



## CLP36 and RIL recruit $\alpha$ -actinin-1 to stress fibers and differentially regulate stress fiber dynamics in F2408 fibroblasts

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-04-30 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 宮崎, 数史 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/2698">http://hdl.handle.net/10271/2698</a>

博士(医学) 宮崎 数史

## 論文題目

CLP36 and RIL recruit  $\alpha$ -actinin-1 to stress fibers and differentially regulate stress fiber dynamics in F2408 fibroblasts

(F2408 線維芽細胞において CLP36 と RIL は $\alpha$ -アクチニン-1 をストレスファイバーに動員しストレスファイバー動態を個別に調節する)

## 論文の内容の要旨

### [はじめに]

CLP36 は、N 末に PDZ ドメインを、C 末に LIM ドメインを持つ ALP/Enigma タンパク質ファミリーのメンバーであり、アクチン細胞骨格の中で足場タンパクとして働くことが知られている。我々は、これまでの研究で、絨毛癌由来の BeWo 細胞において、CLP36 を欠乏させるとストレスファイバーの消失を引き起こすことを明らかとしてきた。しかし、その後様々な細胞で検討を重ねると、必ずしも CLP36 のみの欠乏で、ストレスファイバーの消失が引き起こされるとは限らないことが明らかとなった。このことは、CLP36 の機能的な重要性が細胞の種類によって違うこと、また、CLP36 の機能は、他の ALP/Enigma タンパク質によって代償されうること示している。さらには、細胞種に応じて様々な ALP/Enigma タンパク質ファミリーが多様性を持って使い分けられていることが示唆された。そこで、本研究では、ALP/Enigma タンパク質のストレスファイバーへの関与の多様性を解明する端緒として、CLP36 に加えて ALP/Enigma ファミリータンパク質の他のメンバーである RIL を発現していることが確認されている F2408 線維芽細胞において、CLP36 と RIL がそれぞれどのようにストレスファイバーの動態、維持、構築に関与するかを検討することとした。

### [材料ならびに方法]

F2408 線維芽細胞を用い、RNAi 法により、CLP36 または RIL をノックダウンした細胞株、さらには、CLP36 と RIL 両者をダブルノックダウンした細胞株を樹立した。ストレスファイバー構成タンパク質の発現を RT-PCR とウエスタンブロッティングで確認した。CLP36 と $\alpha$ -アクチニン-1 の結合を免疫沈降法にて確認した。ストレスファイバーの動態の変化を検出するために、GFP-アクチン、GFP- $\alpha$ -アクチニン-1 を F2408 線維芽細胞に発現させ、タイムラプス顕微鏡を用いて評価した。ストレスファイバー構成タンパク質の細胞内局在を評価するために、CLP36、RIL、 $\alpha$ -アクチニン-1 等の抗体を用いて免疫蛍光染色を実施し、蛍光顕微鏡にて観察を行った。

### [結果]

1. F2408 線維芽細胞において CLP36 と RIL が発現していることを RT-PCR とウエスタンブロッティングにより確認した。さらに、免疫沈降法により、CLP36 とストレスファイバー架橋タンパクである $\alpha$ -アクチニン-1 が複合体を形成していることを示した。免疫染色により、CLP36 と RIL がストレスファイバー上に存在することを示した。

2. CLP36 と RIL を共にノックダウンすることにより、ストレスファイバーを持つ細胞の数は有意に減

少しした。

3. CLP36 ノックダウン細胞では、ストレスファイバーの方向性の消失が認められた。

4. 細胞の遊走速度を比較すると、CLP36 ノックダウン細胞で著しく低下し、また、RIL ノックダウン細胞では、コントロール細胞と比較して 1.5 倍と若干速い遊走速度を示した。一方、CLP36 と RIL をダブルノックダウンした細胞では、コントロール細胞と比較して4倍と極めて速い遊走速度を示した。

5. タイムラプスによる解析の結果、CLP36 は、ストレスファイバーの分解に必要であり、RIL は、ストレスファイバーの構造を安定化させる働きを持つことが明らかとなった。さらには、 $\alpha$ -アクチニン-1 は CLP36 または RIL との相互作用により、ストレスファイバーに動員されることが明らかとなった。

#### [考察]

ストレスファイバーは、細胞膜の接着点間の結合を担っており、細胞の運動能を規定し癌細胞の転移性にも密接に関与していることが知られている。今回の研究により、ALP/Enigma タンパク質ファミリーである CLP36 と RIL が、F2408 線維芽細胞のストレスファイバーの動態、維持、構築に多様性を持って働くことが明らかとなった。これまでに、RIL は強力な癌抑制遺伝子で、多様な癌細胞でメチル化により RIL 遺伝子発現が抑制されているという事が報告されている。今回の研究では、RIL と CLP36 を共にノックダウンした場合にのみ、ストレスファイバーが消失し細胞の運動性が著しく増強された。このことは、CLP36 と RIL を含めた ALP/Enigma タンパク質ファミリーの発現状況が、癌細胞の運動性や転移性を規定している可能性を示唆している。今後、様々な癌細胞において CLP36 と RIL を含めた ALP/Enigma タンパク質ファミリーの発現状況を検討し、様々な癌細胞の挙動と、ALP/Enigma タンパク質ファミリーの発現状況の関係を明らかにしていきたい。

#### [結論]

F2408 線維芽細胞において、CLP36 と RIL は、ストレスファイバーの動態、維持、構築に多様性を持って働くことが明らかとなった。