

細胞膜剥離法で明らかになる培養破骨細胞の接着側細胞膜面の裏打ち構造

Visualizing Undercoat Structures Associated with the Adherent Membrane of Cultured Osteoclasts by Unroofing Freeze-Etching Techniques

明 坂 年 隆

Toshitaka Akisaka

朝日大学歯学部口腔解剖学分野

要 旨 骨組織のリモデリングを担う破骨細胞の機能・形態的極性を決定する接着側細胞膜面の裏打ち構造について、細胞剥離法を用いた三次元可視化による形態解析を行った。細胞-細胞外基質間接着 (cell-to-matrix adhesion) の場では、アクチン細胞骨格を主体としたポドゾームが膜の裏打ち構造と一体となって空間的ネットワークを構築していた。また膜面に出現する特異なクラスリン被覆シートはタイトな細胞接着と関連して、クラスリン被覆膜がもつ本来のクラスリン依存性エンドサイトーシス以外の機能的役割を示すと考えられる。さらに、最近の接着構造としてのポドゾーム研究展開の現状を紹介するとともに、今後の展望を語る。

キーワード：培養破骨細胞，膜の裏打ち構造，細胞膜剥離，ポドゾーム，クラスリン被覆

1. はじめに

生体における骨組織は一見すると変化の乏しい静的な組織と思われるが、骨芽細胞と破骨細胞に代表される骨組織の構成細胞群によって骨形成と吸収が一定のサイクルで常時進行するリモデリングが絶えず繰り返されているダイナミックに変動する組織である。その動的平衡は2種類の細胞による機能的カップリングにより、絶妙なバランスで生体内カルシウムのホメオスタシスが維持されている。間葉系幹細胞に由来する骨芽細胞に対して破骨細胞は単球-マクロファージ系の血液幹細胞に由来する多核、巨細胞で、その機能としての骨基質吸収により血清中のカルシウムレベルを上昇させてカルシウムホメオスタシスを保つことにある。この骨吸収機能は骨芽細胞をはじめとする骨髄に存在する細胞群とともにさまざまな局所・全身的因子によって制御されており、一連の骨吸収過程では破骨細胞が骨表面に接着して骨面との間に微小閉鎖環境を成立させることが必須条件となる。この細胞接着については細胞間 (cell-to-cell) の関係で成立するデスモゾーム、タイト、ギャップの結合などの接着構造が広く知られているが、細胞-細胞外基質 (cell-to-matrix) 間の接着についてはその構造・機能について不明な点が数多く残されている¹⁾。細胞-細胞外基質間に成立するフォーカルアドヒージョン (focal adhesion) ではよく発達した束状アクチン線維からなるストレスファイバーと膜面との関連で成立しているが、破骨細胞にはそれらが欠如し代わりに、同様にアクチン線維の

豊富なポドゾーム (podosome) とよばれる特有な接着構造が出現してくる。ポドゾームはフォーカルアドヒージョンの一変形であると考えられているが、その分子構成や分単位で変動する動的構造を制御するシステムには相違点も多い²⁾。

破骨細胞に特徴的なポドゾーム構造は接着側細胞膜に付随して出現し細胞質に面した基質側細胞膜面に形成される細胞骨格と密接に関係する。またこの領域の細胞膜は細胞内外の双方向の物質の流れ、シグナル伝達など細胞極性を際立たせる場を提供している。このような領域で細胞膜の細胞質表面に密着して存在し、細胞骨格や種々のタンパク質からなる膜の裏打ち構造の空間的広がりを持った構造を超微構造レベルで観察するには従来の超薄切片法、フリーズフラクチャーやディープエッチングなどの電子顕微鏡法では狭い断面、脂質二重層の内面又は極限られた領域でのみ膜面が露出されるだけで広範囲な細胞質に面した膜表面の観察には不向きであり新たなアプローチが必要になる。そこで膜の裏打ち構造を広範囲に観察する手法として細胞膜剥離法 (shearing open, lysis-squirting あるいは unroofing と呼ばれている) が開発され、これまで様々な種類の細胞で報告がなされているが、この手法は培養条件下の細胞でのみ有効である制約がある。機能的、構造的にも極性をもった *in vivo* での典型的な破骨細胞とガラスやアパタイト上で培養する *in vitro* 条件下でもともに接着構造に関しては共通の事象として再現できる (図 1a, b)^{3,4)}。

本稿ではこれまで技術的な制約で困難であった分離、培養した破骨細胞の接着側細胞膜の細胞質面の裏打ち構造について、その空間的解析を主として細胞膜剥離法と急速凍結・ディープエッチングレプリカ法を用いて得られたデータを紹介するとともに、破骨細胞の接着構造がもつ研究の拡がりについて解説する。

