



## Involvement of the c-src-crk-c3g-rap1 signaling in the nectin-induced activation of cdc42 and formation of adherens junctions

福山, 泰平

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2005-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲3370

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1003370>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 96 】

氏 名・(本 籍) 福山 泰平 (福岡県)  
博士の専攻分野の名称 博士(医学)  
学 位 記 番 号 博い第1649号  
学位授与の 要 件 学位規則第5条第1項該当  
学位授与の 日 付 平成17年3月25日

【 学位論文題目 】

Involvement of the c-Src-Crk-C3G-Rap1  
signaling in the nectin-induced activation of  
Cdc42 and formation of adherens junctions  
(ネクチンによるCdc42の活性化とアドヘレンス  
ジャンクションの形成におけるc-Src-Crk-C3G-Rap1  
シグナリングの関与)

審 査 委 員

主 査 教 授 春日 雅人  
教 授 中村 俊一  
教 授 久野 高義

Nectins are  $\text{Ca}^{2+}$ -independent Ig-like cell-cell adhesion molecules which form adherens junctions (AJs) cooperatively with cadherins. Nectins first form cell-cell contacts and recruit cadherins to the nectin-based cell-cell contact sites, causing the formation of AJs. Moreover, nectins activate Rho family small G proteins, Cdc42 and Rac. Cdc42 induces the formation of filopodia and increases the number of cell-cell contact sites at the initial stage of the formation of AJs, whereas Rac induces the formation of lamellipodia that efficiently expand the cell-cell adhesion between filopodia, acting like a "zipper". Thus, Cdc42 and Rac activated by nectins are likely to play important roles in the formation of cell-cell junctions. Another small G protein, Rap1, which is the closest relative of Ras, is reported to be involved in many cell functions, including integrin-mediated cell adhesion, exocytosis, neurite outgrowth, and synaptic plasticity. It still remains, however, largely unknown how Rap1 is activated and regulated by nectins in the formation of AJs. I have recently demonstrated that c-Src is recruited and activated by nectins at the nectin-based cell-cell contact sites, and that c-Src activated in this way then induces the activation of Cdc42 through FRG, a Cdc42-GDP/GTP exchange factor (GEF). Along this line, I show here that Rap1 is additionally involved in the nectin-induced, c-Src- and FRG-mediated activation of Cdc42 and formation of AJs.

I first found by overexpression of Rap1GAP, which inactivates Rap1, that Rap1 was involved in the nectin-induced activation of Cdc42 and Rac, and the subsequent formation of filopodia and lamellipodia, respectively, in both fibroblasts and epithelial cells. Rap1 functioned upstream of Cdc42 and Rac and downstream of c-Src, although the activation of Rap1 alone was not sufficient for and the activation of both c-Src and Rap1 was required for the

nectin-induced activation of Cdc42 and Rac and formation of filopodia and lamellipodia, respectively. Nectins recruited Rap1 to the nectin-based cell-cell contact sites and locally activated it there through c-Src. To further explore the mechanisms by which Rap1 was activated by nectins through c-Src, I focused on the signaling molecules of the Crk-C3G complex. Crk is the adaptor protein phosphorylated by c-Src, and C3G is a Rap1-GEF activated through Crk. I found that the complex indeed activated Rap1 and was involved in the nectin-induced activation of Cdc42 and Rac. Because FRG is activated by nectins through c-Src as described above, I examined how Rap1 is related to activate FRG. Intriguingly, the activation of Rap1 alone was insufficient for, and the activation of both c-Src and Rap1 was necessary for the nectin-induced activation of FRG. However, Rap1 was not necessary for the recruitment of FRG to the nectin-based cell-cell adhesion sites and did not affect the c-Src-mediated tyrosine phosphorylation of FRG. Finally, I confirmed that Rap1 was actually important for the nectin-induced formation of the E-cadherin-based AJs in the epithelial cells.

These results indicate the following mechanism of the activation of Cdc42 by nectins. Nectins first recruit and activate c-Src at the nectin-based cell-cell contact sites. c-Src activated in this way recruits and phosphorylates FRG there on one hand, although it does not activate FRG. On the other hand, c-Src induces the activation of Rap1 through the Crk-C3G complex. Rap1 activated in this way then induces the activation of tyrosine-phosphorylated FRG, which activates Cdc42. Thus, Rap1 activated by nectins through the c-Src-Crk-C3G signaling plays crucial roles in the nectin-induced activation of Cdc42 and formation of AJs.

