

論文要旨

Enhanced cell-substratum adhesion of E-cadherin-expressing cells is mediated by activation of the small GTPase protein Rac1

〔 E-カドヘリン発現細胞の示す基質への接着性増大には
低分子量 G タンパク質 Rac1 の活性化が関与する 〕

王 宇清

【序論および目的】

細胞と細胞外基質の接着は代謝変化、細胞骨格再構成や細胞外マトリックスと細胞表面容受体の結合などが関わっている複雑な過程である。インテグリンは一群の細胞膜糖蛋白で、 α と β 鎖のサブユニットからなるヘテロダイマーである。それらは細胞接着に関与する細胞外マトリックス糖蛋白のレセプターとして働く。Rho ファミリーは細胞骨格を制御する低分子量 G タンパク質であり、細胞内で GDP 結合型の不活性化型と GTP 結合型の活性化型の間を行き来して、様々な細胞変応の分子スイッチとして働いている。接着分子 E-カドヘリンは細胞膜貫通蛋白であり、カルシウムイオン依存性の細胞間接着分子で、ホモフィリックな結合により、細胞間接着を起こす。今回、E-カドヘリン発現細胞の基質への接着性が増大しているという現象を発見した。そこで、そのカドヘリンとインテグリンのクロストークを探る目的で研究を行った。特に低分子量 G タンパク質 Rho ファミリー Rac や Cdc42 がカドヘリン依存性の細胞間接着を制御しているという報告があったので、本研究では低分子量 G タンパク質 Rho ファミリー Rac の活性化によるカドヘリンを介した細胞と細胞外マトリックス間の接着の制御機構を解明することを目的とした。

【材料および方法】

1. E-カドヘリンの野生型、また、変異体 EC0 (E-カドヘリンの C 末端側細胞質ドメインをなくした変異体) と ED143A (カルシウム結合モチーフのアミノ酸のひとつである 134 番目のアスパラギン酸残基をアラニンに置換して細胞接着活性がなくなった変異体) のコンストラクトをそれぞれ繊維細胞に導入して、安定に発現している細胞株を樹立した。その細胞株を使って、細胞生物学と分子生物学の方法を用いて調べた。
2. IV型コラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外マトリックスタンパク質とポリリジンを細胞培養プレートにコーティングして、各細胞株の接着性を測定した。
3. インテグリンに対応する抗体を細胞に加えて、各細胞株の伸展状態を観察した。
4. Western blot の解析方法で、インテグリン α と β のサブユニットの発現量を定量した。
5. p21-activated kinase 活性型の Rac/Cdc42 結合する部位 (CRIB) を pGEX というベクターに組み換えて、GST 融合タンパク質 (GST-CRIB) として発現させ、これを精製し、GST pull-down という実験方法を用いて、各細胞株の Rac1 の活性化型の量を調べた。

【結 果】

1. 野生型 E-カドヘリン発現細胞は、IV型コラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外マトリックスタンパク質への接着性が顕著に増加した。増加した接着性はインテグリン抗体により阻害された。
2. ポリリジンコーティングした基質への接着は E-カドヘリンの発現の有無と関連がなかったため、インテグリンを介した特異的な接着が E-カドヘリンの発現により制御されることが分かった。
3. 野生型 E-カドヘリンと E-カドヘリン変異体を導入した細胞の接着性を調べた所、野生型 E-カドヘリンを発現させた時にのみ接着性が高くなった。
4. コラーゲン受容体 $\alpha 1$ と $\beta 1$ インテグリンの量は E-カドヘリン発現により変化しなかった。
5. 野生型 E-カドヘリン発現細胞においては、活性型 Rac の量が増加していた。

【結論及び考察】

以上の結果から、E-カドヘリン発現細胞の示す基質への接着性増大には低分子量 G タンパク質 Rac1 の活性化が関与することが示唆された。

(International Journal of Molecular Medicine 2006年 掲載予定)

論文審査の要旨

報告番号	医研第 616 号	氏名	王 宇清
審査委員	主 査	秋山 伸一	
	副 査	竹内 亨	宮田 篤郎

Enhanced cell-substratum adhesion of E-cadherin-expressing cells is mediated by activation of the small GTPase protein Rac1

(E-カドヘリン発現細胞の示す基質への接着性増大には低分子量 G タンパク質 Rac1 の活性化が関与する)

カドヘリンは、カルシウムイオン依存性の細胞間接着分子で、N末端側の細胞外ドメイン同士が結合することによって細胞間接着を起こす。代表的カドヘリンである E-カドヘリンは上皮細胞で発現している。インテグリン是一群の細胞膜糖タンパク質で、 α と β 鎖のサブユニットからなるヘテロダイマーである。それらは細胞接着に関与する細胞外マトリックス糖タンパク質のレセプターとして働く。Rac1 は低分子量 G タンパク質 Rho ファミリーのひとつで、細胞内で GDP 結合型の不活性化型と GTP 結合型の活性化型の間を行き来して、細胞骨格を制御するなど、様々な細胞機能の調節に重要な役割を果たしている。特に最近 Rac や Cdc42 がカドヘリン依存性の細胞間接着を制御しているという報告があった。今回、野生型 E-カドヘリン発現細胞の基質への接着性が増大しているという現象を発見した。そこで、E-カドヘリン発現細胞と細胞外マトリックス間接着の制御機構を解明する目的で研究を行った。

