

氏 名	蘇 莉
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	医博第 2630 号
学位授与の日付	平成 15 年 5 月 23 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	医学研究科病理専攻
学位論文題目	AF-6 controls integrin-mediated cell adhesion by regulating Rap1 activation through the specific recruitment of Rap1GTP and SPA-1 (AF-6はRap1GTPとSPA-1の特異的会合を介したRap1活性化調節によりインテグリン依存性の細胞接着を制御する)
論文調査委員	(主査) 教授 成宮 周 教授 月田承一郎 教授 湊 長博

論 文 内 容 の 要 旨

これまで活性化Rap1がインテグリンを直接活性化して強い細胞接着を誘導すること、およびRap1GTPase活性化蛋白(GAP)であるSPA-1がその活性を介し細胞接着を負に調節していることが明らかになっている。今回、著者はこのSPA-1を介する細胞接着制御の分子機構の詳細について解析するために、SPA-1の細胞内会合分子の同定を行った。Yeast two hybrid法によるスクリーニングの結果、tight junction形成制御に関与するAF-6が単離され、その会合は293T細胞を用いたSPA-1とAF-6の共発現系において、免疫沈降法により確認された。さらに両分子の会合は正常マウスの胸腺細胞においても確認されたことから、生理的なものであることが示唆された。両分子の会合に必要なドメイン解析を行ったところ、SPA-1分子はそのGAP catalyticドメイン(GRD)の中にある内在性PDZリガンドmotifを介し、AF-6のPDZドメインと結合することが示唆された。このmotifを持っている他のRap1GAPの一つであるrapGAP1もSPA-1と同様にAF-6と会合することが確認された。活性型Rap1ミュータント(RapV12)はAF-6のN末端に存在するRas結合ドメイン(RBD)でAF-6と会合することが報告されているが、免疫沈降実験からさらにRapV12がAF-6を介しSPA-1と同一複合体として存在しうることが強く示唆された。このことは、HeLa細胞を用いた免疫染色により、SPA-1とRapV12がAF-6が局在する細胞接着部位にco-localizationすることからも確認された。HeLa tet-off systemを用いて、AF-6を発現させると、SPA-1による活性型Rap1の不活性化が亢進すること、さらにそれに伴いHeLa細胞の細胞接着能が低下することが明らかとなった。以上の結果から、AF-6は細胞内で活性化型Rap1とSPA-1の橋渡しとして働くことにより、SPA-1によるRap1の不活性化を促進し、integrinに対する細胞接着能を低下させているものと考えられる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者は、Rap1GTPase活性化蛋白(GAP)であるSPA-1を介する細胞接着制御の分子機構の詳細について解析の実験を行った。Yeast two hybrid法で、SPA-1と会合する分子としてAF-6が単離され、その会合は293T細胞にSPA-1とAF-6を共に発現させ、免疫沈降法により確認された。さらに両分子の会合はマウスの胸腺細胞においても確認された。両分子の会合に必要なドメイン解析を行ったところ、SPA-1のGAP catalyticドメイン(GRD)の中にある内在性PDZリガンドmotifを介し、AF-6のPDZドメインと結合することが示唆された。このmotifを持っている他のRap1GAPの一つであるrapGAP1もSPA-1と同様にAF-6と会合することが確認された。免疫沈降実験から活性型Rap1ミュータントRapV12はAF-6を介しSPA-1と同一複合体として存在しうることがわかれた。このことは、HeLa細胞を用いた免疫染色により、SPA-1とRapV12がAF-6が局在する細胞接着部位にco-localizationすることからも確認された。HeLa tet-off systemを用いてAF-6を発現させると、SPA-1による活性型Rap1の不活性化が亢進すること、さらにそれに伴いHeLa細胞の細胞接着能が低下することが明らかとなった。以上の結果から、AF-6は細胞内で活性化型Rap1とSPA-1の橋渡しとして働くことにより、SPA-1によるRap1の不活性化を促進し、integrinに対する細胞接着能を低下させているものと考えられる。

以上の研究は、AF-6の新しい機能を明らかにしたものであり、細胞生物学および免疫学研究に貢献するところが大きい。従って、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。なお、本学位授与申請者は、平成15年3月6日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。