

氏名	つば うち あさ こ 坪 内 朝 子
学位の種類	博 士 (生命科学)
学位記番号	生 博 第 14 号
学位授与の日付	平 成 16 年 3 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	生 命 科 学 研 究 科 高 次 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	細 胞 運 動 に お け る チ ロ シ ン リ ン 酸 化 の 役 割 と そ の シ グ ナ ル 経 路

論文調査委員 (主査) 教授 佐邊壽孝 教授 西田栄介 教授 根岸 学

### 論 文 内 容 の 要 旨

細胞運動は秩序だった機序のもとに制御されており、癌化に伴い多くが無秩序な状態になる。このことは癌細胞の示す異常な浸潤性や転移能とも深く関与すると考えられている。本研究では、上皮細胞の運動制御の基本的な分子機構を明らかにするために、インテグリン裏打ちタンパク質の1つであるパキシリン分子に注目した。パキシリンのチロシンリン酸化が、細胞基質接着と細胞運動において果たす役割について分子レベルで解析し、インテグリンシグナルを介したRhoA-Rac1活性の協調的制御を見出した。さらに、パキシリンのチロシンリン酸化が、細胞運動制御において分岐点としての役割を果たすことが予想された。

まず、細胞辺縁部分でのパキシリンのチロシン31/118リン酸化による局所的なRhoA活性制御機構について解析した。インテグリン裏打ちタンパク質の一つであるパキシリンには4箇所主要チロシンリン酸化部位があり、チロシン31/118は、細胞運動に伴って顕著にリン酸化を受ける。一方、同じインテグリン裏打ちタンパク質であるp130Casはパキシリン同様にチロシンリン酸化を受け、Rac1の活性化に関与することが知られているが、パキシリンとは、細胞運動性・ラフリング膜形成において、相反する機能を示す。パキシリンのY31/118F変異体を、正常マウス乳腺上皮細胞に発現させると、細胞運動時において、細胞辺縁部分まで達するアクチンストレスファイバーが形成され、ラフリング膜の消失が観察された。この細胞形態変化は、活性化型RhoAを強制発現させたものと酷似し、RhoAが活性化していることが明らかとなった。そこで、パキシリンのチロシン31/118リン酸化とRhoAの活性調節をつなぐ分子を探索する目的で、リン酸化チロシン31/118に結合する新規タンパク質の同定を試みた。その結果、パキシリンのリン酸化チロシン31/118とp120RasGAPがp120RasGAP内のSH2ドメインを介して結合することを見出した。p120RasGAPはp190RhoGAPと細胞内で結合し、RhoAの活性制御に関与することが報告されている。そこで、チロシン31/118リン酸化パキシリンとp120RasGAPの結合が、p120RasGAPとp190RhoGAPの結合及びRhoAの活性制御に影響を及ぼすのではないかと考え解析を行った。その結果、パキシリンとp120RasGAP、p190RhoGAPの結合は競合的であり、運動している細胞の辺縁部分で、チロシン31/118リン酸化パキシリンとp120RasGAPが結合することにより、遊離したp190RhoGAPが活性化され、RhoAの活性が抑制された。つまり、細胞運動において、インテグリンシグナルを介した、チロシン31/118リン酸化パキシリンによる細胞辺縁部分に局在したRhoAの抑制と、p130Cas-CrkによるRac1の活性化が、それぞれ別の経路で協調的に制御され、適切なラフリング膜が形成されることが明らかとなった。

後半は、パキシリンのチロシンリン酸化と運動中の細胞極性決定について解析した。パキシリンのY40/181F変異体を発現させた上皮細胞では、微小管形成中心(MTOC)の核膜上における位置が乱れ、細胞運動方向の持続性も大幅に減少することを見出した。これら現象はパキシリンのY31/118F変異体の発現では観察されなかったことから、パキシリンのチロシンリン酸化部位によって、細胞内シグナル経路が異なると考えられた。そこで、Y40/181F変異体発現細胞において、極性決定への関与が示唆されているCdc42の活性に変化が起こっているのではないかと考え、1細胞内での活性をFRET法

を利用し、リアルタイムで観察した。その結果、パキシリンのY40/181F変異体を発現させた上皮細胞において、細胞辺縁部分での局所的なCdc42/Rac1の異常な活性化が観察された。以上の結果から、パキシリンのチロシン40/181がリン酸化されることで、細胞辺縁部分でのRac1やCdc42の活性が正常に制御されているのではないかと考えられた。

#### 論文審査の結果の要旨

本論文は、インテグリンシグナル分子の一つであるパキシリンのチロシンリン酸化の持つ役割をモデル細胞系を用いて解析したものである。細胞運動においては異なる種類のRho-family GTPase分子の活性が互いにある一定の調和のもとに制御されているが、その分子の実態は殆ど不明であった。本論文は、運動する上皮細胞の運動端において、そこでは必要ではないRhoAの活性を積極的に抑制する機構が存在すること、逆に、この抑制機構が正常に作動しないと運動端に波状的な形質膜の構造を効率的に作れないことを明らかにし、その分子機構を提示した。また、このRhoAの抑制機構がどのようにして他のRho-family GTPase、例えばRac1、の活性化と協調的に作動できるのかを示した。本研究の主要な部分は、細胞生物学分野で最高位とされている学術雑誌に掲載されている。また、日本語で書かれた学位論文においては、単にこのような個別の研究内容を記載するのではなく、当該分野の10年以上に渡る現在までの国際的な研究の流れや、研究の現状を広くかつ簡潔に纏めている。従って、本論文は博士の学位論文として価値あるものと認めた。

提出された学位論文に基づき、平成16年1月27日に公聴会を行った。質疑応答ではもう少し簡潔で説得力のある議論が望まれたが、全体として無難にこなされ、合格と認めた。