

細胞表層のドメイン構造と細胞運動

The Role of Plasma Membrane Domains in Cell Adhesion and Migration

村井稔幸

Toshiyuki Murai

大阪大学大学院医学系研究科

要旨 細胞運動は、がん細胞などに顕著に認められ、細胞外マトリックスとの相互作用を通して調節される。近年、細胞膜に存在する微細な機能ドメインの役割が大きな注目を集めている。特に、脂質ラフト (lipid raft) は細胞膜における細胞内外の情報変換の中心的な部位であると考えられており、細胞接着・細胞運動を司るタンパク質が存在する。本稿では、脂質ラフトの細胞運動における役割に焦点を当て、大気圧走査電子顕微鏡 (ASEM) を用いた成果を交えて論考した。

キーワード：細胞膜、脂質ラフト、細胞接着、大気圧走査電子顕微鏡 (ASEM)、光一電子相関顕微鏡 (CLEM)

1. はじめに

細胞接着の変調と細胞運動の亢進は、がん細胞に顕著に認められる特徴であり、がんの浸潤・転移において重要な役割を果たしている。がん細胞は、腫瘍組織に形成される細胞外マトリックスとの相互作用を通して浸潤能を獲得し、転移する。近年、腫瘍組織の主なマトリックス成分であるヒアルロン酸の断片化によるリモデリングが、がん細胞の浸潤性を亢進することがわかってきた。本稿では、細胞膜における脂質ラフトの役割に焦点を当て、膜ドメインによる細胞接着と細胞運動の制御機構について解説する。

2. 細胞外マトリックスリモデリング

がん細胞は細胞外マトリックスと相互作用して細胞運動性を亢進し、浸潤する。近年の研究により、担がん患者に検出されるヒアルロン酸オリゴ糖が、がん細胞表面レセプター CD44 に結合してがん細胞の運動性を亢進することが見出され、腫瘍微小環境で生じるヒアルロン酸オリゴ糖や上皮成長因子 (EGF) のがん進展における新たな分子機序が明らかになってきた¹⁾。CD44 は、ヒアルロン酸に対する接着分子として機能する I 型細胞膜貫通タンパク質であり、がんの浸潤・転移に密接に関わる。細胞外マトリックスリモデリングは発生や組織構築に必須の現象であるが、ヒアルロン酸オリゴ糖生成といった腫瘍微小環境で起こる細胞外マトリックスリモデリングの情報は、CD44 を介して細胞内にもたらされ、がんの悪性を助長する。1 回膜貫通タンパク質である CD44 の機能が、細胞膜上でどのように制御されるのかについては

不明な点が多かったが、最近、膜ドメインの役割が明らかになってきた^{2,3)}。

3. 脂質ラフトの構造

現在考えられている細胞膜モデルの基礎となっているのは、Singer と Nicolson により 1972 年に提唱された流動モザイクモデル (fluid mosaic model) である。流動モザイクモデルにおいては、グリセロリン脂質が配列した脂質二重膜を基本として細胞膜が成り立ち、その中に膜タンパク質がモザイク様に存在し、熱拡散運動により自由に流動する。このモデルでは、脂質の多様性や脂質間の相互作用はあまり考慮されておらず、脂質は基本的に同一面内で均一分布するとされていた。

しかし、細胞膜を構成する脂質は、主にグリセロリン脂質、スフィンゴ脂質、コレステロールから成り、それらの物性の違いなどにより、膜構造に様々な影響を与える。現在では、細胞膜の同一面内での脂質の分布には偏りがあり、微細な機能ドメインを形成していると考えられている。なかでも、最も注目されているのが、Simons らにより提唱された脂質ラフト (lipid raft) モデルである⁴⁾。脂質ラフトモデルでは、上皮細胞のアピカル膜にコレステロールとスフィンゴ脂質に富む膜マイクロドメインがあるとされ、その後、真核細胞に対して一般化された概念が定着した。脂質ラフトには、膜受容体や G タンパク質、アダプタータンパク質など、さまざまなシグナル伝達分子が見いだされ、脂質ラフトは細胞膜における細胞内外の情報変換の中心的な部位であると考えられている⁴⁾。

