

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440064

研究課題名(和文) がん細胞の浸潤突起形成に関わる膜融合装置の同定と制御機構の解明

研究課題名(英文) Identification of membrane fusion machineries for cancer cell invasion

研究代表者

井上 弘樹 (Inoue, Hiroki)

東京薬科大学・生命科学部・講師

研究者番号：10294448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞が形成する浸潤突起は細胞外基質を分解する活性を有するアクチン細胞骨格に富む細胞膜の微細な突起状構造で、がん細胞の浸潤において重要な役割を果たす。MT1-MMPと呼ばれる膜結合型タンパク質分解酵素は浸潤突起における細胞外基質分解を担う主要な因子で、細胞内小胞輸送の複数の経路により浸潤突起に運ばれると考えられている。しかし、その分子機構の詳細は未解明の点が多く残されている。本研究では、浸潤突起形成とMT1-MMPの浸潤突起への輸送に関わる膜融合タンパク質SNAREを網羅的に同定し、それらSNARE分子とその制御因子が浸潤突起形成に果たす役割の一端を分子レベルで明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Invadopodia in invasive cancer cells are actin-enriched structures with an ability to degrade extracellular matrix (ECM) and play crucial roles in invasion and metastasis. Membrane-type matrix metalloproteinase, MT1-MMP, is a major molecule that mediates ECM degradation at invadopodia and has been thought to be transported to invadopodia through several intracellular trafficking pathways. However, its molecular mechanisms remains elusive. In this study, we comprehensively identified several SNARE proteins as a membrane fusion machinery for MT1-MMP trafficking and invadopodia formation and revealed the roles of the SNAREs and their regulatory factor.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：浸潤突起 細胞膜 エンドソーム 小胞輸送 細胞外基質分解

1. 研究開始当初の背景

がん細胞が形成する浸潤突起は、アクチン細胞骨格に富む細胞膜の微細な突起状構造で、コラーゲン等の細胞外基質 (ECM) を分解する活性を有する。ECM から成る基底膜はがん細胞が転移する際の物理的な障壁となるため、浸潤突起の形成とそれに伴う ECM の分解はがん細胞の浸潤転移を左右する重要なステップの一つであると考えられている。浸潤突起の形成はインテグリンを介した細胞接着や EGF, TGF β といった増殖因子などの細胞外シグナルに応答して始まり、Src, N-WASP, コータクチンなどのシグナル伝達・リン酸化ネットワークによってアクチン細胞骨格の局所的な重合が促進されることにより行われる (Murphy & Courtneidge (2011) Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 12, 413; Yamaguchi et al. (2005) Curr. Opin. Cell Biol. 17, 559)。これらに加えて、浸潤突起の形成には、PI(3)P, PI(3,4)P₂ などのイノシトールリン脂質 (PIP) が重要な役割を果たしている。著者らは、これまで、ホスホリパーゼの新規 PIP 結合ドメインおよび低分子量 G タンパク質 Arf の PIP 依存性 GTPase 活性化タンパク質の浸潤突起形成への関与を明らかにしてきた (Bharti et al. (2007) MCB 27, 8271; Ha et al. (2008) JBC 283, 14915; Inoue et al. (2012) BBA 1823, 930)。

一方、浸潤突起での ECM 分解は、膜結合型タンパク質分解酵素 MT1-MMP (Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase) が中心的な役割を担っている (Itoh & Seiki (2006) JCP 206, 1)。MT1-MMP はそれ自身が ECM の分解を行うと同時に分泌型 MMP の前駆体をプロセシングして活性型に変換することで、ECM 分解を促進する。小胞体上で合成された MT1-MMP は、細胞内小胞輸送によりゴルジ体を経由して細胞膜まで輸送され、その一部がエンドサイトーシスと細胞膜へのリサイクリングを経て浸潤突起へと標的

化されると考えられている (Frittoli et al. (2011) Eur. J. Cell Biol. 90, 108; Poincloux et al. (2009) JCS 122, 3015)。しかしながら、これら MMP の浸潤突起への極性輸送機構については、それに関わる因子が十分に同定されていないなど未解明の点が多く残されている。

2. 研究の目的

細胞内小胞輸送は、輸送小胞の形成、標的膜への輸送、繫留、融合の各ステップから成る。その最終段階である輸送小胞と標的膜の融合では、SNARE (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor) と呼ばれるタンパク質が重要な役割を担っている。輸送小胞が標的膜に繫留されると、標的膜上に存在する 3 種類 (または 2 種類) の target-SNARE (t-SNARE) と小胞上に存在する 1 種類の vesicle-SNARE (v-SNARE) が複合体を形成することにより膜融合が引き起こされる (Hong (2005) BBA1744, 120)。ヒトゲノム中には約 40 種の SNARE 遺伝子がコードされており、これらが 3 + 1 の多様な組み合わせで複合体を形成することで機能している。