〒 501-0296 岐阜県瑞穂市穂積 1851-1
TEL & FAX: 058-329-1407
E-mail: takisaka@dent.asahi-u.ac.jp
2011 年 11 月 14 日受付

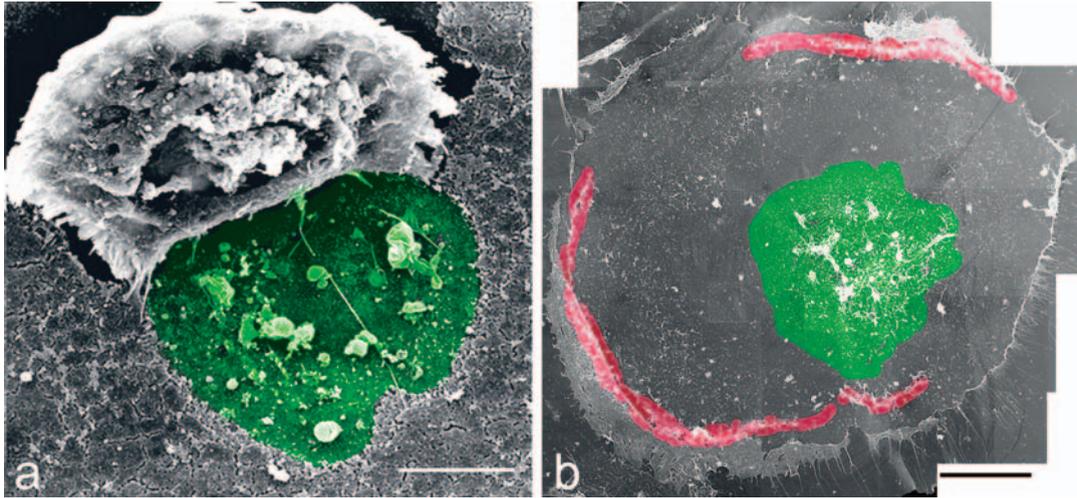


図1 a. アパタイトコーティングガラス上で培養した破骨細胞の走査電子顕微鏡像. 緑色で着色した部分はアパタイト基質が分解・吸収されガラス面が露出された吸収窩領域を示す. b. アパタイト基質上で培養した破骨細胞の細胞膜剥離後のレプリカ像のモニタージュ写真. ポドゾームを含むアクチンリングは赤色, 吸収窩に面した領域は緑色で示す. a, b: スケールバーは10 μm.

2. 細胞膜剥離法の実際

細胞を剥離して接着側の細胞膜面を観察しようとする最初の試みは1975年にMaziaらのグループによって報告されている^{5,6)}. いずれも接着性を高めた人工基質面に細胞を接着させ, 低張緩衝液の水流によって細胞膜面を露出させる手法を用いている. その後, 改良が加えられ緩衝液のジェット水流や超音波によるマイクロキャビテーション効果によって細胞膜面を露出させ, 急速凍結・ディープエッチングレプリカ法を組み合わせることで大幅に分解能を向上させて解析することが可能となった⁷⁾. 本稿では検索対象となる細胞はウサギ骨髄から分離, カバーガラス又はBiocoat (合成リン酸カルシウムアパタイトでカバーガラスをコートしたもの; BD Biosciences社製) 上で1~2日間培養したものを用いた. 通常細胞膜剥離法を用いるとき, 基質面に試料となる細胞をアルシアンブルーやpoly-L-lysineを用いて基質面に結合させる処置が必要になることがあるが, 破骨細胞は本来基質面に強く結合する性質があるのでこの処理は不必要となる. 培養細胞は培養液から人工細胞質緩衝液中に移し, 20 ml プラスチックシリンジを用いて基質上の細胞にジェット水流を吹き付けるか, または超音波細胞破碎装置に取り付けたホーン型マイクロチップによる低出力超音波マイクロキャビテーション効果によって背側細胞膜, 細胞質の大部分を吹き飛ばし, 細胞膜の試料を調製した. このような細胞膜剥離処理にかかる時間は10数秒で終わらせることができる. その後のディープエッチングまたはフリーズドライ時の緩衝液の塩の析出を防ぐため, 蒸留水による短時間の洗浄後に液体窒素温度に冷却した純銅ブロックに圧着させる急速凍結固定を行った. 免疫標識を行う場合には, 剥離後0.1% glutaraldehydeによる短時間の化学固定が必要となり, 抗体と金コロイド標識をすれば金コロイドが白金レプリカ上でも高コントラストを示しそ

