

## 142. がん細胞浸潤における細胞内輸送と細胞骨格の協調制御

堤 弘次

北里大学 理学部 生物科学科 細胞生物学講座

Key words : がん細胞, 浸潤, 細胞運動, 細胞内輸送, アクチン細胞骨格

### 緒言

がん細胞は悪性化に伴い運動能、接着能を変化させることで浸潤・転移能を獲得する。細胞の運動と接着には Rho ファミリー低分子量 GTPase である Rac と Rho によるアクチン細胞骨格の制御が重要である。我々は Rac の不活化因子 FilGAP を単離している<sup>1)</sup>。FilGAP は正常上皮細胞の細胞間接着を安定化し<sup>2)</sup>、上皮がん細胞において細胞外基質中の浸潤を促進する<sup>3)</sup>。FilGAP は Rho のエフェクターである ROCK によりリン酸化されることで活性化される<sup>1,4)</sup>。しかしながら、FilGAP のリン酸化による活性化の分子機構は不明であった。今回、我々は細胞内輸送経路の一つクラスリン被覆輸送を制御するクラスリン重鎖が非リン酸化 FilGAP に特異的に結合することを見いだした。クラスリン重鎖との結合が FilGAP の活性に与える影響、そしてがん細胞の浸潤形態に与える影響を調べた。

### 方法および結果

#### 1. FilGAP はリン酸化依存的にクラスリン重鎖に結合する

FilGAP のリン酸化による活性制御機構を明らかにする為に、リン酸化依存的に FilGAP に結合する因子の探索を行った。HEK293T 細胞に全てのリン酸化部位をアラニンに置換した非リン酸化型 (ST/A) およびアスパラギン酸に置換した擬似リン酸化型 (ST/D) FilGAP を発現し、FilGAP を免疫沈降し結合タンパク質を銀染色で検出した (図 1A)。ST/A 変異体特異的に結合する分子量約 180kDa のタンパク質が検出された。このタンパク質を質量分析により解析したところクラスリン被覆の主要構成タンパク質であるクラスリン重鎖 (Clathrin heavy chain: CHC) であることが分かった。ウェスタンブロットによる解析により CHC は WT よりも ST/A 変異体に強く結合し、ST/D 変異体には結合しなかった (図 1B)。また、内在性 FilGAP とも CHC は共沈降し (図 1C)、*in vitro* において FilGAP に直接結合することが分かった (図 1D)。

