

| | |
|---------|--|
| 氏名・(本籍) | ひら た ひろ あき 平 田 宏 聡 |
| 学位の種類 | 博士(理学) |
| 学位記番号 | 理博第2004号 |
| 学位授与年月日 | 平成15年3月24日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項該当 |
| 研究科, 専攻 | 東北大学大学院理学研究科(博士課程)物理学専攻 |
| 学位論文題目 | 細胞接着タンパク質インテグリンの細胞膜上ダイナミクス: 単離基底側細胞膜を用いたインテグリン分布調節機構の研究 |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 斉 宮 清四郎 教授 寺 崎 治, 大 木 和 夫 助教授 宮 田 英 威, 早 川 美 徳 |

論 文 目 次

| | |
|--|-----|
| 第1章 序論 | |
| 1・1 研究の背景と目的 | 1 |
| 1・2 本論文の構成 | 6 |
| 第2章 インテグリン分布への細胞外側・細胞質側構造の寄与—開放底膜系を用いた評価 | |
| 2・1 本章の背景と目的 | 8 |
| 2・2 材料と方法 | 9 |
| 2・3 結果 | 14 |
| 2・4 考察 | 24 |
| 第3章 細胞底膜凹凸形成機構とインテグリン分布への寄与 | |
| 3・1 本章の背景と目的 | 32 |
| 3・2 材料と方法 | 33 |
| 3・3 結果 | 41 |
| 3・4 考察 | 50 |
| 第4章 細胞膜上でのインテグリン単分子運動の可視化の試み | |
| 4・1 本章の背景と目的 | 55 |
| 4・2 材料と方法 | 56 |
| 4・3 結果 | 59 |
| 4・4 考察 | 64 |
| 第5章 結論 | 73 |
| 付録 ストレスファイバー構造の安定性について | 75 |
| 謝辞 | 78 |
| 図 | 79 |
| 参考文献 | 123 |

論文内容要旨

本論文は、膜貫通タンパク質であり細胞-基盤間の接着に主要な役割を果たすインテグリン分子の、細胞膜上における分布の調節機構およびダイナミクスについて進めてきた研究をまとめたものである。

本研究ではインテグリン分子の細胞膜上における分布に及ぼす細胞外マトリックス及びアクチン細胞骨格系タンパク質の寄与を調べた。このために、本研究では、基盤上に接着をした細胞から細胞膜のうち基盤に面した側である細胞底膜のみを取り出した単純な系（開放底膜系と呼ぶ）を作製した。この開放底膜系には、細胞底膜に貫通している $\alpha_5\beta_1$ インテグリン分子と、その特異的リガンドであり細胞外マトリックスの一種でもあるフィブロネクチンの繊維、更にはアクチンフィラメントの束であり、集積したインテグリン分子と細胞質側で結合しているとされているストレスファイバー構造が存在していた。基盤上に播種後15時間培養し固定したインタクト細胞を免疫蛍光染色すると、フィブロネクチン繊維はストレスファイバーの端から外側に長く伸びていたが、そのレセプターである $\alpha_5\beta_1$ インテグリン分子はストレスファイバーの端にのみ集積していた。一方、開放底膜系では $\alpha_5\beta_1$ インテグリンはフィブロネクチン繊維の全長にわたって集積し、ストレスファイバー端のみへの集積様態が消失した。集積したインテグリンとストレスファイバーとの間の架橋タンパク質と想定されてきたタリンは、開放底膜系においてもインタクト細胞においてと同様に分布しており、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの集積をストレスファイバー端のみに限定する機能はもっていないようである。架橋機能が想定されてきたもうひとつのタンパク質である α -アクチニンも、開放底膜系ではその大部分が消失をしていた。これらの結果から、インタクト細胞における $\alpha_5\beta_1$ インテグリンの分布は、フィブロネクチン繊維の分布によってのみではなく、恐らく α -アクチニンを含む機構によって調節されていることが示唆された。また、2価カチオンのキレート処理により開放底膜系上での $\alpha_5\beta_1$ インテグリン分子の集積は消失したが、この際ストレスファイバー構造は開放底膜系上に残ったままであった。このことは、集積したインテグリン分子がストレスファイバーと細胞膜との結合を担う唯一の因子ではないということを示唆するものである。