脂質ラフトについては、その大きさや存在寿命がまだ確定されておらず、慎重な取り扱いが提言されている。脂質ラフ

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2
2013 年 12 月 18 日受付

トを難解にしている主な原因は、当初に生化学的アプローチに依存して提唱されたことにある。脂質ラフトは、Triton X-100などの非イオン性界面活性剤に対する不溶性膜(detergent-resistant membrane; DRM)画分として、密度勾配遠心法により濃縮、回収される膜ドメインだとされている。しかし、処理の過程で界面活性剤による膜の再編成があるため、DRMが処理前の生体膜における脂質ラフトと完全には一致しない。

細胞膜における分子の膜ドメイン局在を可視化する既存の方法には、光学顕微鏡による一分子追跡法や超解像法、電子顕微鏡による凍結切断レプリカ標識法などがある。脂質ラフトの大きさは10 nmから200 nmの範囲にあり、光の回折限界の理由から通常の光学顕微鏡では正確に捉えられないと考えられている。一方、電子顕微鏡は遥かに高い分解能を有するが、従来の電子顕微鏡法では試料を真空下に置くために脱水処理をする必要があった。

そうした状況の中、大気圧走査電子顕微鏡(atmospheric scanning electron microscope; ASEM)が開発された⁵⁾。ASEM(日本電子株式会社 ClairScope™ JASM-6200)の特徴は、開放型ディッシュ内の液中試料について10万倍の高倍率像を得られる点にあり、細胞を構成するタンパク質のダイナミックな離合集散などの容易な観察を可能にする⁶⁾。底部に厚さ100 nmの窒化シリコン(SiN)薄膜を有するプラスチック製

ディッシュ内で細胞を培養し、脱水処理をすることなく、電子顕微鏡観察に供することができる(図1)。正に荷電した金ナノ粒子(positively-charged Nanogold)を用いて細胞表面の染色を行い、ASEMにより水溶液中での細胞の微細形態が観察された⁷⁾(図2A)。また、ASEMでは水溶液中で細胞が電子顕微鏡観察できるため、従来の光学顕微鏡観察で標識に用いてきた抗体が幅広く使える利点がある。さらに、ASEMでは、ディッシュ設置部の上部に光学顕微鏡が、下部に倒立SEMが同軸配置されており、同一視野を、光学顕微鏡と電子顕微鏡で観察可能である(図1C)。したがって、光-電子相関顕微鏡法(correlative light and electron microscopy; CLEM)が可能である。これらの特徴を生かし、蛍光色素 Alexa Fluor 488と金コロイド(Nanogold)とを結合した抗体を用い、リンパ球についてCD44の細胞表面分布が観察された⁷⁾。その結果、光学顕微鏡では明瞭に観察できなかった微絨毛が電子顕微鏡観察ではっきりと捉えることができ、そこにCD44が存在することが認められた(図2B)。

ASEMは8 nmの空間分解能を達成しており⁵⁾、超解像光学顕微鏡の分解能を遥かに凌駕する。直径1.4 nmの金ナノ粒子を金増感したASEMによる免疫電子顕微鏡法で、がん細胞におけるCD44の細胞表面分布が可視化された²⁾。CD44は通常は膜ドメインに局在するが、脂質ラフトを破壊する作用のあるメチル-β-シクロデキストリン(MβCD)処理により、CD44

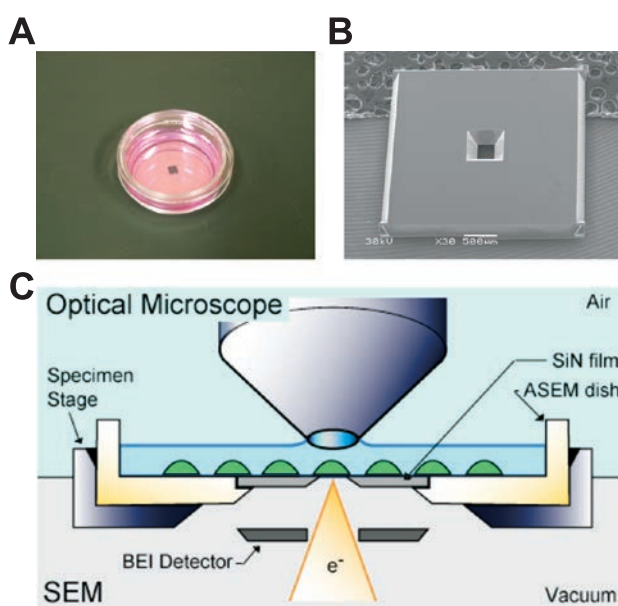


図1 大気圧走査電子顕微鏡(ASEM)