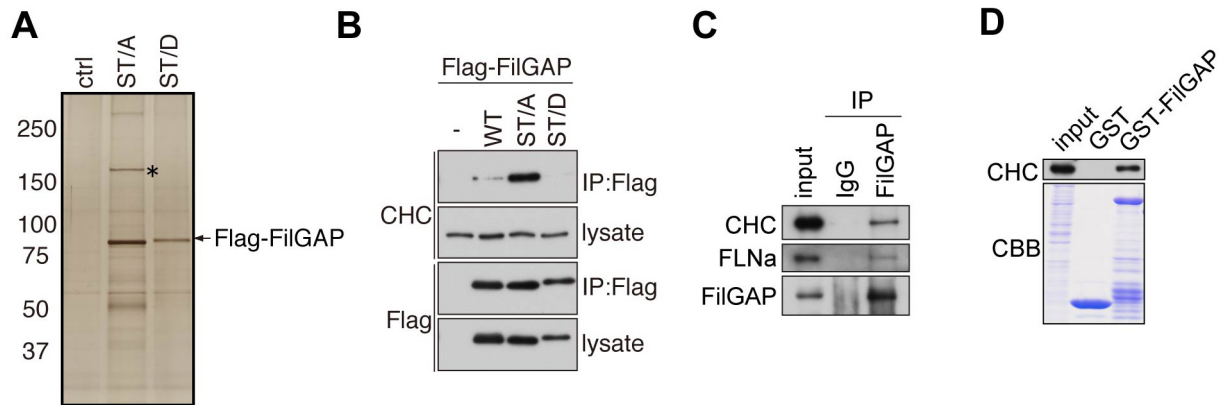


図1. クラスリン重鎖（CHC）は非リン酸化型 FilGAP に特異的に結合する

A) HEK293T 細胞に Flag-FilGAP（非リン酸化型 ST/A あるいは擬似リン酸化型 ST/D）を導入し、免疫沈降後に SDS-PAGE を行い銀染色した。\*:ST/A 特異的に結合したタンパク質。B) ウェスタンブロットによる FilGAP と CHC の共沈降の確認。C) COS-7 細胞で内在性 FilGAP と CHC は共沈降した。D) COS-7 細胞抽出液と精製 GST-FilGAP を反応させたところ CHC が結合することが分かった。

## 2. クラスリン重鎖は FilGAP の RacGAP 活性を阻害する

クラスリン重鎖が非リン酸化型 FilGAP に特異的に直接結合したことから、クラスリン重鎖の結合が FilGAP の Rac に対する GAP 活性に与える影響を調べた。HEK293T 細胞に Flag-FilGAP を導入し精製した（図 2A）。精製した Flag-FilGAP を用いて *in vitro* で FilGAP の GAP 活性の測定を行った。ST/A 変異体の GAP 活性は低く、ST/D 変異体は高い GAP 活性を持つことが分かった（図 2B）。次に精製 MBP-CHC 存在下で FilGAP の GAP 活性を測定した（図 2C）。WT および ST/A は MBP-CHC 存在下で GAP 活性が低下した。しかし ST/D 変異体は MBP-CHC 存在下でも高い GAP 活性を示した。これらの結果から CHC は FilGAP の GAP 活性を阻害することが分かった。

細胞内で CHC が FilGAP の GAP 活性を阻害するか調べるために、細胞伸展アッセイにおける Rac の活性を調べた（図 2D、E）。siRNA で CHC をノックダウンしても Rac の活性は有意な変化はなかった。FilGAP を過剰発現すると細胞伸展が阻害され Rac の活性が低下したが、ST/A 変異体は WT よりも Rac 阻害活性は低かった。しかし、siRNA で CHC のノックダウンを行うと WT 発現細胞の Rac の活性が低下し、さらに ST/A 変異体では Rac の活性が大きく減少した。この結果から細胞内においても CHC が FilGAP の GAP 活性を抑制していることが示唆された。

