

Title	Analysis of the mechanism of cell adhesion and actin organisation regulated by vinexin family proteins(Abstract_要旨)
Author(s)	Takahashi, Honami
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2008-05-23
URL	http://hdl.handle.net/2433/123961
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	none

(論文内容の要旨)

血球を除くほとんどすべての動物細胞は、コラーゲンなどの細胞外基質と接着し、組織を形作っている。この細胞と細胞外基質との接着はいずれも膜貫通型接着分子であるインテグリンを介しているが、接着構造にはfocal adhesion (FA) とfibrillar adhesion (FB)の2種類が存在し、異なる役割を持つことが明らかとなりつつある。FAは細胞増殖や細胞運動を制御しており、FAの構成因子や制御因子の異常は、がんや発生異常などを引き起こす。一方、FBはフィブロネクチンの繊維化を介して細胞外微小環境を調節し、形態形成や足場依存的増殖に関与している。しかし、FAとFBがいかんして形成され、制御されているかの分子メカニズムについては不明である。

FA構成タンパク質のひとつであるビネキシンには、転写開始点の違いにより生じる2種類のタンパク質、ビネキシン α とビネキシン β がある。いずれもFAに局在し、FAタンパク質ビンキュリンに結合する。ビネキシン α の強制発現は、マウス繊維芽細胞においてアクチンをFAに集積させることがわかっているがそのメカニズムは不明である。本研究では、FAとFBの形成と調節の分子メカニズムを明らかにするために、ビネキシンのFAへの局在化機構とビネキシンによるアクチン細胞骨格制御機構、FBの形成制御機構について解析した。本論文の主な内容は以下のとおりである。

ビネキシン α とビネキシン β はいずれもFAに局在し、ビンキュリンに結合することがわかっているが、FAへの局在化機構、ビンキュリンとの結合の生理的意義については不明であった。ビンキュリンは、自身の分子内相互作用によりその活性が制御されている。分子内相互作用が失われるとビンキュリンは活性型となり、アクチン細胞骨格をはじめとするさまざまなFAタンパク質と結合し、FAの形成を促進する。第1章では、まずビネキシンとビンキュリンの精製タンパク質を用い、表面プラズモン共鳴法により、両者間の結合能を解析した。ビネキシン β はビンキュリンの活性型を模した変異体に対し、不活性型の約3倍の親和性で結合することを明らかにした。さらに、細胞内におけるビネキシンとビンキュリンの結合の役割について、免疫染色法により解析した。その結果、ビンキュリンと結合できないビネキシン β の変異体は、FAへの局在が大きく減少していることを示した。さらに、ビンキュリン欠損細胞においてもビネキシン β のFAへの局在が減少し、細胞質全体に拡散して存在していることを明らかにした。一方、ビネキシン α は、ビンキュリンの非存在下で、FAだけでなくそれとは別の繊維状構造に局在することを示し、この繊維状構造にFB構成因子が濃縮していることを明らかにした。以上のことから、ビネキシン β はビンキュリンと結合することでFAに局在すること、一方でビネキシン α は、ビンキュリン非依存的にFBにも局在できることが示唆された。

マウス繊維芽細胞におけるビネキシン α の強制発現は、FAにアクチンを大量に集積させ、FAを増大させることがこれまでにわかっている。このメカニズムを

解明するため、第2章では細胞を界面活性剤処理することで、細胞骨格結合成分のみを免疫染色法により可視化する方法を確立した。この方法により、細胞内における特定タンパク質とアクチン細胞骨格との結合状態と細胞内局在の情報を同時に入手できる。その結果、界面活性剤処理後もビネキシン α はFAへ濃縮したままであり、FAでアクチン細胞骨格と結合していることが示唆された。一方、ビネキシン β はFAから消失しており、細胞骨格成分との結合は検出できなかった。また、ビネキシン α の発現によってFAに集積したアクチンは界面活性剤処理後も強く濃縮したままであることが分かった。ほかの主要な内在性のFAタンパク質のうち、FAKおよびパキシリンはFAへの局在に関して界面活性剤感受性であったが、ビンキュリンは一部耐性、つまり一部はFAで細胞骨格と強く結合していた。さらに、ビネキシン α を強制発現させた細胞では、より多くのビンキュリンが界面活性剤耐性となりFAに濃縮した。また逆に、内在性のビネキシンの発現をRNA干渉法により抑制すると、界面活性剤耐性のビンキュリンが減少した。以上のことから、ビネキシン α はFAにおいて、ビンキュリンの細胞骨格との結合を強化し、アクチンと共局在させていることを見出した。活性型ビンキュリンがアクチン細胞骨格と結合できることを考え合わせると、本研究によりビネキシンは、活性型すなわちアクチン結合型ビンキュリンをFAにとどめることでアクチンをFAに集積させていると考えられ、FAの動態の制御機構の解明につながることを期待できる。