本研究ではまた、細胞底膜の立体形状が形成される機構と、それがインテグリン分子の細胞膜上分布に及ぼす影響について、エバネセント波励起蛍光顕微鏡を用いて調べた。平面培養基盤上に播種した細胞の細胞底膜は、細胞の伸展に伴って、一旦平らに近くなった後（播種後約4時間）、基盤への筋状の接近部を残して基盤から離れるようになった（播種後約6~8時間）。播種後24時間までに細胞底膜は焦点接着部以外では基盤から約100 nm離れた。このような十分伸展した細胞ではストレスファイバーが焦点接着部から基盤に対して斜めに傾いて配向していた。アクトミオシンの阻害剤であるブタンジオンモノキシムあるいはチューブリン重合阻害剤であるコルヒチンを添加した培地中で培養した細胞では細胞底膜の基盤からの解離とストレスファイバーの基盤に対する傾きが抑制されたことから、細胞底膜の立体形状の形成にはアクトミオシン相互作用による収縮力の発生と微小管構造の形成が重要であるということが示唆された。細胞底膜のこのような立体形状が、 $\alpha_5\beta_1$ インテグリン分子の細胞膜上での分布調節に関わっている可能性について検証した。上記のようにインタクト細胞では $\alpha_5\beta_1$ インテグリン集積がフィブロネクチン繊維の分布と完全には一致しなかったが、細胞底膜の立体形状によって細胞底膜の基盤接近部以外では $\alpha_5\beta_1$ インテグリン分子がフィブロネクチン繊維と接触できないという可能性が考えられる。しかしながら、フィブロネクチン繊維は必ずしもその全長にわたって基盤表面に吸着している訳ではなく、むしろ細胞底膜に沿っているようであった。このことから、細胞底膜の立体形状が $\alpha_5\beta_1$ インテグリン分子の細胞膜上分布を調節しているという可能性は考えにくい。

更に本研究では、細胞膜上における α_5 インテグリン分子の1ないし数分子単位の運動の可視化と、その

細胞膜内での側方拡散係数の測定を試みた。ゲルゾリン処理によりアクチンフィラメントを解体した開放底膜系に、 α_5 インテグリンの細胞質ドメインに対する一次抗体を処理したうえで、1ビーズあたり平均2分子の二次抗体を共有結合させた直径100 nmの蛍光ポリスチレンビーズを付与した。このような処理後、2価カチオンのキレート処理を行った開放底膜系上で、 α_5 インテグリン結合蛍光ビーズが二次元運動する様子を、ビデオレート、100 nmの時空間分解能でとらえることができた。二次元運動している α_5 インテグリン結合蛍光ビーズの多くは、その運動が差渡し150–800 nmの領域に制限されており、その領域内ではブラウン運動を行っていた。ブラウン運動している領域内での α_5 インテグリン結合蛍光ビーズの側方拡散係数は 1.3×10^{-10} から 2.0×10^{-9} cm²/sの範囲にあり、このうち α_5 インテグリンが1分子のみ結合していると推定される蛍光ビーズの側方拡散係数値は約 2×10^{-9} cm²/sであった。

論文審査の結果の要旨

細胞と細胞外マトリックスタンパク質との接着や、細胞骨格構造の一つであるストレスファイバーの維持は主に細胞接着構造が担う。本論文は、この接着構造の形成と維持に重要な役割を果たす膜貫通タンパク質インテグリン分子の細胞膜上における分布の調節機構およびそのダイナミクス解明を目的として申請者が進めてきた研究をまとめたものである。

論文の第一章ではインテグリン分子の細胞接着における機能などに関する過去の研究を概観している。第二章ではインテグリン分子の細胞膜上分布に細胞外マトリックスタンパク質及びストレスファイバーが及ぼす影響に関する研究の結果を述べている。第三章では細胞底膜の立体形状が形成される機構と、それがインテグリン分子の細胞膜上分布に及ぼす影響について、エバネセント波励起蛍光顕微鏡を用いて研究した結果をまとめている。第四章ではインテグリン1~数分子単位の細胞膜上における側方拡散係数測定の結果をまとめている。第五章では本研究の細胞生物物理学分野における意義と位置づけに関して述べている。

申請者の研究はインテグリン分子のダイナミクスを研究するため申請者が格段に発展させた「開放底膜系」（細胞膜のうち、下面である底膜部のみが基盤と接着したもの）に接着構造の観察に適したエバネセント波励起蛍光顕微鏡観察法を応用して展開されており非常に多彩である。本研究で得られた新たな知見は以下の通り。(1) インテグリン分子の一種である $\alpha_5\beta_1$ と、その特異的リガンドであるフィブロネクチン繊維との相互作用を開放底膜系を用いて蛍光抗体法により調べた結果、インテグリンが細胞接着部に集積せずともストレスファイバーは開放底膜に結合したままであることが明らかとなった。これは現在受け入れられている、「インテグリンの集積を伴ったストレスファイバー構造の維持」という、細胞生物学の教科書でおなじみの描像に疑問を投げかけ、インテグリン以外の分子が細胞-基盤間接着に果たす役割を強く示唆する重要な結果である。(2) 細胞中でインテグリンを細胞接着部に局在させるのは α アクチニンという分子である可能性の高いことを示した。(3) インテグリンをその一次抗体を介して直径100ナノメートルの蛍光性プラスチックビーズでラベルし、ビーズの運動を開放底膜中で追跡・解析した結果インテグリンの細胞膜中での拡散係数を $2 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ と決定した。

本研究は新しい手法を導入することで細胞接着の研究において従来より一歩進んだ理解を促した。上述の結果は申請者が自立した研究者として活動していくのに必要な高度の研究能力ならびに学識を備えていることを示すものである。従って平田宏聡氏提出の博士論文は博士（理学）の学位論文として合格と認める。