の局在が明らかに行ける. ディープエッチングまたはフリーズドライ処理の後白金を2 nm厚になるよう蒸着源から試料面に10~20度の角度で回転蒸着し, カーボン蒸着でレプリカを補強した(図2). レプリカ膜はガラス面に培養させた細胞では比較的容易に剥がれるが, アパタイト上で培養した細胞ではアパタイトを無機酸(0.1 M 塩酸)またはEDTAで溶解させるステップが必須となり, 続いて次亜塩素酸による有機物の除去処理を行い蒸留水による洗浄後, フォルムバル支持膜を張った75メッシュのグリッドに回収して透過型電子顕微鏡(TEM)で観察した. 観察時にはゴニオメーター装置を用いて±10~20度の傾斜をつけてステレオペア撮影を行った. 三次元可視化にはステレオペア, アナグリフ, 電子線トモグラフィの手段が利用されるが, 2枚のステレオ写真からAlicona社製「Mex ver.5」のソフトを用いてコンピュータ上で簡易的に三次元構築(DEM: Digital Elevation Model)を行った.

3. 接着膜面の細胞質側表面の膜の裏打ち構造とポドゾーム

接着構造としてのポドゾームは破骨細胞のみならずマクロファージ, 樹状細胞, oncogene で形質転換させた線維芽細胞, 血管平滑筋細胞や血管内皮細胞など多様な細胞に出現していることが知られている. アクチン染色で見たポドゾームの蛍光像は, 単独のものではドット状を呈しクラスターからリング, ベルト状へと細胞機能に応じて変化し, これらの変化は細胞の分化・成熟と骨吸収活動を反映したものとなっている⁸⁾. ポドゾームの形成は全く新規にアクチンの重合からde novo形成されるほか, 既存のものから分裂して形成される2つの経路がある. ポドゾームのhalf-lifeは分単位のダイナミックに変貌する構造である. ポドゾームはアクチン線維を主体とした構造でその中心(コア)部と周辺(リング)部の2つの異なったアクチン細胞骨格の配列を伴うサブドメインから

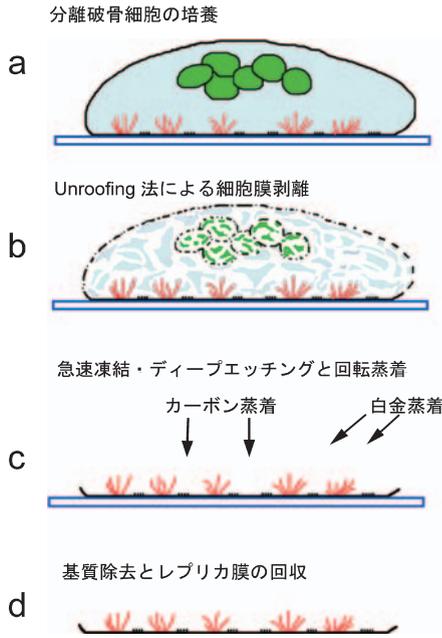


図2 Unroofing 法による細胞膜剥離の手順

a: 基質上での分離破骨細胞の培養. b: 緩衝液のジェット水流, または超音波によるマイクロキャビテーション効果による核, 細胞質の除去と接着側細胞膜面の裏打ち構造と膜面の露出. c: 露出した細胞膜面上の裏打ち構造とアクチン細胞骨格の急速・凍結固定とその後のディープエッチング又はフリーズドライ. d: 白金とカーボンの回転蒸着によるレプリカ膜の作製. e: 酸・有機溶剤による基質成分と細胞成分の除去とレプリカ膜の回収.

構成されている⁹⁾. ポドゾームコアでは密に集中した分岐アクチン線維から成るが, そのリング部(アクチンクラウドとも呼ばれる)では密度も疎で比較的長いケーブル状のアクチン線維が分布している(図3). 典型的なフォーカルアドヒージョンの構成アクチン関連蛋白は50種類以上のものが報告されているが, ポドゾームにおいてもコアとその周辺リング部とは明らかに異なりコア部にはWASP, Arp 2/3, dynamin 2, cortactin, vimentin, fimbrin, Pyk 2等が, またリング部にはpaxillin, talin, vinculin, myosin等が局在することが明らかになっている¹⁰⁾. そのうちリング部に存在するG-actinがポドゾームのアクチンネットワーク形成のための供給源となっている³⁾. 中間径フィラメントや微小管はポドゾーム本体構造の構成要素とはならずポドゾーム形成後に近傍に位置して相互にポドゾームの離散・集合に影響を与えられている. F-アクチン染色蛍光像では大小サイズの混在したポドゾームの一つ一つがドット状を呈するが, アクチン関連蛋白との二重染色ではポドゾームは円錐形の底辺を細胞膜面に向けた形状を示し底辺のサイズはおおよそ直径0.5~3 μm, 高さも同等な二重構造が識別できる(図4). 細胞膜剥離後の電子顕微鏡観察からはポドゾームのアクチン細胞骨格は膜の裏打ち構造としてのアクチン線維と連結しそれぞれの線維は膜面顆粒を介して膜面に繋ぎ止めらフォーカルアドヒージョンの膜面とのコンタクト部で観察されるのと同様であ