A, ASEM ディッシュ。取り外しが可能な35 mm径ディッシュは底部に100 nm厚の窒化シリコン(SiN)薄膜を担持し、それにより大気圧(上部)と真空(下部)を隔てる。B, ASEM ディッシュのSiN薄膜領域の走査電子顕微鏡像。スケールバーは500 μm。C, ASEMの構成(日本電子株式会社 ClairScope™ JASM-6200)。ASEM ディッシュの下部に倒立した走査電子顕微鏡(SEM)が配置され、上部には光学顕微鏡が配置される。下部より収束電子線が大気圧下の試料に照射され、反射電子イメージング(BEI)検出器により像を得る。文献7より転載。

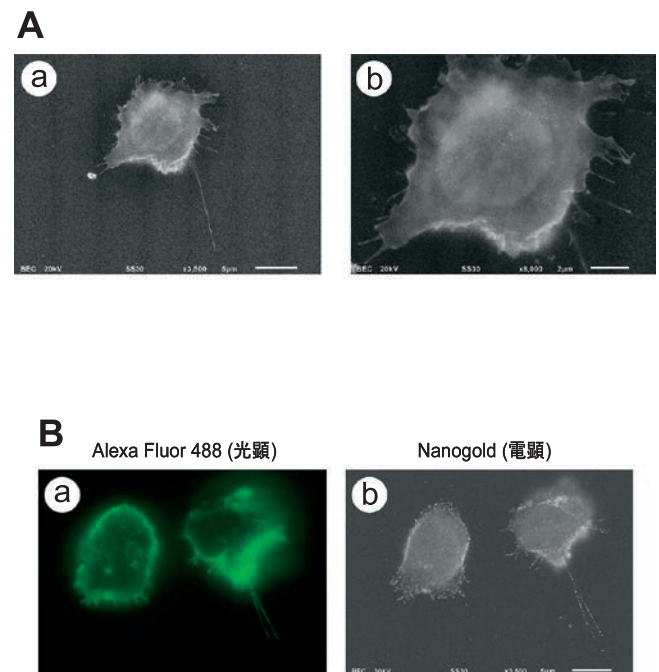


図2 ASEMによる光-電子相関顕微鏡法(correlative light and electron microscopy; CLEM)

A, 正荷電金ナノ粒子染色によるリンパ球の電子顕微鏡像。細胞表面の微細構造が観察された。スケールバーは5 μm (a) および2 μm (b)。B, 光-電子相関顕微鏡観察によるリンパ球におけるCD44の細胞表面分布。Alexa Fluor 488の蛍光(a)とNanogold (b)を、それぞれ光学顕微鏡と電子顕微鏡により検出した。スケールバーは5 μm。文献7より一部改変して掲載。

