

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	山下 寛
論文題目	Analysis of microenvironment-mediated cell behavior －mechanisms for sensing matrix rigidity and regulating cell migration－ (微小環境に依存した細胞挙動の解析 －細胞外マトリクスの堅さ感知と細胞運動制御のメカニズム－)		
(論文内容の要旨)			
動物細胞が個体や組織中で適切に機能するためには、細胞外の微小環境の状態を正確に感知し、この感知した状態に応じて自身の挙動（細胞運動や分化状態）を変化させることが必須である。このため、細胞の微小環境感知機構が破綻すると異常な細胞増殖や細胞運動が起こり、がんなどの疾病や発生異常につながる。しかし、細胞がどのように周辺の微小環境を感知し、その挙動を変化させているかは良く分かっていない。本研究では、細胞が周辺の微小環境を感知し、その挙動を変化させる機構について解析を行った。本論文の主な内容は以下のとおりである。 細胞外微小環境は、主に細胞外マトリクス(extracellular matrix, ECM)の違いによって規定されるが、近年、細胞外微小環境の性質を規定する要素として、「ECMの堅さ」が非常に重要であることが明らかとなった。細胞はECMとの接着部位である「接着斑」を介してECMを引っ張り、ECMの堅さを感知すると考えられているが、その仕組みはよく分かっていない。ビンキュリンはアクチン繊維を接着斑に繋ぎ留める接着斑局在タンパク質で、細胞内の張力を接着斑に伝える役割を持つ。このため、ビンキュリンはECMの堅さの感知に関与することが予想される。そこで第一章では、ECMの堅さと接着斑タンパク質（特にビンキュリン）の挙動との関連性について解析を行った。人工的にECMの堅さを変化させるため、アクリルアミドゲルを基盤とした細胞培養系を用いて実験を行い、ECMが堅くなるにつれて、ビンキュリンの接着斑でのターンオーバーが減少し、アクチン繊維と強く結合したビンキュリンの量が増加することを示した。この結果は、ECMが堅い時ほどビンキュリンが接着斑で安定であることを示唆している。さらに、接着斑でのビンキュリンの安定化には、別の接着斑タンパク質ビネキシンとビンキュリンの結合が必要であることを明らかにした。また、ECMが堅くなることで、別の接着斑タンパク質であるパキシリンの接着斑での安定性が、ビンキュリンとは逆に減少することを示した。パキシリンはビネキシンと結合しないにも関わらず、ECMの堅さに応じたパキシリンの変化にもビネキシンが必要であることが分かった。この時、接着斑におけるビンキュリンとパキシリンの量の比を比較したところ、ECMが堅くなるにつれてビンキュリンに対するパキシリンの比率が減少していた。つま			

り、細胞はビンキュリンとビネキシンの結合をスイッチとして、接着斑の性質を変化させることでECMの堅さを感知していることが示唆された。

脂質ラフトはコレステロールやスフィンゴ脂質を多く含む膜ドメインで、細胞内シグナル伝達の足場となるなど、細胞挙動の制御に重要であることが知られている。第二章では、接着斑タンパク質であるビンキュリンやビネキシンの脂質ラフトに局在することを発見した。また、ビンキュリンが脂質ラフトに局在するためにはビネキシンが必要であり、ビネキシンに加えて接着斑の形成過程において細胞内の張力を生み出すミオシンの活性も必要であることも示した。細胞膜中のコレステロールをmethyl- β -cyclodextrin (M β CD)を用いて引き抜き、脂質ラフトを破壊すると、ビンキュリンの接着斑での安定性が低下した。これは、ビンキュリンの接着斑での安定化にコレステロールを多く含む脂質ラフトが寄与することを示唆している。また、ビネキシン遺伝子欠損細胞をM β CD処理しても、ビンキュリンの挙動は影響を受けなかったことから、コレステロールによる接着斑でのビンキュリンの安定化には、ビネキシンが必要であることが分かった。こうした接着斑タンパク質の脂質ラフトへの局在の変化が、「ECMの堅さ」の感知に関与する接着斑タンパク質の安定性の変化につながっている可能性が考えられる。

細胞外微小環境の変化に応じた細胞運動の制御には、cAMP依存性キナーゼ(PKA)が関与することが知られていたが、その制御メカニズムは不明であった。PKAは他のキナーゼと比べて基質特異性が低いいため、A kinase anchoring proteins (AKAPs)と呼ばれるタンパク質群と直接結合し、細胞内の特定の場所に濃縮されることで、空間的に基質の選択性を得る必要がある。しかし、細胞運動の制御に関わるAKAPは良くわかっていなかった。そこで、第三章では、細胞運動の制御に関与するAKAPを同定することを目的として解析を行い、Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin-homologous protein 2 (WAVE2)をAKAPとして同定した。共免疫沈降実験から、内在性のWAVE2とPKAが複合体を形成することを示し、精製タンパク質を用いた結合実験からWAVE2がPKAホロ酵素と直接結合することを明らかにした。また、Proximity Ligation Assayを用いて、WAVE2とPKAの複合体が運動中の細胞の前方部に形成される膜突出部位（仮足）に局在していることを示した。この時、RNA干渉法によるWAVE2の発現抑制によってPKAの仮足への局在が大幅に減少することから、WAVE2がPKAの細胞内局在を制御するAKAPとして機能することを明らかにした。PKAの活性化は仮足の伸展を促進したが、WAVE2の発現抑制によってこの効果は消失した。この結果から、WAVE2によって仮足に濃縮されたPKAが活性化することで仮足の伸展が促進し、細胞運動能の上昇を引き起こすことが示唆された。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

動物細胞は、細胞外マトリクス(ECM)の違いによって規定される細胞外微小環境に応じて、細胞運動や分化といった自身の挙動を変化させる。こうした微小環境に応じた細胞挙動の変化は、個体を維持するために必須な細胞増殖、発生、あるいは創傷治癒といった生命現象に必須である。しかし、細胞が微小環境を感知し、自身の挙動を変化させる機構はよくわかっていない。本論文は、細胞によるECMの堅さの感知及び微小環境に応じた細胞運動の制御機構について解析したものであり、評価すべき点は以下のとおりである。

1. ECM の堅さに応じて、細胞が接着斑タンパク質ビンキュリンとパキシリンの接着斑での安定性を変化させ、ビンキュリンとパキシリンの量の比率を変化させることを明らかにした。
2. ECM の堅さに応じた接着斑タンパク質の挙動の変化に、ビンキュリンとビネキシンの結合が必要であることを明らかにした。
3. 接着斑タンパク質が脂質ラフトに局在することを明らかにした。
4. 細胞膜に含まれるコレステロールにより、ビンキュリンが接着斑で安定化されることを明らかにした。また、この安定化にビネキシンの寄与することを明らかにした。
5. WAVE2 が PKA と直接結合し、PKA を仮足へ濃縮させる AKAP として機能することを明らかにした。
6. PKA の活性化による仮足の伸展促進に WAVE2 が必須であることを明らかにした。

以上のとおり、本論文は細胞の挙動に重要な細胞外微小環境の感知機構と、これに伴う細胞挙動の制御機構を明らかにしたものであり、分子細胞生物学、生化学、分子生物学および基礎生理学に寄与するところが多い。

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24年2月13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。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降