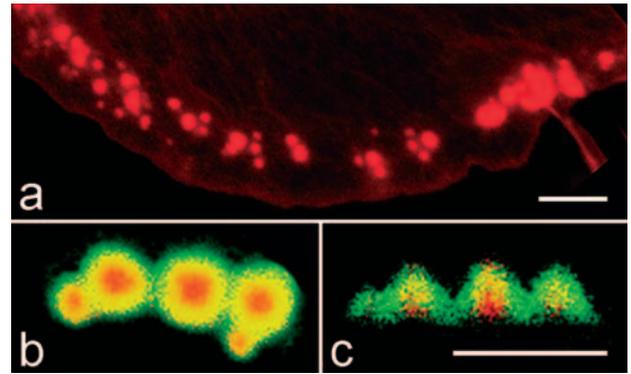


図3 ポドゾームの共焦点レーザー顕微鏡像

a: ファロイジンによるF-アクチン単染色では破骨細胞ラメリポデウム領域のポドゾームコア部(赤色のドット)のみが染色される. サイズが異なる単独のものからクラスター状となりポドゾームの融合像も観察される. b: ファロイジンによるF-アクチン(赤色)とG-アクチンに特異的に結合するDBP(Vitamin D Binding Protein)抗体による二重染色(緑色)ではコアとリング部が識別される. 共存する部位は黄色になる. 図bはXY-軸のオプティカル切片像. c: 図bで観察されるポドゾームのZ-軸オプティカル切片像. 円錐形の底辺を基質側に向けたポドゾームから同様にコアとリング部から構成されているのがわかる. スケールバーは5 μm.

た¹¹⁾. 通常の細胞膜面に密着する裏打ち構造としてのアクチン線維はトモグラフィーによる解析から膜面との間隔が1~2 nmであると報告されている¹²⁾. ジェット水流または超音波マイクロキャビテーションによる細胞膜剥離法ではポドゾームコア部やポドゾームが集合してシーリングベルトを構成するアクチン線維に結合するいろいろな関連蛋白を取り除くことが困難で, クリアな線維構造として殆ど見られない. 逆に強固に結合している成分がポドゾーム構造と一体となって重要な役割を演じていると考えられる(図4, 5a). このことはtriton X-100などの界面活性剤処理で取り除くことができることから明らかである. それに対して周辺の裏打ち骨格ではG-アクチンからなるおおよそ5 nm周期の明瞭な線維構造を呈した. またポドゾームを構成する細胞骨格は膜の裏打ち構造とともに剥離によるシアストレスに抵抗し, 強固に膜面に結合していることを示している. または剥離の程度を強くすると殆ど膜面構造は消失するが, 弱いと細胞質の構造が多く残り接着側細胞膜が露出されないなど現在の技術では定量的に調節することは不可能である. 私たちのこれまでの検索ではアクチン線維の極性はコア部では膜面に重合端のプラスエンドが向くが, クラウド部では中心に向かっている. このことはアクトミオシン系のもとでポドゾーム領域の膜面ではトレッドミル機構が働いて機械的な力が膜面に伝達されることになる. その結果, 効率的にポドゾーム領域膜に存在する膜貫通性のインテグリンを介した接着メカニズムが働くことが考えられる.