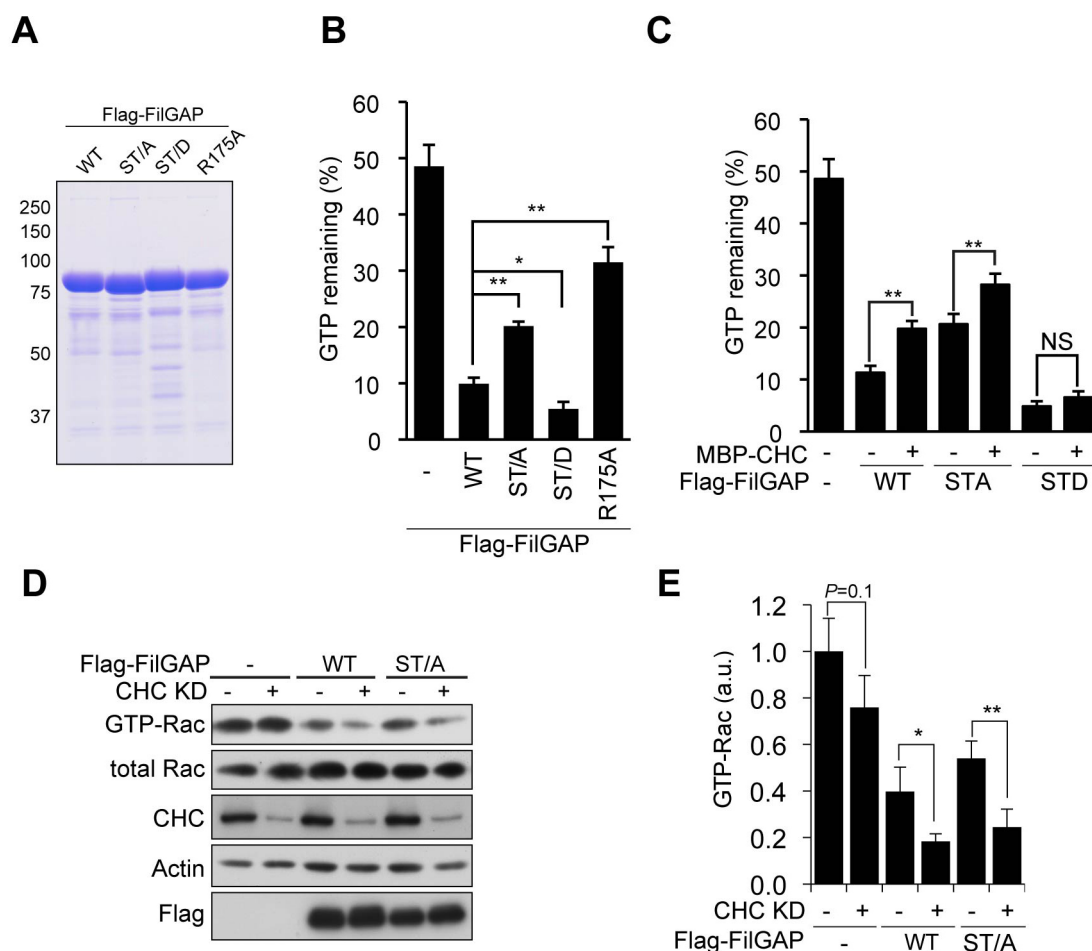


図2. クラスリン重鎖は FilGAP の RacGAP 活性を阻害する

A) HEK293T 細胞に発現し精製した Flag-FilGAP。B) 精製した Flag-FilGAP を  $\gamma$  <sup>32</sup>P 標識した GTP と結合した GST-Rac と 5 分間反応させた。反応後の Rac に結合した  $\gamma$  <sup>32</sup>P を液体シンチレーションカウンターで測定した。\* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01 (Student's t-test)。C) MBP-CHC 存在下での FilGAP の RacGAP アッセイ。\*\* $P$  < 0.01 (Student's t-test)。D) COS-7 細胞を siRNA を用いて CHC をノックダウンを行った後に野生型 (WT) または非リン酸化型(ST/A)FilGAP を遺伝子導入した。細胞はコラーゲンでコートしたディッシュ上に播種し 1 時間後に GST-CRIB を用いて GTP-Rac のプルダウンを行った。E) D の結果の定量解析。n=4, \* $P$  < 0.05, \*\* $P$  < 0.01 (Student's t-test)。

### 3. クラスリン重鎖は FilGAP の活性を阻害することでがん細胞の浸潤形態を制御する

クラスリン重鎖による FilGAP の活性制御ががん細胞の浸潤制御に重要であるかを調べた。乳がん細胞株 MDA-MB-231 細胞はコラーゲンゲル上で培養すると伸長した間葉型遊走と丸いアメーバ型遊走という二つの遊走形態で運動する。間葉型遊走には Rac の、アメーバ型遊走には Rho の活性が重要である<sup>5)</sup>。FilGAP は Rac を阻害することでアメーバ型遊走を促進することが分かっている<sup>3)</sup>。CHC を siRNA でノックダウンを行うとアメーバ型遊走を行う細胞が有意に増加した (図 3A、B)。ところが CHC と FilGAP を同時にノックダウンすると FilGAP をノックダウンした際と同様に間葉型遊走を行う細胞が増加した。この結果は CHC が FilGAP の上流でアメーバ型遊走を抑制していることを示唆している (図 3C)。

