



The M-Ras-RA-GEF-2-Rap1 Pathway Mediates Tumor Necrosis Factor- α -dependent Regulation of Integrin Activation in Splenocytes

吉川, 陽子

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2007-09-25

(Date of Publication)

2008-02-04

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4061

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004061>

※ 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。



氏 名 吉川 陽子
博士の専攻分野の名称 博士 (医学)
学 位 記 番 号 博い第 1863 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 19 年 9 月 25 日

【 学位論文題目 】

The M-Ras-RA-GEF-2-Rap1 Pathway Mediates Tumor Necrosis Factor- α -dependent Regulation of Integrin Activation in Splenocytes (M-Ras RA GEF-2-Rap1 経路は、脾臓細胞において Tumor Necrosis Factor- α 依存性のインテグリン活性化を制御する)

審 査 委 員

主 査 教 授 横 崎 宏
教 授 南 康 博
教 授 古 瀬 幹 夫

緒言

Rasファミリー低分子量G蛋白質の一員であるRap1はインテグリンを介した細胞接着、リンパ球の遊走、炎症反応や免疫応答に関与しており、その活性はGEF（グアニンヌクレオチド交換因子）によって制御されている。Rap1にはC3G, cAMP-GEF/Epac1/2, CalDAG-GEF/GRP1, MR-GEF, SmgGDS, ホスホリパーゼC ϵ 等の多数のGEFの存在が確認されている。これらのRap1-GEFは通常一個の細胞内に複数発現していることから、Rap1の活性が複数のGEFによって細胞内で時間・空間特異的に制御されていることが予想される。本研究室によって新規のRap1-GEFとして同定されたRA-GEF-2は、哺乳動物培養細胞を用いた解析の結果、そのRA (Ras/Rap-associating) ドメインを介して活性型であるGTP結合型のRasファミリー低分子量G蛋白質M-Rasと結合して細胞質から形質膜に移行し、形質膜に局在するRap1のみを選択的に活性化することが示された。しかし、この調節機構の生理的意義は未だ明らかではない。そこで、本研究では、以下の3点に着目して解析をおこなった。

1. 培養細胞を用いたM-Ras-RA-GEF-2-Rap1経路の機能解析
2. M-Ras-RA-GEF-2-Rap1経路を活性化する上流因子の探索
3. RA-GEF-2の遺伝子ノックアウトマウスの作成とその表現型の解析

実験方法と結果

1. 培養細胞を用いたM-Ras-RA-GEF-2-Rap1経路のインテグリンを介した細胞接着における機能解析

Rap1がインテグリンを介した細胞接着に関与することはすでに報告されているが、M-RasとRA-GEF-2がRap1の上流に位置して細胞接着に関与するかどうかは不明である。そこで、LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$ -インテグリン) を発現させたプロB

細胞株BAF3細胞を用いて、インテグリン依存性の細胞接着にM-RasとRA-GEF-2が関与するかを検討した。まず、内在性のRA-GEF-2の存在を抗RA-GEF-2抗体を用いたウエスタンブロッティングで確認した後、活性型M-Ras変異体 {M-Ras(Q71L)} を発現するプラスミドDNAをエレクトロポレーション法により細胞に導入したところ、この細胞株はBAF3細胞膜に存在するリガンドICAM-1とLFA-1との結合を介して強い細胞接着能を獲得することが明らかとなった。この細胞接着はLFA-1特異的抗体を添加することによって阻害されることから、活性型M-RasがLFA-1依存性の細胞接着に関与することが示された。更に、この細胞株にRA-GEF-2やRap1に特異的なsiRNAを導入し、RNA干渉法にて当該蛋白質の発現を阻害したところ、いずれのsiRNAによっても活性型M-Rasによって誘導される細胞接着が強く阻害された。また、活性型M-Rasの共発現により、RA-GEF-2は細胞質から形質膜に移行した。以上の結果から、活性型M-RasからのシグナルはRA-GEF-2及びRap1を介してインテグリン依存性の細胞接着を誘導することが示唆された。

2. M-Ras-RA-GEF-2-Rap1経路を活性化する上流因子TNF- α の同定

次にM-Rasの活性化を誘導する上流因子の探索を行った。細胞接着を誘導することが報告されている多数のサイトカインやケモカインの中で、Rap1を介した細胞接着を誘導することが報告されているTNF- α (Tumor Necrosis Factor-alpha) に着目した。1の実験と同様に、LFA-1を発現させたBAF3細胞に、野生型M-Ras, H-Ras, Rap1発現ベクターをそれぞれ導入した後、TNF- α 刺激でインテグリン依存性の細胞接着が誘導されるか否かを検討した。その結果、TNF- α は野生型M-Rasを発現した細胞にのみ、選択的に細胞接着を誘導した。このTNF- α 依存性の細胞接着は、RA-GEF-2やRap1のsiRNAの導入により阻害された。野生型M-Ras発現細胞の形質膜では、TNF- α 依存性のM-Ras-GTP量の上昇とRap1-GTP量の上昇が見られた。以上の結果から、TNF- α はM-Ras-RA-GEF-2-Rap1経路を経てインテグリンを介した細胞接着を