通常培養条件を2次元ではなく3次元的に培養基質と接触するようにすると細胞形態に大きな変化が現れることが判っている. 2次元培養ではラメリポデウムを伴い基質上で広

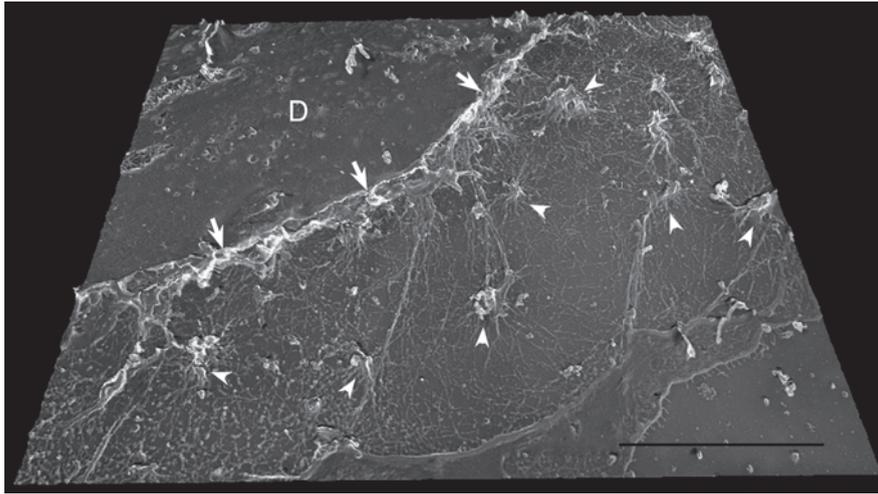


図4 破骨細胞ラメリポディウム領域に相当する接着側膜面上に出現するクラスター状ポドゾムのDEM像. それぞれのポドゾム（矢頭）はアクチン線維で繋がれ膜の裏打ち骨格と連結している. 矢印は膜剥離されずに残った背側細胞膜（D）と露出した接着側細胞膜面との境界を示す. スケールバーは10 μm .

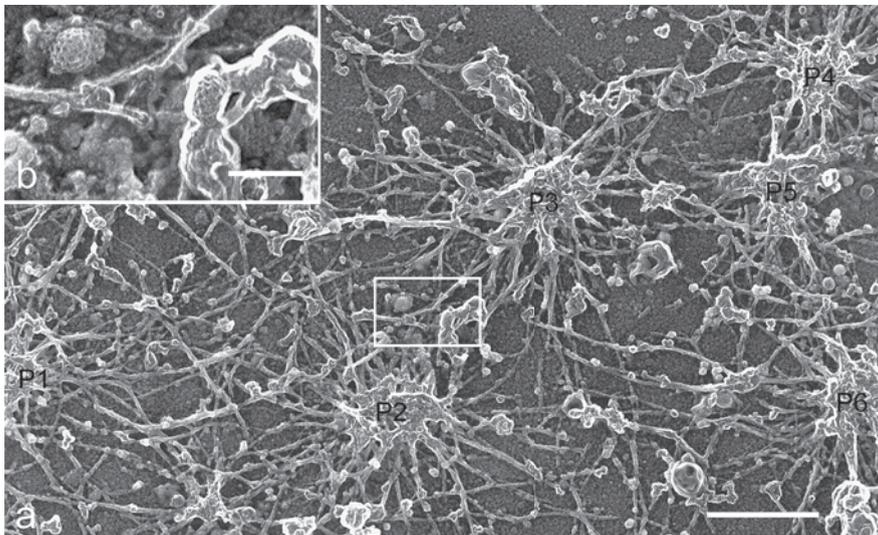


図5 a. アクチンベルト内のポドゾム相互は図4に比較してクラスターとなったものよりさらにアクチン細胞骨格の密なネットワークを作っている. 膜の裏打ち骨格とも一体化されて膜面に結合し三次元的なネットワークを構築している. ポドゾムのリングに相当する領域にクラスリン被覆ピット・小胞が観察されクラスリン依存性エンドサイトーシスが生じている. この図では7つのポドゾムが識別できる（P1～P6）. b. 白線四角で囲んだポドゾムのリング（アクチンクラウド）部に相当する領域を拡大したもの. 数個のクラスリン被覆ピット・小胞が観察されこの領域で膜の輸送がおこなわれていることを示している. a スケールバーは2 μm , b は0.1 μm .

く伸展する線維芽細胞が3次元培養ではラメリポディウムを欠如し、発達の悪いストレスファイバーをもつ細長い紡錘型の本来の *in vivo* にある形に近い細胞形態へと変化する. また破骨細胞と同様なポドゾムを形成するマクロファージは3次元培養下では単独のポドゾムではなく細胞の突出部にクラスター状に現れる特徴があるという¹³⁾. しかし破骨細胞では接着する相手となる骨基質とは *in vivo* においても2次元 *in vitro* で再現される状態と同様に, cell-to-matrix の関係が成立するので2次元培養でもより *in vivo* 状態に近い環境で解析できる利点をもっている.

