

氏 名	リ 李	ジョン 鍾	ファン 煥
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)		
学 位 記 番 号	生 博 第 23 号		
学位授与の日付	平成 16 年 11 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	生 命 科 学 研 究 科 高 次 生 命 科 学 専 攻		
学位論文題目	Roles of phospho-ERM and Rho-ROCK signaling in lymphocyte polarity and uropod formation (リンパ球の極性および uropod 形成におけるリン酸化型 ERM タンパク質と Rho-ROCK シグナル経路の役割)		
論文調査委員	(主 査) 教 授 清 水 章 教 授 米 原 伸 教 授 佐 邊 壽 孝		

論 文 内 容 の 要 旨

細胞極性は様々な局面において細胞の機能発現に不可欠である。例えば、移動する細胞の前後軸に沿って形成される非対称性は、効果的な細胞遊走においてきわめて重要であると考えられる。免疫応答の中核を担うリンパ球は、必要に応じてからだの各所へ速やかに移動しその機能を発揮する。また、外来病原体の感染に対して迅速に対応するために、様々な因子に反応し、方向性を持った非常に高い遊走能を有する。このような遊走中のリンパ球は明瞭な細胞極性を示すようになるが、どのようにしてこの極性が形成、維持されるのかに関してはほとんどわかっていない。

遊走するリンパ球の細胞後部には uropod と呼ばれる特徴的な突出構造があり、CD44、CD43 等の膜貫通型タンパク質や、細胞膜/細胞骨格架橋タンパクである ERM (ezrin, radixin, moesin) などの細胞成分の局在が認められる。この奇妙な構造がどのような機構により形成されるのか、あるいはリンパ球遊走に対してどのような役割があるのかに関しても全く明らかにされていない。マウス T リンパ腫株 EL4.G8 は、恒常的に uropod を安定形成し遊走細胞に典型的な細胞極性を有することから、こうした問題に取り組むための優れた材料になると考えられる。

ERM タンパクのひとつ、ezrin は C 末端部位 567 番目のスレオニン残基がリン酸化されることにより、構造変化を引き起こし細胞膜/アクチン細胞骨格架橋能を発揮する。EL4.G8 細胞の uropod には、このリン酸化型 ezrin が選択的に局在した。EL4.G8 細胞に疑似リン酸化型 ezrin 変異体 (567 番目スレオニン残基のアスパラギン酸置換体、T567D ezrin) を過剰発現させると、uropod が肥大化し細胞遊走能が増大した。また、セリン・スレオニンキナーゼ阻害剤である staurosporin の処理によって uropod を欠失させた EL4.G8 細胞や、極性をもたない X63.653 骨髓腫細胞に導入した T567D ezrin は、CD44 とともに細胞膜近傍の特定部分に遍在することにより polar cap を形成することが明らかになった。また、この現象はアクチン細胞骨格に依存した。しかし、野生型 ezrin や非リン酸化型 ezrin (T567A ezrin) の強制発現では、こうした現象はみられなかった。したがって、リン酸化型 ezrin が細胞膜極性や uropod の形成において重要な役割を担うことが示唆された。

セリン・スレオニンキナーゼである ROCK は ERM タンパクをリン酸化するとの報告があるが、ROCK 阻害剤 Y-27632 は EL4.G8 細胞の uropod は消失させたが、このとき polar cap は維持されていた。様々な細胞においてアクチン細胞骨格を制御する低分子量 G タンパク Rho は、ROCK の上流に位置するが、ドミナントネガティブ変異体 RhoA (19 番目スレオニン残基のアスパラギン置換体) の強制発現はやはり uropod を消失させた。これらの結果は、Rho-ROCK シグナルは ERM のリン酸化には関与せず、細胞の後方部突出に必須であることを示す。

