

氏 名	おお 谷 哲 ひさ 久
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 89 号
学位授与の日付	平 成 18 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 統 合 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Cdc42 の GTPase 交換因子 Tuba による単層上皮細胞の敷石状形態形成の制御機構
論文調査委員	(主 査) 教 授 竹 市 雅 俊 教 授 根 岸 学 教 授 米 原 伸

論 文 内 容 の 要 旨

単層上皮細胞は多角形状の均一な形態をとり、細胞間接着部位は直線的である。このような形態は敷石状形態、もしくは蜂の巣状形態と形容される。このような細胞の形態と石鹸の泡がとる形態の相似性から、細胞の表面張力のつりあいによって敷石状形態は生じると考えられているが、このような形態を生み出す分子細胞生物学的機構に関してはまだ良く理解されていない。

申請者は、細胞間接着部位に局在する分子を探索する過程で、Cdc42 の GTPase 交換因子である Tuba が細胞間接着部位に局在することを見つけた。Tuba は単層上皮細胞において頂端部側の接着複合体に局在し、タイト・ジャンクションのタンパク質である ZO-1 と共局在した。Tuba は ZO-1 と複合体を形成し、ZO-1 の発現を RNAi によって抑制すると Tuba の接着複合体への局在が失われた。これらのことから、Tuba は ZO-1 と複合体を形成することによって細胞間接着部位に局在することが明らかとなった。

次に、Tuba の生理的機能を知る目的で、典型的な単層上皮細胞である Caco-2 細胞において Tuba の発現を RNAi によって抑制した。Tuba を RNAi した細胞においては、タイト・ジャンクションおよびアドヘレンス・ジャンクションのタンパク質は正常に細胞間接着部位に局在することができたが、細胞間接着部位が蛇行し、敷石状形態が乱された。さらに、細胞間接着分子である E-cadherin とアクチン骨格の分布を詳細に検討した。Caco-2 細胞においては、E-cadherin および繊維状アクチンはアドヘレンス・ジャンクションの領域にベルト状に濃縮し、さらに側基底面においてアドヘレンス・ジャンクションと接続した網目状のネットワークを形成していた。一方で、Tuba を RNAi した細胞においては、アドヘレンス・ジャンクションに E-cadherin と繊維状アクチンは正常に濃縮することが出来るものの、側基底面に通常見られるネットワーク構造が崩壊し、断片化しているのが観察された。さらに、細胞間接着形成過程における Tuba の機能を検討した結果、Tuba を RNAi した細胞においては細胞間接着の形成が遅延し、細胞間接着部位への Cdc42 の集積が減弱することが分かった。また、Caco-2 細胞において Cdc42 のドミナント・ネガティブ変異体を過剰発現すると、Tuba を RNAi した細胞と同様に細胞間接着が蛇行し、逆に Tuba を RNAi した細胞に Cdc42 の恒常的活性化型変異体を過剰発現すると細胞間接着は直線化した。さらに、Cdc42 の下流でアクチン骨格の重合に機能する N-WASP の発現を Caco-2 細胞において RNAi によって抑制すると細胞間接着が蛇行し、一方で Tuba を RNAi した細胞に全長 N-WASP 分子を過剰発現すると細胞間接着形成が促進された。

以上の結果から、Tuba は Cdc42 と N-WASP を介して細胞間接着部位におけるアクチン骨格の重合を制御することによって、細胞間接着部位を直線的にし、単層上皮細胞の敷石状形態の形成を制御していることが示唆された。以上の結果を踏まえて、単層上皮細胞の敷石状形態がどのような分子細胞生物学的機構によって生じるのかを議論した。

論文審査の結果の要旨

上皮細胞は敷石状形態と呼ばれる特徴的な形態をとることが知られている。敷石状形態は均一な細胞の大きさと形、および直線状の細胞境界部の形態によって特徴付けられる。しかし、敷石状形態が生じる分子細胞生物学的な機構に関してはこれまでほとんど不明であった。

申請者は、細胞間接着部位に局在する分子として Cdc42 のグアニンヌクレオチド交換因子である Tuba を同定した。申請者は、まず Tuba がタイト・ジャンクションのタンパク質である ZO-1 と複合体を形成し、Tuba が ZO-1 依存的に細胞境界部に局在することを示した。次に、申請者は Tuba の発現を RNAi によって抑制し、Tuba が細胞境界部を直線的に保つのに必要であることを示した。一方で、申請者は ZO-1 の発現が抑制された細胞においては RhoA-ROCK-myosinII の経路が過剰に活性化することにより、細胞境界部が逆に直線化することを見出した。ZO-1 の発現を抑制した細胞において ROCK を阻害すると細胞境界部が蛇行することから、申請者は ZO-1 の下流では Tuba だけでなく RhoA-ROCK 経路が機能していて、両者のバランスによって細胞境界部の形態が決定される可能性を示した。さらに、申請者は E-cadherin およびアクチン骨格が側基底部面の細胞境界部においてアドヘレンス・ジャンクションに接続したネットワーク状の分布をしていることを明らかにし、このネットワーク形成に Tuba が必要であることを示した。また、分子細胞生物学的な解析から、申請者は Tuba がその基質である Cdc42、および Cdc42 のエフェクター分子である N-WASP を介して機能していることを明らかにした。

以上の結果より、申請者は上皮細胞に特徴的な直線的な細胞境界部は、RhoA-ROCK-myosinII 経路によって制御される頂端部側のアクチン束の収縮力と、Tuba-Cdc42-N-WASP 経路によって制御される側基底部面のアクチンのネットワークによる表面張力とのバランスによって決定されるというモデルを提唱した。

本研究は Tuba の生理的機能を明らかにしたのみならず、上皮細胞の敷石状形態の形成機構の理解に大きく貢献するものであり、高く評価できる。また、本研究は側基底部面における E-cadherin とアクチン骨格のネットワーク構造を記載し、側基底部面の細胞間接着が頂端部側のシグナルによって制御される可能性を示した点で、上皮細胞における細胞間接着形成機構にも新たな知見を与えている。

以上により、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、平成18年10月4日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。