細胞膜剥離により表される破骨細胞の接着側細胞膜には

2つのタイプのクラスリン被覆, ピットとシート, が出現してくる. 接着側膜面にはカベオラは観察されなかった. 破骨細胞をカバーガラスまたはアパタイト上で培養しても同様に広範囲にクラスリン被覆シートが出現したがクラスリンピットはポドゾム近傍の限られた場所に出現するのみであった^{3,4)}(図5b). ポドゾム領域に出現するクラスリン被覆ピットはポドゾム膜に存在するインテグリンのリサイクリングに関わるのか, またシグナル伝達の一環であるのか想像の域を出ない. 大部分のクラスリン被覆がピットや小胞形成に至らずシート状になったままの“frustrated endocytosis”の状態にあり, 強固に基質に接着した細胞膜ではクラスリン依存性

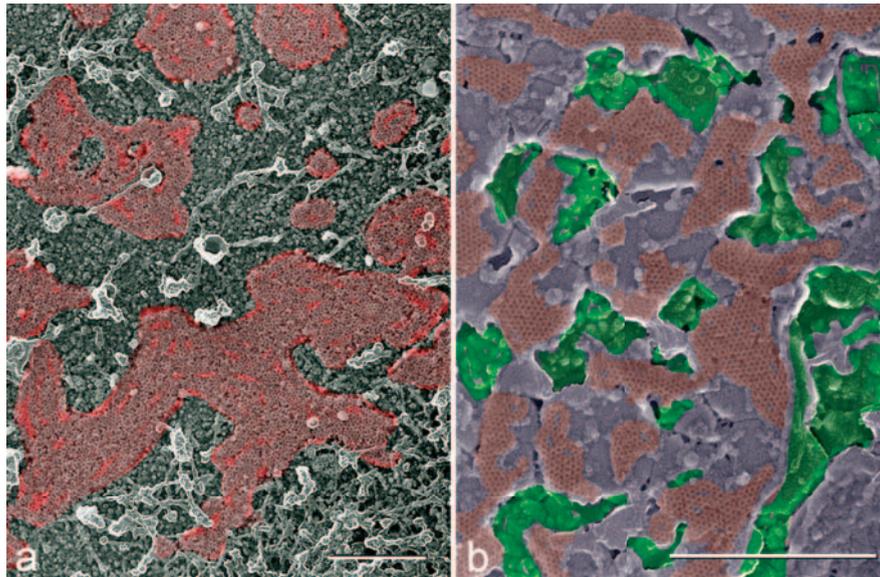


図6 a. 破骨細胞ラメリボディウム領域に出現するシート状を呈するクラスリン被覆（赤色で着色）部. 相互に数珠繋ぎ連結するクラスリンシート領域は多様な形態を呈する. これらの領域では膜骨格が欠如するとともにクラスリン被覆ピット・小胞は殆ど観察されない. スケールバーは1 μm . b. 吸収窩に面した膜面. 部分的に脱灰されたアパタイト結晶表面（緑色で着色）部にはクラスリン被覆は観察されないが, 平滑を呈する無傷のアパタイト結晶上では数珠状に繋がったフラットなクラスリン被覆膜（赤色で着色）が強固に接着している. スケールバーは1 μm .

エンドサイトーシスのプロセスが抑制されることを示している (図6a). アクチンベルトで囲まれた吸収窩領域では分解産物取り込みのためにクラスリン被覆介在エンドサイトーシスの頻度が高まることなく, アパタイトにクラスリン被覆シートが残存していた. アパタイト表面と密着するクラスリン被覆部ではアパタイト表面の分解が及ばず, その結果平滑面を呈したままの無傷のアパタイトが保存されていた (図6b). このことは吸収窩内でもクラスリン依存性エンドサイトーシスによって分解された細胞外基質を細胞内に取り込むメカニズムが働いていないことを示している. また破骨細胞で観察されるようにクラスリン被覆シートの存在は細胞骨格の関与しない基質面との接着機能が働いていることを示しており, 同様な報告が培養上皮細胞における cell-to-matrix adhesion でなされている¹⁴⁾. クラスリン依存性エンドサイトーシスに必須の AP-2 を欠如させてクラスリン被覆シートを形成させなくすると細胞運動が活発化すると報告¹⁵⁾もありクラスリン被覆シートの出現は基質面との接着の強固さと結びついているといえる. 少なくとも細胞内に取り込みピット形成が起こるポドゾーム領域にはクラスリン, ダイナミン, アクチン, ARP2/3 の局在が示されているが, クラスリン被覆シートが出現する領域にはそれらの裏づけが欠けている. これらのクラスリン被覆シートは破骨細胞に特異的に出現するわけでも無く他の細胞でも報告されている¹⁶⁾. しかし破骨細胞はもとより一般的にクラスリン被覆ピット・小胞を作らないシートの機能的役割については解明すべき点が多く残されている.