第1章においてビンキュリン非存在下ではビネキシン α がFBにも局在しうることが明らかとなった。そこで、第3章ではFB形成におけるビネキシンの役割を明らかにするため、ビネキシンのノックアウトマウスより不死化繊維芽細胞(MEF; mouse embryonic fibroblast)を樹立した。ビネキシンのノックアウトMEFにおいて、FBの構成因子 α 5インテグリンとフィブロネクチンの繊維化が増大していることを明らかにした。このとき、FBの裏打ちタンパク質であるテンシンのFBへの局在化も促進されていた。興味深いことに、ビネキシンのノックアウトMEFにおいて、ビネキシンファミリータンパク質のひとつであるCAP/ポンシンの発現が増大しており、この増大したCAP/ポンシンの発現を抑制するとFBの形成およびフィブロネクチンの繊維化が阻害された。さらに、ビネキシンとCAP/ポンシンはいずれもテンシンと結合することが分かった。以上のことから、ビネキシンファミリータンパク質、とくにCAP/ポンシンは、テンシンを介して、FB形成とフィブロネクチンの繊維化を制御していると考えられる。フィブロネクチンの繊維化はがん細胞の特徴である細胞増殖の足場非依存性に深く関わることから、本研究の成果は細胞のがん化機構の解明に大きく貢献することが期待できる。

(論文審査の結果の要旨)

動物細胞と細胞外基質との接着は、発生過程、創傷治癒、細胞の増殖、生存など、生体内の様々な過程に重要な役割を果たしており、その異常は癌などの疾病と深く関わっている。最近細胞接着には2種類の接着構造focal adhesion (FA) とfibrillar adhesion (FB)が存在することが分かり、それぞれが細胞の増殖や生存、運動に異なる役割を持つことが分かりつつある。しかし、それぞれの接着構造の形成過程やどのようにして2種類の接着構造が作り分けられているかについては良くわかっていない。本論文は、FAの動態制御における接着領域裏打ちタンパク質ビネキシンの役割、特にビンキュリンとの相互作用の意義について明らかにしたものである。さらにビネキシンとビネキシンファミリー分子CAP/ポンシンが、FAとFBの2つの接着構造のいずれを形成するかの鍵となる分子である可能性を示した。評価すべき点は以下のとおりである。

1. 接着領域裏打ちタンパク質ビネキシンは、不活性型ビンキュリンに比べ活性型ビンキュリンに3倍の親和性で結合することを明らかにした。
2. ビネキシンのFAへの局在にビンキュリンとの相互作用が重要な役割を果たしていること、ビンキュリン非存在下ではビネキシン α は別の接着構造FBに局在することを明らかにした。
3. 細胞を界面活性剤処理した後に免疫染色することにより細胞骨格結合成分を可視化し、その細胞内局在を明らかにする方法を確立した
4. 3.の方法を用い、ビンキュリンとアクチン細胞骨格との相互作用を促進することで、ビネキシン α はアクチンのFAへの集積を促進していることを示した。
5. ビネキシンの発現抑制とビネキシンのファミリー分子CAP/ポンシンの発現上昇により、細胞が主に形成する接着構造がFAからFBに転換することを明らかにした。

以上のとおり、本論文は接着領域裏打ちタンパク質ビネキシンが、2種類の細胞接着構造の形成と動態に重要な役割を果たしていることを明らかにしたものである。これら2種類の接着構造は、生理学的にも病態生理学的にも異なる機能を担っていると考えられていることから、本論文は、細胞生化学、細胞生物学および基礎生理学に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士（農学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成20年4月10日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士（農学）の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。