コントロール

M β CD処理

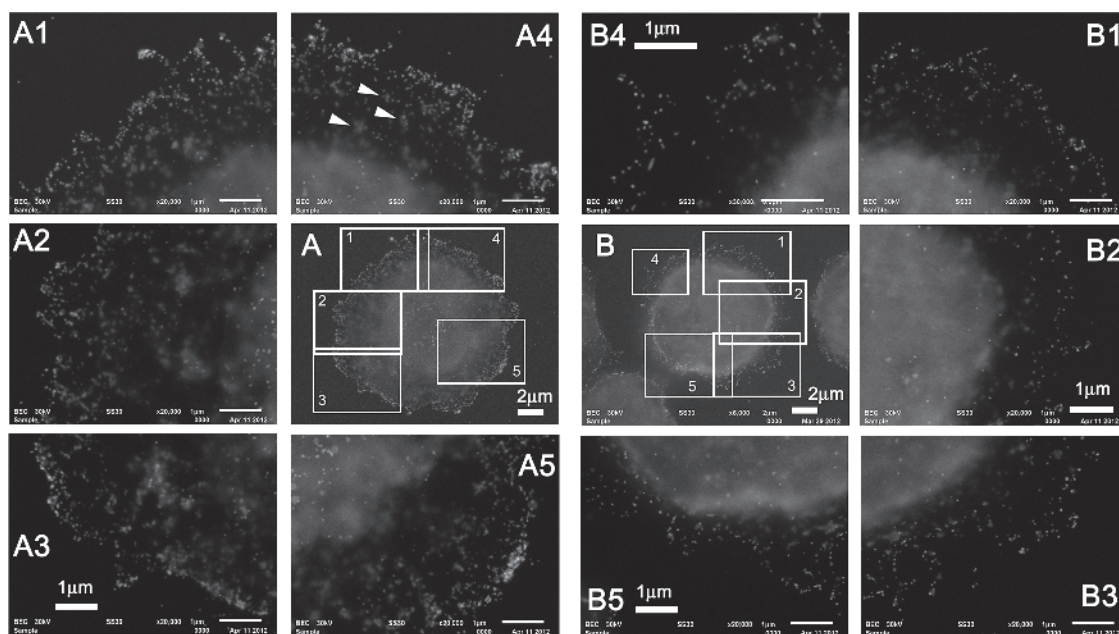
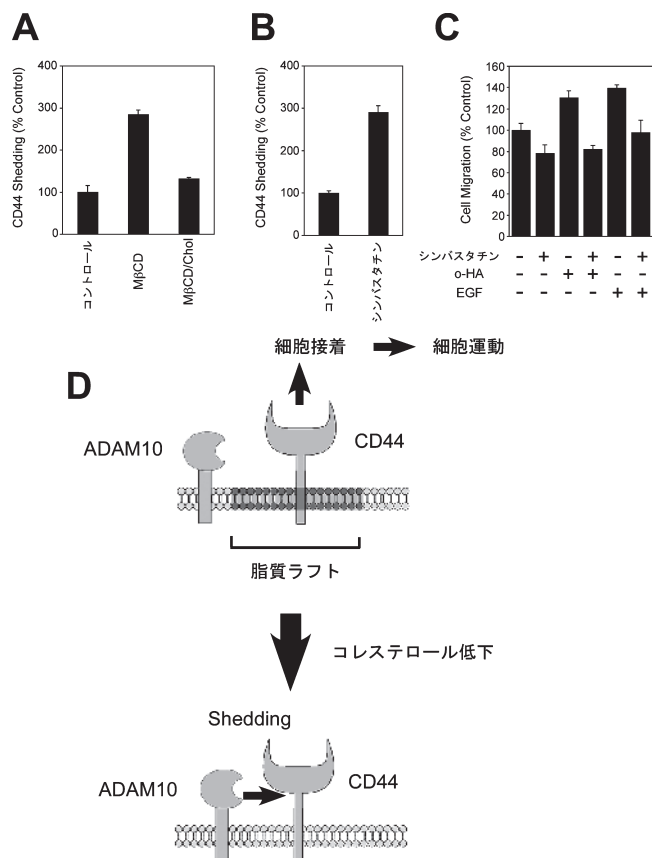


図3 ASEMにより明らかになった細胞表層におけるCD44の分布
リンパ球細胞株のコントロール処理細胞(A)とM β CD処理した細胞(B)のASEMによるCD44の免疫電子顕微鏡像。A1-A5, B1-B5は、それぞれA, Bの部分拡大像。スケールバーは2 μ m (A, B) および1 μ m (A1-A5, B1-B5)。文献8より一部改変して掲載。

は分散した分布を示すことがわかった²⁾。血球系細胞についても、ASEMを用いた免疫電子顕微鏡法により、脂質ラフト破壊によるCD44の細胞表面分布の変化が観察できた⁸⁾(図3)。