4. 破骨細胞の接着構造研究の広がり

ポドゾームの機能的役割について破骨細胞ではまず骨吸収が考えられるがそれ以外の細胞については血管内皮細胞による血管新生 (angiogenesis), 血管平滑筋細胞におけるアテローム性動脈硬化 (atherosclerosis), がん細胞での組織浸潤・転移に関与することが解明されつつある¹⁷⁾. 破骨細胞では骨面への接着構造として注目されるようになったポドゾーム研究が端緒となり¹⁸⁾ Rous sarcoma virus (RSV) 形質転換した線維芽細胞¹⁹⁾, 単球性白血病細胞, 悪性リンパ腫における B 型リンパ球²⁰⁾ に類似な接着構造インベドポディア (invadopodia, 浸潤突起) として区別され, 細胞の遊走・転移に接着構造が密接な関係があることが想定されるようになった²¹⁾.

ポドゾームは接着構造としての機能のみならずそれらの膜に MT 1 (membrane-type 1)-MMP や MMP-9 などの metalloproteinase の局在が証明されるに至り, 細胞外基質の分解にもかかわることが判ってきた^{22,23)}. アクチンが豊富に局在する接着構造のうち破骨細胞をはじめ単球-マクロファージや樹状細胞由来の細胞に見出されるものをポドゾームと, 蛋白分解性活性を有する浸潤性がん細胞やがん遺伝子で形質転換した細胞を基質上で増殖させたときに細胞外基質に突出したポドゾームに類似した構造をインベドポディアと呼び区別される. 当初, RSV 形質転換線維芽細胞で見られた接着構造をポドゾームと見なしたが今となってはインベドポディアとすべきであったかもしれない. しかしポドゾームがインベドポディアの前駆体であるのかどうかはまだ明確ではなく, ポドゾームとインベドポディアは構造・機能上も共通性も多く2つを明確に区別することは困難な状況となっている. 元来,

細胞はこの2つの類似したポドゾーム／インベドポディア両方を形成する能力が備わっており、周囲の環境からのシグナル伝達の違いによってどちらを形成するのか作り分けているのかもしれない。ガラス面上で培養した破骨細胞のポドゾームと、アパタイトなどの石灰化基質上で培養したときに出現してくるシーリングゾーンとの互換性がこのことを示唆している。

破骨細胞が血液幹細胞に由来する前駆破骨細胞として血管から脱け出て組織中を移動し骨表面に到達するまでの経路をたどり、成熟破骨細胞となって骨の分解・吸収に携わる過程とがん細胞の組織浸潤・転移の間で起こる cell-to-matrix の相互作用に共通性を見出すことができる。別の側面からがんの増殖は血管新生に依存することから血管内皮細胞に形成されるポドゾームを抗体療法のターゲットとしてピンポイントで働かなくして、内皮細胞の遊走能を喪失させ血管新生を妨げることが *in vitro* で明らかにされている²⁴⁾。また逆に、X染色体連鎖性劣性原発性免疫不全症と知られる Wiskott-Aldrich 症候群 (WAS) は WAS 遺伝子の突然変異で、その結果コードされる WAS 蛋白によってマクロファージや樹状細胞のポドゾーム形成が障害されることに原因がある²⁵⁾。事実マクロファージや破骨細胞のポドゾームにも局在が証明されており、細胞が持つポドゾームの役割には功罪両面を併せもっている。

5. おわりに

破骨細胞の接着側細胞膜の裏打ち構造を unroofing 法によって超微構造レベルで空間構造解析することが可能となった。アクチン細胞骨格を主体とするポドゾーム構造と膜の裏打ち構造との関連を明らかにすることができた。また膜面にはクラスリン被覆領域がピット形成するものとシート状に残るものが出現した。クラスリンピット・小胞の存在はすべての真核細胞に備わったクラスリン依存性エンドサイトーシスのプロセスで細胞外からの物質の取り込み、細胞表面の受容体の取り込みによるダウンレギュレーションなどさまざまな細胞機能の発現の場となっている。しかし接着側膜面に出現する“frustrated endocytosis”状態にあるクラスリン被覆シートが何らかの形で細胞接着にかかわり細胞運動を妨げる働きが考えられるが、その正確な機能と回収メカニズムについては不明である。