浸潤突起の形成と MT1-MMP の浸潤突起への輸送については、高い浸潤転移能をもつ乳がん細胞株 MDA-MB-231 において、v-SNARE の一つである VAMP7 が極めて重要な因子として機能していることが報告されているが (Steffen et al. (2008) Curr. Biol. 18, 926)、VAMP7 と複合体を形成する t-SNARE については研究開始時点では明らかになっていなかった。また、MT1-MMP の複雑な輸送経路 (細胞膜への輸送、エンドサイトーシス、リサイクリング) を考えれば VAMP7 以外の SNARE の関与を考える必要がある。Steffen らの結果は、VAMP7 が細胞膜とエンドソーム間の融合に機能していることを示唆しているが、この経路よりも上流の経路、

例えば，ゴルジ体とエンドソーム間での MT1-MMP の輸送に機能する SNARE も存在することが期待される。そこで本研究では浸潤突起の形成と MT1-MMP の浸潤突起への輸送に関与する SNARE 分子を網羅的に同定することを第一の目的とした。さらに，同定した新規 SNARE 分子が MT1-MMP の輸送に関わる分子メカニズムを明らかにすることを本研究の最終的な目的として設定した。

3. 研究の方法

本研究では，主に以下に示す細胞生物学的手法，生化学的手法，分子生物学的手法，免疫学的手法により行なった。

RT-PCR 法

ドミナントネガティブ変異体の過剰発現

Gelatin degradation assay

siRNA を用いた発現抑制

イムノブロットィング

免疫染色

生細胞イメージング

安定発現株の樹立

免疫沈降

4. 研究成果

1) 変異体の過剰発現と発現抑制による浸潤突起形成に関わる SNARE の同定：

著者は，初めに，MDA-MB-231 細胞において発現している SNARE を同定するため，ヒトゲノムに存在する 40 種の SNARE の発現を RT-PCR 法により解析した。その結果，同細胞では少なくとも 35 種の SNARE が発現していることを見出した。これらすべてをクローニングし，ドミナントネガティブ変異体として機能することが期待される膜貫通領域欠失変異体 (Δ TMD 変異体) の発現ベクター

を作製した。これら 35 種の SNARE から浸潤突起の形成と MT1-MMP の輸送に関与する SNARE を同定するため，作製した Δ TMD 変異体の過剰発現が浸潤突起形成に与える影響について解析した。期待通り VAMP7 の Δ TMD 変異体の過剰発現は浸潤突起の形成を強く抑制した。VAMP7 と同等もしくはそれ以上の抑制を示す SNARE も複数存在した。その中には，STX4，STX7，Vti1b といった細胞膜およびエンドソーム，リソソームで VAMP7 と複合体として機能することが期待される t-SNARE と，Bet1 のようにこれまで小胞体とゴルジ体での機能のみが知られている t-SNARE が含まれていた。

さらに siRNA を用いた発現抑制により内在性 SNARE が浸潤突起における細胞外基質分解に関与しているかを検討したところ，上述の SNARE すべてについて発現抑制の効果を検討したところ，浸潤突起における細胞外基質分解が抑制される傾向が認められた。Miyata らは胃がん細胞株 AGS において変異体の過剰発現を用いた解析から STX4 が MT1-MMP の細胞膜へ輸送を阻害することを報告している（浸潤突起形成への影響は未解析）(Miyata et al. (2004) BBRC 323, 118)。本研究の結果は，STX4 については Miyata らの報告をさらに進め内在性レベルでの STX4 の浸潤突起形成への関与を明らかにするものであり，同時に STX7，Vti1b，Bet1 についてはがん細胞株特異的な新規の輸送経路の存在を示唆するものである。

2) MT1-MMP と SNARE の細胞内分布と生細胞イメージング：

同定した SNARE が関与する MT1-MMP の輸送経路を明らかにするため，MDA-MB-231 細胞における SNARE と MT1-MMP の細胞内分布を免疫染色により解析した。STX4，STX7，Vti1b と Bet1 の 4 者についてその細胞内局在を検討した。その結果，

予想通り ,STX4, STX7, Vti1b については一部のエンドソーム様の構造で MT1-MMP と良く共局在した。共染色の結果, これらは後期末期エンドソームであることが示された。一方, 一般に, 小胞体-ゴルジ体間輸送で機能することが知られる Bet1 については, 予想に反し, ゴルジ体に加えて, MT1-MMP 陽性エンドソームにも局在した。