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1656号	氏名	福山 泰平
論文題目	<p>Involvement of the c-Src-Crk-C3G-Rap1 signaling in the nectin-induced activation of Cdc42 and formation of adherens junctions</p> <p>ネクチンによるCdc42の活性化とアドヘレンスジャンクションの形成におけるc-Src-Crk-C3G-Rap1シグナリングの関与</p>		
審査委員	<p>主査 春日 雅人</p> <p>副査 中本 俊一</p> <p>副査 久野 高義</p>		
審査終了日	平成17年2月28日		

（要旨は1,000字～2,000字程度）

ネクチンは細胞間接着を構成する接着分子で、カドヘリンと協調して接着構造のひとつであるアドヘレンスジャンクションの形成に関与している。低分子量Gタンパク質は、比較的小さいGタンパク質の総称で、活性化・不活性化が時間的、空間的に厳密に制御されており活性化状態の時のみシグナルを下流に伝えるスイッチの役割をする。細胞間接着の初期には、まずネクチン同士が接着し、c-Srcが接着部位にリクルートされ活性化すること、さらにRhoファミリーに属する低分子量Gタンパク質である、Cdc42とRacを活性化し、それぞれフィロポディア（糸状仮足）とラメリポディア（葉状仮足）を形成することで細胞骨格を再構成し細胞間接着に重要な働きをしていることをすでに報告している。また、Rap1はRasファミリーに属し、インテグリンによる細胞接着、エクソサイトシス、神経突起の伸展や神経の可塑性など様々な細胞の機能に関与している低分子量Gタンパク質である。今回、Rap1がネクチンによる細胞間接着に関与しているかどうかを検討した。

ネクチンの細胞外領域とヒト免疫グロブリンとの融合タンパク質を精製し、ネクチンを発現させたマウスL細胞やイヌMDCK細胞を用いて、これらの擬似的な細胞間接着によるシグナル伝達を解析した。細胞形態学的には蛍光免疫染色を、タンパク質活性化の定性には分子生物学的・生化学的手法を使用した。同時に細胞間への分子の局在や生理的なアドヘレンスジャンクションの形成についても観察した。

Rap1を不活性化するRap1GAPはネクチンによるCdc42とRac、さらにはフィロポディアとラメリポディアの活性化を抑制した。Rap1はCdc42とRacの上流で、かつc-Srcの下流で機能していた。このネクチンによるCdc42とRacの活

性化には、Rap1だけでは不十分で、c-SrcとRap1の両方が必要であった。さらに、ネクチンはc-Src-Crk-C3Gの経路を介してRap1を接着部位にリクルートし活性化していた。しかしRap1は、Cdc42のGDP/GTP交換因子であるFRGの局在やチロシンリン酸化には関与していなかった。

ネクチンは、まず最初にc-Srcを細胞間接着部位にリクルートし活性化する。

c-Srcは一方ではFRGをチロシンリン酸化し、他方ではCrk-C3Gコンプレックスを介してRap1を活性化し、最終的にFRGを活性化することがわかった。活性化されたCdc42はフィロポディアを作り、アドヘレンスジャンクション形成初期において接触部位を増加させる。また、Racはラメリポディアを作つてフィロポディアの間隙を埋め、いわゆるジッパーが閉じるようにアドヘレンスジャンクションが形成される。本論文では、Rap1がc-Src-Crk-C3Gの経路を介して、ネクチンによるCdc42の活性化やアドヘレンスジャンクションの形成など細胞間接着に関与していることを明らかにした。

細胞間接着は、個体発生や再生における形態形成だけでなく脳における神経回路網の形成、炎症、創傷治癒、がんなど広く重要な生命現象に関与している。

本研究は、細胞間接着について、接着分子ネクチンと低分子量Gタンパク質の関わりを研究したものであるが、従来解明されていなかった接着形成における分子メカニズムの時間的、空間的制御について重要な知見を得たものとして価値ある業績であると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。