4. 脂質ラフトと細胞接着・細胞運動

脂質ラフトが種々の膜タンパク質の酵素切断と解離 (shedding) に関わることが報告されていることから⁹⁾、コレステロール低下により脂質ラフトを破壊することによる、CD44の局在、shedding、機能への影響が検討された。CD44は、Triton X-100 不溶性の含コレステロール膜マイクロドメイン (脂質ラフト) に存在し、M β CDの添加により、CD44 shedding が亢進した (図4A)。その上、コレステロールに結合し脂質ラフトを破壊する作用のあるマクロライド系抗生物質フィリピン (filipin) もまた、CD44 shedding を誘導した²⁾。CD44 shedding は ADAM ファミリーの膜型メタプロテアーゼ ADAM10 の活性に依存的であり、ADAM10 は Triton X-

図4 脂質ラフトと細胞運動

A, M β CDによるコレステロール除去効果で脂質ラフトを破壊することにより、CD44 shedding が亢進した。B, コレステロール合成阻害薬シンバスタチンのCD44 shedding に対する作用。C, シンバスタチンの細胞運動に対する作用。細胞をシンバスタチン存在あるいは非存在下で培養し、ヒアルロン酸オリゴ糖 (o-HA) あるいは上皮成長因子 (EGF) で処理した。D, 脂質ラフトによるがん細胞の接着・運動の制御機構の想定される模式図。文献9より一部改変して掲載。

100 可溶性 (非脂質ラフト) 画分に存在した²⁾. M β CD 依存性の CD44 shedding は, 合成メタロプロテアーゼ阻害剤 TAPI, ならびに内因性メタロプロテアーゼ阻害タンパク質である TIMP-1, および, ADAM10 に対する RNA 干渉 (RNAi) により抑制されたことから, ADAM10 がこの過程にかかわることが示唆された²⁾. また, 高コレステロール血症の治療に用いられるコレステロール合成阻害薬シンバスタチン (Simvastatin) の投与により, がん細胞の CD44 shedding が亢進し (図 4B), ヒアルロン酸基質上でのヒアルロン酸オリゴ糖あるいは EGF による運動性亢進が阻害されることが明らかになった (図 4C). これらの結果より, コレステロール低下による CD44 の膜ドメイン局在と shedding の操作が, 悪性腫瘍の進展に対する予防効果を有することが示唆される (図 4D)⁹⁾.

5. おわりに

以上の結果より, コレステロール低下による CD44 shedding 誘導の操作を通して, がん細胞運動の阻止への手段を提供することができると考えられる. 本研究により, 細胞接着制御の新地平が開け, がん浸潤・転移の阻止手段の開発に貢献できる. 今後, 脂質ラフトに代表される細胞膜ドメインの構造と機能の解明が進むことにより, 細胞ダイナミクスへの理解がさらに進展すると考えられる.

謝 辞

産業技術総合研究所・佐藤主税博士をはじめとする共同研究者の皆様に感謝申し上げます. 大気圧走査電子顕微鏡 (ASEM) について, 日本電子株式会社・須賀三雄氏, 西山英利氏に多大なるご協力をいただいた.

文 献

- 1) Murai, T., Miyauchi, T., Yanagida, T. and Sako, Y.: *Biochem. J.*, **395**, 65–71 (2006)
- 2) Murai, T., Maruyama, Y., Mio, K., Nishiyama, H., Suga, M. and Sato, C.: *J. Biol. Chem.*, **286**, 1999–2007 (2011)
- 3) Adler, E.M.: *Science Signal.*, **4**, ec24 (2011)
- 4) Simons, K. and Ikonen, E.: *Nature*, **387**, 569–572 (1997)
- 5) Nishiyama, H., Suga, M., Ogura, T., Maruyama, Y., Koizumi, M., Mio, K., Kitamura, S. and Sato, C.: *J. Struct. Biol.*, **169**, 438–449 (2010)
- 6) 海老原達彦, 村井稔幸, 西山英利, 佐藤真理, 須賀三雄, 佐藤主税: 顕微鏡, **48**, 107–112 (2013)
- 7) Murai, T., Sato, M., Nishiyama, H., Suga, M. and Sato, C.: *Int. J. Mol. Sci.*, **14**: 20809–20819 (2013)
- 8) Murai, T., Sato, C., Sato, M., Nishiyama, H., Suga, M., Mio, K. and Kawashima, H.: *J. Cell Sci.*, **126**: 3284–3294 (2013)
- 9) Murai, T.: *Int. J. Cell Biol.*, **2012**, 763283 (2012)