抗体染色により、増殖因子刺激時の SWAP-70 の局在を調べたところ、上皮増殖因子刺激 COS7 細胞、血小板由来成長因子刺激マウス胎児繊維芽細胞のいずれにおいても非刺激時には観察されない、繊維状の局在が細胞膜部分に観察された。この局在はこれまで他の抗体による染色や蛍光タンパ

ク融合型 SWAP-70 を過剰発現させた際に観察されていた報告事例とは異なるパターンであった。このモノクローナル抗体による免疫染色において、非刺激時の細胞は全くシグナルを示さなかったことから、この抗体は SWAP-70 タンパクのうち、特に活性化状態をとるもののみ認識している可能性が高い。通常の抗体による染色では刺激時にも大量に存在する不活性型構造の SWAP-70 によるバックグラウンドシグナルに埋もれてしまって観察できなかったパターンが、この抗体を用いることで初めて観察されたと考えられる。

繊維状の構造が観察されたため、この構造が SWAP-70 の重合によって形成されている可能性について調べるため、刺激した細胞に架橋剤を作用させ、上記抗 SWAP-70 モノクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、重合体の検出の有無を調べた。その結果、上皮増殖因子刺激 COS7 細胞、血小板由来成長因子刺激マウス胎児繊維芽細胞のいずれにおいても増殖因子刺激時のみ、重合体を示すバンドが検出されたことから、刺激依存的重合が起きていることが明らかとなった。

一方、大腸菌により組み換え型精製タンパク質 SWAP-70 を調製し、低塩濃度条件にすると、蛍光免疫染色により重合体と思われる構造が蛍光顕微鏡下で観察された。

## (2)SWAP-70 のアクチン非依存的挙動

SWAP-70 の刺激依存的挙動をリアルタイムでモニターするため、SWAP-70 欠損マウス胎児繊維芽細胞に GFP-SWAP-70 を安定的に発現する細胞株を作製した。血小板由来増殖因子刺激後のタイムラプス観察により、SWAP-70 は刺激数分後に観察されるラップリング形成に先立って細胞膜に移行し、繊維状の構造を形成することが明らかとなった。また、その後、この繊維状構造物を囲む形でラップリング形成が観察された。このことから SWAP-70 はアクチン再構成に先立ち、繊維状の構造を形成する可能性が考えられたため、SWAP-70 の刺激依存的挙動のアクチン重合依存性を調べた。アクチン重合阻害剤、cytochalasin B 存在下で同様の実験を行った結果、挙動に影響はなかったため、SWAP-70 はアクチン再構成非依存的に刺激依存的膜移行および繊維形成を起こすと考えられた。

これまで、ラップリングと同じ局在を示す分子に関しては複数の報告例があるが、ラップリング形成に先立ち、その後ラップリングが形成される場所に局在を示す分子の報告例はない。SWAP-70 がラップリング形成に必要であるとの過去の知見もふまえると、SWAP-70 は刺激を受けて活性化構造をとることにより重合体を形成し、これを足場にラップリング形成がなされる、という新規モデルを提唱することができる。

## (3)SWAP-70 重合体形成の制御機構

刺激依存的 SWAP-70 の重合がどのような制御によっておきているかを調べるため、阻害剤を用いた実験をおこなった。細胞に PI3 キナーゼ、src キナーゼ阻害剤を作用させたのち、増殖因子で刺激し、重合体の形成を観察したところ、いずれの場合も構造形成はみられなかった。そこで、重合体形成はこれらのキナーゼの下流でおきている可能性が示唆された。

さらに詳しく解析するため、SWAP-70 に点変異を導入し、様々なシグナル分子との結合能を損なわせた変異体を GFP 融合型として作製したのち、SWAP-70 欠損マウス繊維芽細胞に導入し、安定発現細胞株を取得した。これらの細胞株における増殖因子刺激依存的な SWAP-70 の重合能を解析した結果、ホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸、低分子 G タンパク質、Rac の活性化型のそれぞれとの結合が失われた変異体発現細胞株において、SWAP-70 の重合活性が低下しており、後者はその傾向がより顕著であった。

さらに、これらの細胞株において、刺激依存的な形態変化が起きるかどうかについて調べた。増殖因子刺激依存的なラップリング形成能を解析した結果、活性化型 Rac との結合能欠失変異体発現細胞において、ラップリング形成能の低下が認められた。

これらの結果から、SWAP-70 は、増殖因子刺激によって活性化された Rac による調節を受けて重合し、その重合体が刺激依存的細胞形態変化に關与する可能性が示唆された。

活性化型 Rac がラップリング形成に關与することは古くから知られており、その下流の分子もいくつか報告されているが、これらはアクチンに対して作用するものであり、ラップリング形成におけるアクチンへの制御という観点でその役割が論じられてきた。本研究において、アクチン非依存的かつアクチンの動きに先行しておきる SWAP-70 の重合体形成が活性化 Rac によって制御されていたことから、活性化 Rac の新たな役割が明らかになったともいえる。

本研究では刺激依存的細胞形態変化のモデルとしてラップリング形成に注目してきたが、今後、SWAP-70 が關与する細胞癌化における重合体の寄与を調べることにより、細胞癌化における新たな分子機構が明らかになることも期待される。

## 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 1 件)

R. Okoshi, C.L. Shu, S. Ihara, Y. Fukui, Scattering of MCF7 cells by heregulin ss-1 depends on the MEK and p38 MAP kinase pathway, PLoS One 8 (2013) e53298. 査読有り

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