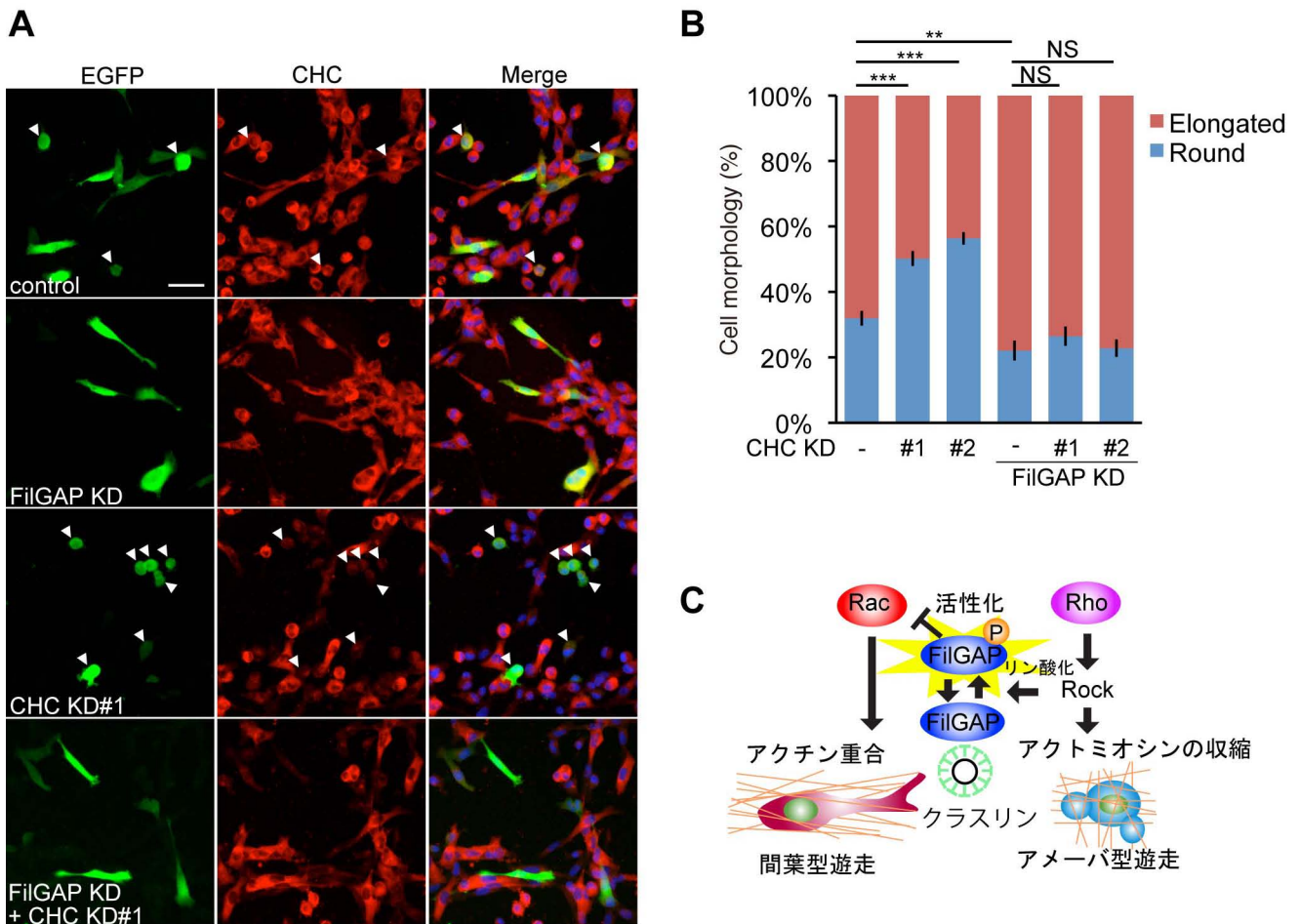


図 3. クラスリン重鎖は FilGAP の上流でがん細胞の浸潤形態を制御する

A) MDA-MB-231 細胞に CHC または FilGAP に対する siRNA を EGFP と共に遺伝子導入した。細胞はゲル状のコラーゲン上で培養した後に固定後、蛍光染色した。矢頭は丸いアメーバ型遊走を行う細胞を示す。B) 遊走形態の定量解析。n=4, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  (Student's t-test)。scale bar: 100  $\mu$ m。C) クラスリンによる FilGAP の活性制御を介したがん細胞の遊走制御モデル。