単に生理学的現象としての骨のリモデリングにおける破骨細胞に出現するポドゾーム／インベドポディアがもつ接着、基質分解能メカニズム解明のための研究が予想を越えた拡がりて展開されてきた。さらにそれらが持つ cell-type-specific variation によって新たなカテゴリーの拡大が予想される。細胞と細胞外マトリックスとの生物学的現象の理解は生理的側面のみならず病理的側面も併せ持ち、ポドゾーム／インベドポディアをモデルにアクチン細胞骨格のダイナミズムを解き明かす一手段として高い空間・時間分解能を持つ顕微鏡的手法で更なる解析を目指したい。

謝 辞

本稿で紹介した研究の一部は平成 23 年度日本学術振興会科学研究費補助金 (基盤研究 C (21592350)) の助成下で行った。

文 献

- 1) Berrier, A.L. and Yamada, K.M.: *J. Cell Physiol.*, 213, 565–573 (2007)
- 2) Block, M., Badowski, C., Millon-Fremillon, A., Bouvard, D., Bouin, A.P., Faurbert, E., Gerber-Scokaert, D., Planus, E. and Albiges-Rizo, C.: *Eur. J. Cell Biol.*, 87, 491–506 (2008)
- 3) Akisaka, T., Yoshida, H., Suzuki, R., Shimizu, K. and Takama, K.: *J. Electron Microsc.*, 52, 535–543 (2003)
- 4) Akisaka, T., Yoshida, H., Suzuki, R. and Takama, K.: *Cell Tissue Res.*, 331, 625–641 (2008)
- 5) Clarke, M., Schatten, G., Mazia, D. and Spudich, J.A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 1758–1762 (1975)
- 6) Mazia, D., Schatten, G. and Sale, W.: *J Cell Biol.*, 66, 198–200 (1975)
- 7) Heuser, J.: *Traffic*, 1, 545–552 (2000)
- 8) Saltel, F., Chabadel, A., Bonnelye, E. and Jurdic, P.: *Eur. J. Cell Biol.*, 87, 459–468 (2008)
- 9) Akisaka, T., Yoshida, H., Inoue, S. and Shimizu, K.: *J. Bone Miner. Res.*, 16, 1248–1255 (2001)
- 10) Linder, S. and Aepfelbacher, M.: *Trends Cell Biol.*, 13, 376–385 (2003)
- 11) Samuelsson, S.J., Luther, P.W., Pumplun, D.W. and Bloch, R.J.: *J. Cell Biol.*, 122, 485–496 (1993)
- 12) Morone, N., Fujiwara, T., Murase, K., Kasai, R.S., Ike, H., Yuasa, S., Usukura, J. and Kusumi, A.: *J. Cell Biol.*, 174, 851–862 (2006)
- 13) Van Goethem, E., Guiet, R., Balor, S., Charrière, G.M., Poincloux, R., Labrousse, A., Maridonneau-Parini, I. and Le Cabec, V.: *Eur. J. Cell Biol.*, 90, 224–236 (2011)
- 14) Batchelder, E.M. and Yarar, D.: *Mol. Biol. Cell*, 21, 3070–3079 (2010)
- 15) Saffarian, S., Cocucci, E. and Kirchhausen, T.: *PLoS Biol.*, 7, e1000191 (2009)
- 16) Traub, L.M.: *PLoS Biol.*, 7, e1000192 (2009)
- 17) Gimona, M. and Buccione, R.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 38, 1875–1892 (2006)
- 18) Marchisio, P.C., Cirillo, D., Naldini, M., Primavera, M.V., Teti, A. and Zamboni-Zallone, A.: *J. Cell Biol.*, 99, 1696–1705 (1984)
- 19) Tarone, G., Cirillo, D., Giancotti, F.G., Comoglio, P.M. and Marchisio, P.C.: *Exp. Cell Res.*, 159, 141–157 (1985)
- 20) Marchisio, P.C., Bergui, L., Corbascio, G.C., Cremona, O., D’Urso, N., Schena, M., Tesio, L. and Caligaris-Cappio, F.: *Blood*, 72, 830–833 (1988)
- 21) Gimona, M.: *Semin. Cancer Biol.*, 18, 23–34 (2008)
- 22) Sato, T., del Carmen Ovejero, M., Hou, P., Heegaard, A.M., Kumegawa, M., Foged, N.T. and Delaissé, J.M.: *J. Cell Sci.*, 110, 589–596 (1997)
- 23) Linder, S.: *Trends Cell Biol.*, 17, 107–117 (2007)
- 24) Gherzi, G., Zhao, Q., Salamone, M., Yeh, Y., Zucker, S. and Chen, W.T.: *Cancer Res.*, 66, 4652–4661 (2006)
- 25) Linder, S., Nelson, D., Weiss, M. and Aepfelbacher, M.: *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 9648–9653 (1999)