

論文内容要旨

カルシウム非依存性の免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞間接着分子ネクチンは、互いの細胞のネクチン同士が結合することで、カルシウム依存性の接着分子 E-カドヘリンを接着部位に集積させ、さらに E-カドヘリンと協調的にアドヘレンスジャンクション (AJ) を形成することが報告されている。加えて、ネクチン同士の結合は、低分子量 G タンパク質である Cdc 42 および Rac を活性化することで、フィロポディア (糸状仮足)、ラメリポディア (葉状仮足) と呼ばれるアクチン構造を形成することも報告されている。本研究では、MDCK イヌ腎上皮細胞とマウス L 線維芽細胞において、ネクチンがどのような機序で、Cdc 42, Rac を活性化するのかを、特に Cdc 42 を中心に検討した。

ネクチン-1 を stable に強制発現させたネクチン-1-MDCK 細胞とネクチン-1-L 細胞は、ネクチン-1 と結合するネクチン-3 の細胞外領域と IgG の Fc ドメインの融合タンパク質; Nef-3 をコートしたカバーガラス (Nef-3 プレート) 上で、フィロポディア, ラメリポディアを形成する。ネクチンによる Src ファミリーキナーゼの活性化を、Src ファミリーに特異的な阻害剤 PP2 の添加や Csk の発現で抑制すると、フィロポディア, ラメリポディアの形成は阻害された。このとき、Cdc 42, Rac の活性化が抑制されていることも確認できた。この PP2 の効果は、Cdc 42, Rac のドミナントアクティブ変異体の発現により抑制された。一方、ネクチン-1-L 細胞と Nef-3 をコートしたビーズ (Nef-3 ビーズ) の接着部位に Src ファミリーの一つ、c-Src は集積し、局所的にチロシンリン酸化をうけ活性化していることが示された。c-Src のドミナントネガティブ変異体の発現によっても、フィロポディア, ラメリポディアの形成は阻害された。以上の知見からはネクチンによる Cdc 42, Rac の活性化のシグナル伝達経路において、少なくとも c-Src の関与が示唆された。

さらに c-Src の下流にあるタンパク質について検討した。FRG は c-Src によるチロシンリン酸化により活性化することが報告されている、Cdc 42 特異的な GDP/GTP 交換因子 (GEF) である。ネクチン-1-L 細胞において、この FRG のドミナントネガティブ変異体を強制発現させたり、RNA 干渉により FRG の発現を特異的に抑制することで、Nef-3 プレート上でのフィロポディア, ラメリポディアの形成は抑制された。FRG は Cdc 42 特異的であるが、その抑制により、Rac の活性化によって形成されるラメリポディアも形成されなかった。これは、以前に Cdc 42 の活性化は Rac の活性化に必要であるが、Rac の活性化は Cdc 42 の活性化には必要でないことが報告されたことに一致する。また、ネクチン-1-L 細胞と Nef-3 ビーズの接着部位に FRG は集積し、ネクチン同士の結合特異的に FRG はチロシンリン酸化を受け、Cdc 42 に対する GEF 活性を示した。以上の知見からは、ネクチンから c-Src を介して、Cdc 42, Rac へと至るシグナル伝達の

系への、FRG の関与が示唆された。

続いて Src ファミリーの細胞間接着部位への作用について検討した。wild type の MDCK 細胞とネクチン-1-MDCK 細胞において、E-カドヘリンは、細胞間接着部位に集積している。これらの細胞を $2\mu\text{M}$ の低カルシウム濃度で 2 時間培養すると、E-カドヘリンは、細胞膜上に認められなくなる。さらにこれらの細胞を 2mM の通常カルシウム濃度に戻すと、再び E-カドヘリンは、細胞間接着部位に集積する。今回、E-カドヘリンの細胞間への集積により AJ の形成を評価したとき、PP2 によって Src ファミリーの作用を阻害すると AJ の形成は抑制されることが示された。また、Cdc42 のドミナントアクティブ変異体を強制発現させると、AJ の形成速度は速まることが明らかになった。

以上の結果より、ネクチンを起点とし、c-Src-FRG-Cdc42-Rac というシグナル伝達を介して、アクチン構造のフィロポディアとラメリポディアは形成されることが明らかになった。また、c-Src, Cdc42 の活性化を介して細胞間接着が形成されることが示され、ネクチン-c-Src-FRG-Cdc42 のシグナル伝達は、細胞間接着の形成においても重要な働きをしている可能性が示唆された。

審査結果の要旨

細胞間接着は細胞の極性形成に関与し、それによる分化や生理機能を可能とする上皮細胞の基本的特性である。細胞接着には adherens junction (AJs) と呼ばれる部分が存在し、接着形成の起点となっている。本研究は AJs 形成に重要であるネクチン（免疫グロブリンスーパーファミリー細胞間接着分子）がフィロポディアやラメリポディアなどのアクチン構造を形成する際に、低分子量 G タンパク質の Cdc42 や Rac を介して、いかにシグナル伝達系を形成し関与するかを検討したものである。

A. ネクチン-1 強制発現のネクチン-1-MDCK 細胞（イヌ腎上皮細胞）とネクチン-1-L 細胞（マウス L 線維芽細胞）が、Nef-3 プレート（ネクチン-1 結合性ネクチン-3 細胞外領域と Fc ドメインの融合タンパク Nef-3 をコートしたカバーガラス）上で、フィロポディア、ラメリポディアを形成する系を評価に用い、次の結果を得た。

- ① ネクチンによる Src ファミリーキナーゼ活性化を、PP2（Src ファミリー特異的阻害剤）添加や Csk 発現で抑制すると、フィロポディア、ラメリポディア形成が阻害され、Cdc42, Rac の活性化も抑制された。
- ② ネクチン-1-L 細胞と Nef-3 コートビーズの接着部位に c-Src は集積し、局所的にチロシンリン酸化をうけ活性化している。c-Src ドミナントネガティブ変異体発現では、フィロポディア、ラメリポディア形成が阻害された。
- ③ FRG は c-Src 下流でチロシンリン酸化で活性化される、Cdc42 特異的 GDP/GTP 交換因子 (GEF) である。FRG ドミナントネガティブ変異体の強制発現や RNA 干渉による FRG 発現の抑制により、Nef-3 プレート上でのフィロポディア形成と、さらに Rac の活性化によるラメリポディア形成も抑制された。
- ④ ネクチン-1-L 細胞と Nef-3 ビーズ接着部位に FRG は集積し、ネクチン相互の結合特異的に FRG はチロシンリン酸化を受け、Cdc42 に対する GEF 活性を示した。

B. wild type MDCK 細胞とネクチン-1-MDCK 細胞において、E-カドヘリンは Ca^{2+} 依存性に細胞間接着部位に集積している。 Ca^{2+} 濃度を低濃度から通常濃度に戻し、E-カドヘリンの再集積を観察する系で、AJs 形成を評価し次の結果をえた。

- ⑤ PP2 で Src の作用を阻害すると AJs の形成は抑制された。一方、Cdc42 の活性化型変異体を強制発現させると、AJs の形成速度は速まった。

本研究は、ネクチンを起点とし、c-Src-FRG-Cdc42-Rac というシグナル伝達を介して、アクチン構造のフィロポディアとラメリポディアが形成されることを明らかにし、c-Src, Cdc42 活性化が細胞間接着に必要なことを示した。すなわち、細胞間接着分子から、細胞間接着形成へと至る新たなシグナル伝達系を示しており、優れて学位に値する。