## 考 察

今回、我々は細胞内輸送において重要な働きを担うクラスリン重鎖が FilGAP の活性阻害を介してがん細胞の浸潤を制御する可能性を見いだした。FilGAP は ROCK によるリン酸化により活性化することが分かっていたが、これはクラスリン被覆から FilGAP が遊離することによって起こることが示唆された。クラスリン被覆輸送は酵母からヒトまで高度に保存された主要な細胞内輸送経路の一つである。クラスリンは主要構成タンパク質であるクラスリン重鎖が 3 量体 (トリスケリオン) を形成し、さらに重合することで格子状のクラスリン被覆構造を形成する。クラスリン被覆輸送は細胞膜表面の受容体などのエンドサイトーシスから、エンドソーム、ゴルジ体からの膜輸送を調節することで細胞の増殖、生存、運動など様々な細胞機能を制御する。このようにクラスリンは一般的に膜輸送を制御することで様々な細胞機能を制御していると考えられている。細胞運動においてもクラスリンは細胞接着因子の細胞内への取り込む際に重要な役割を担っていると考えられていた<sup>6)</sup>。今回、我々はクラスリンが FilGAP の活性を阻害することによりアクチン細胞骨格を制御することで細胞運動を制御する可能性を見いだした。今後のより詳細な解析によりクラスリンは FilGAP の活性阻害を介したアクチン細胞骨格と従来知られている膜輸送とを協調的に制御することでがん細胞運動を制御していることを明らかにしていきたい。

## 共同研究者

本研究の共同研究者は北里大学薬学部の服部成介教授および柴垣芳夫講師である。最後に本研究の実施にあたり様々な機器や試薬の購入を御支援いただいた上原記念生命科学財団にこの場を借りてお礼を申し上げたい。

## 文 献

- 1) Ohta Y, Hartwig JH, Stossel TP. (2006) FilGAP, a Rho- and ROCK-regulated GAP for Rac binds filamin A to control actin remodelling. *Nat Cell Biol.* 2006 Aug;8(8):803-14. doi:10.1038/ncb1437. PMID: 16862148.
- 2) Nakahara S, Tsutsumi K, Zuinen T, Ohta Y. FilGAP, a Rho-ROCK-regulated GAP for Rac, controls adherens junctions in MDCK cells. *J Cell Sci.* 2015 Jun 1;128(11):2047-56. doi: 10.1242/jcs.160192.PMID: 25908853.
- 3) Saito K, Ozawa Y, Hibino K, Ohta Y. FilGAP, a Rho/Rho-associated protein kinase-regulated GTPaseactivating protein for Rac, controls tumor cell migration. *Mol Biol Cell.* 2012 Dec;23(24):4739-50. doi: 10.1091/mbc.E12-04-0310.PMID: 23097497.
- 4) Morishita Y, Tsutsumi K, Ohta Y. Phosphorylation of Serine 402 Regulates RacGAP Protein Activity of FilGAP Protein. *J Biol Chem.* 2015 Oct 23;290(43):26328-38. doi: 10.1074/jbc.M115.666875. PMID: 26359494.
- 5) Sanz-Moreno V, Gadea G, Ahn J, Paterson H, Marra P, Pinner S, Sahai E, Marshall CJ. Rac activation and inactivation control plasticity of tumor cell movement. *Cell.* 2008 Oct 31;135(3):510-23. doi: 10.1016/j.cell.2008.09.043.PMID: 18984162.
- 6) Ezratty EJ, Bertaux C, Marcantonio EE, Gundersen GG. Clathrin mediates integrin endocytosis for focal adhesion disassembly in migrating cells. *J Cell Biol.* 2009 Nov 30;187(5):733-47. doi: 10.1083/jcb.200904054.PMID: 19951918.