これら SNARE と MT1-MMP の動的な輸送を解析するため, 著者は, さらに, mCherry タグを付加した MT1-MMP の MDA-MB-231 細胞安定発現株を樹立し, GFP タグを付加した SNARE を一過的に発現させることで生細胞イメージングを行った。その結果, これら SNARE は生細胞においても MT1-MMP とよく共局在し, 浸潤突起周辺で小胞およびチューブ状構造として観察された。このことから, これら SNARE が MT1-MMP の浸潤突起への輸送に積極的に関与していることが示唆された。

3) 浸潤性がん細胞特異的な SNARE 複合体の同定:

上述のように SNARE は最終的に 4 者または 3 者複合体として機能する。そこで, 同定した SNARE が MDA-MB-231 細胞において実際にどの組み合わせで複合体を形成しているかを免疫沈降により明らかにした。これまでの報告では, 細胞膜 SNARE である STX4 は主に SNAP23, VAMP1/2/3 と, エンドソーム SNARE である STX7 は Vti1a/b, STX6, VAMP7/8 と, 小胞体-ゴルジ体 SNARE である Bet1 は STX5, GS27/28, Ykt6/Sec22b と複合体を形成し, 機能することが知られている。MDA-MB-231 細胞における Bet1 のパートナー-SNARE を同定するため 3xFLAG タグを付加した Bet1 (3xFLAG-Bet1) の MDA-MB-231 細胞安定発現株を樹立し, 3xFLAG-Bet1 の免疫沈降により共沈降してくる内在性 SNARE を同定した。その結果, STX5 や GS28, Ykt6

に加えて, これまで複合体を形成することが知られていない STX4, Vti1a/b, VAMP4/8 の共沈降が認められた。さらに, MDA-MB-231 細胞において内在性 STX4 の免疫沈降により Bet1 の共沈降が認められた。特筆すべきことに, 非浸潤性がん細胞である HeLa 細胞では両者の共沈降は認められなかった。このことから, これら複合体が浸潤性乳がん細胞特異的に形成されていることが示唆された。

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3件)

Inoue, H., Matsuzaki, Y., Tanaka, A., Hosoi, K., Ichimura, K., Arasaki, K., Wakana, Y., Asano, K., Tanaka, M., Okuzaki, D., Yamamoto, A., Tani, K. and Tagaya, M. γ -SNAP stimulates disassembly of endosomal SNARE complexes and regulates endocytic trafficking pathways. *J. Cell Sci.* 128, 2781-2794 (2015) 査読有り

Sekino, S., Kashiwagi, Y., Kanazawa, H., Takada, K., Baba, T., Sato, S., Inoue, H., Kojima, M. and Tani, K. The NESH/Abi-3-based WAVE2 complex is functionally distinct from the Abi-1-based WAVE2 complex. *Cell Commun. Signal.* 13, 41 (2015) 査読有り

Inoue, H., Tani, K. and Tagaya, M. SNARE-associated proteins and receptor trafficking. *Receptors & Clin. Investg.* 3, e1377 (2016) 査読有り

[学会発表](計3件)

宮川拓也, 青木瑤子, 渡邊卓也, 山口英樹, 多賀谷光男, 井上弘樹; SNARE タンパク質 Bet1 は浸潤突起への MT1-MMP の効率的な輸送に必要である; 第 88 回日本生化学会・第 38 回日本分子生物学会 合同年会 2015 年 12 月, 神戸

高田和揮, 關野早紀, 馬場崇, 井上弘樹, 谷佳津子; Abi-3/NESH は c-Abl 阻害下で浸潤突起形成を促進する; 第 88 回日本生化学会・第 38 回日本分子生物学会 合同年会 2015 年 12 月, 神戸

宮川拓也, 青木瑤子, 渡邊卓也, 多賀谷光男, 井上弘樹; 浸潤突起形成に関わる SNARE タンパク質の探索; 第 4 回医薬工 3

大学包括連携促進シンポジウム（東京医大，
東京薬科大，工学院大），2015年6月20日，
東京

〔図書〕（計0件）
該当無し。

〔産業財産権〕
該当無し。

〔その他〕
ホームページ等
<https://www.ls.toyaku.ac.jp/laboratory>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 弘樹（INOUE, Hiroki）
東京薬科大学・生命科学部・講師
研究者番号：10294448

(2) 研究分担者

該当無し。

(3) 連携研究者

多賀谷 光男（TAGAYA, Mitsuo）
東京薬科大学・生命科学部・教授
研究者番号：30179569

(4) 研究協力者

該当無し。