本研究では、接着アッセイ、プル・ダウンアッセイ、ウェスタンブロットなどの研究手法を用いて、野生型 E-カドヘリンを発現させたマウス線維芽細胞 L 細胞において、細胞と細胞外マトリックスタンパク質への接着性が顕著に増加した現象について調べた。

本研究で得られた新知見は次の通りである。

1. 野生型 E-カドヘリン発現細胞は、IV型コラーゲンやフィブロネクチンなどの細胞外マトリックスタンパク質への接着性が顕著に増加した。増加した接着性はインテグリン抗体により阻害されたので、その接着性はインテグリンを介することが分かった。
2. ポリリジンコーティングした基質への接着は E-カドヘリンの発現の有無と関連がなかったため、インテグリンを介した特異的な接着が E-カドヘリンの発現により制御されることが分かった。
3. 野生型 E-カドヘリンを導入した細胞のみ接着性が高くなった。
4. コラーゲン受容体であるインテグリンのうち $\alpha 1$ と $\beta 1$ サブユニットの量は E-カドヘリン発現により変化しなかった。
5. 野生型 E-カドヘリン発現細胞においては、活性型 Rac の量が増加していた。

本研究は、E-カドヘリン発現細胞の示す基質への接着性増大には低分子量 G タンパク質 Rac1 の活性化が関与することを明らかにしたもので、博士の学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第 616 号	氏名	王 宇清
審査委員	主 査	秋山 伸一	
	副 査	竹内 亨	宮田 篤郎

主査および副査の3名は、平成18年2月21日、学位請求者 王 宇清 君に対して、論文の内容について質疑応答を行うと共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

- 質問 1) 細胞としてマウス線維芽細胞の L 細胞を使用したのはなぜか？
 (回答) 多くの細胞はそれ自身の(内在性)カドヘリンを発現しているが、L 細胞は発現していないので使用した。
- 質問 2) IV 型コラーゲンを使用して実験をおこなったのは何故か？
 (回答) I 型コラーゲンやフィブロネクチン、ラミニン等も使用したが、IV 型コラーゲンの時に大きな差異が認められたので、論文ではその結果を提示した。
- 質問 3) 今回はカドヘリンの発現による細胞外マトリックスへの接着の変化を調べているが、細胞の増殖性に変化はなかったか？
 (回答) 増殖性に変化は認められなかった。
- 質問 4) 培養皿に播く細胞の数を減らして、E-カドヘリンが接着分子として機能できないようにしたらどうなるか？
 (回答) そのような条件下では調べていない。
- 質問 5) トリプシンで処理した時、カドヘリンやインテグリンはどうなるのか？
 (回答) カドヘリンは分解されるが、インテグリンは分解されずに残る。
- 質問 6) E-カドヘリンを介さずに Rac1 の活性化は可能か？その効果は？
 (回答) 文献によれば、Rac1 の活性化は可能で、その結果細胞の接着が増大すると報告されている。
- 質問 7) E-カドヘリン抗体を用いると、細胞と ECM との接着性の増大が阻害されるのではないのですか？すなわち、インテグリンを介した接着性の増大が阻害されるのではないのですか？
 (回答) E-カドヘリン抗体を用いて、E-カドヘリン依存性の細胞間接着が阻害されたが、細胞と ECM との接着性を調べなかった。
- 質問 8) インテグリンとして $\alpha 1$ と $\beta 1$ サブユニットを調べているが、IV 型コラーゲンに結合するインテグリンは他にないのか？
 (回答) $\alpha 2$ サブユニット等、他にあるが、抗体の入手ができなかったので、調べられなかった。

質問 9) Rac1 以外の G タンパク質は調べたか？

(回答) Rho, Cdc42 について調べようとしたが、Cdc42 は同定のための抗体に適切なものがなく、Rho はプル・ダウンアッセイに使う融合タンパク質が十分量調製できなかつたので、Rac1 を中心に調べた。

質問 10) Rac1 活性化の結果、細胞の増殖に変化がみられなかつたか？

(回答) 大きな変化は認められなかつた。

質問 11) E-カドヘリンを発現させたことにより Rac1 が活性化されるメカニズムは何か？

(回答) よく解ってはいないが、PI3 キナーゼが関与しているという報告がある。

質問 12) Rac1 の活性化がマトリックスへの接着を上昇させるという証拠はあるか？

(回答) ドミナントポジティブな Rac1 (活性型) を発現させて、その効果を見ようと思ったが、時間の関係でそこまでできなかつた。

質問 13) カドヘリンの発現部位はどこか？

(回答) 蛍光抗体法による観察では、細胞表面、特に細胞同士が接着している部位に濃縮されている。

質問 14) E-カドヘリン発現細胞では、インテグリンが cluster を形成していたか？

(回答) 今回は検討していなかつた。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。