スレオニン 567 のリン酸化により活性化した ezrin は、その N 末端領域で Rho-GEF のひとつ Db1 と会合し、RhoA の活性化を引き起こした。また、常活性型変異体 RhoA (63 番目グルタミン残基のロイシン置換体) は細胞後方に選択的に局在した。さらに、polar cap は常に後方細胞質を覆う状態で維持された。以上の結果は、細胞後方に局在化したリン酸化型 ezrin が Db1 を介して Rho-ROCK シグナル経路を活性化し、uropod の突出を誘導するという一連の過程を想起させる。

したがって、EL4.G8細胞における ezrin リン酸化酵素の実態は依然として明らかではないが、リン酸化された活性型 ERM タンパクはリンパ球が uropod を形成する際に細胞膜の「後方」を決定し、リンパ球遊走に関して重要な機能を果たし得ると考えられる。

論文審査の結果の要旨

免疫応答を司るリンパ球は、病原体などの外来性抗原に速やかに対応し、必要な防御反応を起こすために、種々の因子に反応して、方向性を持った高い遊走能を発揮する。このような遊走中のリンパ球は明瞭な細胞構造の非対称性、すなわち細胞極性を示す。この非対称構造の代表的なものとして、遊走するリンパ球の細胞後部には、CD43、CD44などの細胞とマトリックスとの結合などに関与する細胞膜貫通蛋白質や細胞膜と細胞骨格の架橋蛋白質である ERM (ezrin, radixin, moesin) などが局在する uropod と呼ばれる特徴的な突出構造が形成されることが知られている。このように、リンパ球の機能発現には細胞極性とそれを基にした構造の形成が、極めて重要であると認識されているが、この形成の分子機構ならびにその細胞遊走における役割などはほとんど知られていなかった。

本学位申請者は、恒常的に uropod を形成し、高い遊走能を持つマウス T リンパ腫細胞株、EL4.G8を用いて細胞極性、uropod 形成、遊走能に関する解析を行い次のような成果を得た。ERM 蛋白質の1つ ezrin はその C 末端付近に存在するスレオニン残基 (T567) がリン酸化を受けると構造変化を起こし、細胞膜貫通蛋白質と細胞骨格 (アクチン) との架橋能を発揮するが、EL4.G8細胞においてはリン酸化型 ezrin が uropod に局在していることを見出した。さらに ezrin の疑似リン酸化型変異体 (T567D ezrin) の過剰発現によって uropod の肥大化と遊走能の増大が見られた。セリンスレオニンキナーゼの非特異的阻害剤 staurosporin 添加によって uropod 消失させた EL.G8細胞や uorppod を持たない X63.653 骨髓腫細胞に T567D ezrin を発現させると、細胞極性の形成を示す polar cap が観察された。一方、セリンスレオニンキナーゼの1種である ROCK の阻害剤 Y-27632 の添加や ROCK 信号経路の上流に位置する RhoA のドミナントネガティブ変異体の強制発現は、EL.G8細胞の uropod を消失させたが、polar cap 形成は維持されていた。加えて、T567D ezrin がその N 末領域で Rho-GEF の1つである Db1 と結合し、RhoA の活性化を引き起こすこと、および活性化型 RhoA 変異体が細胞の後部に選択的に局在することも示した。以上の一連の結果は、細胞後方に局在したリン酸化型 ezrin が Db1 を介して Rho-ROCK 信号経路を活性化し、uropod の形成を誘導するという過程を想定させる。さらに、ERM 蛋白質をリン酸化する酵素の実態は未解明であるが、リン酸化された ERM 蛋白質が uropod の形成に際して細胞の後方を決定し、リンパ球の遊走到に当たって重要な機能を担っていると考えられる。

以上の結果は、細胞の極性形成と遊走に関する分子的基盤の一端を明らかにしたもので、分子細胞生物学の発展に寄与するところが大きい。従って本論文は博士 (生命科学) の学位論文として価値あるものと認めた。

なお本学位申請者は、平成16年10月5日に実施された論文内容とそれに関連した口頭試問を受け合格と認められた。