誘導することが示された。

3. RA-GEF-2 遺伝子ノックアウトマウスを用いた M-Ras-RA-GEF-2-Rap1 経路の個体レベルでの機能解析

生体内での RA-GEF-2 固有の機能を解明するため、RA-GEF-2 遺伝子を欠損したノックアウトマウスの作製とその表現型の解析をおこなった。胎生期致死になる可能性も想定して Cre-loxP システムを用い、マウス胚性幹細胞を用いた遺伝子ターゲティング法により、RA-GEF-2 の Rap1-GEF 活性を担う触媒ドメインをコードするエクソン 21 を欠失し活性を喪失した変異 RA-GEF-2 遺伝子座を持つマウスを作製した。変異 RA-GEF-2 遺伝子座のホモ接合体マウス（ノックアウトマウス）はメンデルの法則に応じた匹数で生まれ、外見上は野生型と顕著な差がなかった。しかし、各臓器のサイズを野生型マウスと比較したところ、ノックアウトマウスは体重比で約 1.4 倍の脾臓を持つことがわかった。RA-GEF-2 は胸腺、脾臓といったリンパ系組織に多く発現していることから、これらの臓器の細胞の接着能力をノックアウトマウスと野生型マウスの間で比較検討した。その結果、野生型マウスでは脾臓細胞と胸腺細胞の両方が TNF- α 依存性の LFA-1-ICAM-1 相互作用を介した細胞接着を起こしたが、ノックアウトマウスでは、脾臓細胞においてこの TNF- α 依存性の接着能力が著明に低下していた。Panning 法を用いて脾臓細胞を B 細胞と T 細胞に分離し、それぞれの細胞群において TNF- α 依存性の細胞接着能力を調べた。その結果、B 細胞においてのみ、TNF- α 依存性の LFA-1-ICAM-1 相互作用を介した細胞接着が起こり、この接着はノックアウトマウスの B 細胞では著明に低下していた。更に、野生型脾臓細胞において、TNF- α 依存性の細胞接着は、M-Ras や RA-GEF-2 の siRNA の導入により阻害された。また、TNF- α 刺激に伴って Rap1-GTP 量の上昇が見られるが、この上昇はノックアウトマウスの脾臓細胞では起こらなかった。以上の結果から、M-Ras-RA-GEF-2-Rap1 経路は、脾臓細胞、特に B 細胞、において TNF- α により誘導されるインテグ

リンを介した細胞接着を制御していることが個体レベルで示された。

考察

本研究により、M-Ras-RA-GEF-2-Rap1 経路が、脾臓 B 細胞において TNF- α 依存性のインテグリンを介した細胞接着を制御していることが初めて証明された。このシグナル伝達経路が、液性免疫を担う B 細胞の活性化や分化、また炎症反応における TNF- α 依存性の細胞接着などの重要な生体現象の制御に関与していることが示唆される。Ras ファミリー低分子量 G 蛋白質の一員である M-Ras の生理的機能は今日まで未解明であったが、RA-GEF-2 が生理的に機能する標的蛋白質（エフェクター）であることが本研究により確立された。Rap1 が LFA-1 のみならず他の多数のインテグリンの活性制御、特に inside-out シグナルの伝達、に機能していることや、E-カドヘリンや VE-カドヘリン依存性の細胞接着に機能していることが報告されているので、M-Ras-RA-GEF-2-Rap1 経路が他の細胞間接着や細胞-基質間接着の調節に関与しており、その異常が細胞の癌化や癌細胞の浸潤・転移といった様々な現象に関与する可能性が考えられる。しかしながら、RA-GEF-2 以外にも Rap1-GEF は多数存在し、それらも細胞接着の制御に関与するという報告があることから、Rap1 を介した細胞接着は多数の GEF によって時間・空間特異的に制御を受けていることが予想される。実際、胸腺細胞において RA-GEF-2 は強く発現されているが、その TNF- α 依存性の接着能力は野生型マウスとノックアウトマウスの間でほとんど差が見られなかった。このことは胸腺においては RA-GEF-2 以外の Rap1-GEF が存在し、それが RA-GEF-2 の機能を補完するものと考えられる。本研究で発見された RA-GEF-2 の欠損と脾臓肥大との関係については現在解析中であり、その結果が脾臓肥大を引き起こす疾患との関係を解明する糸口となる可能性がある。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 1865 号	氏名	吉川 陽子
論文題目 Title of Dissertation	<p>The M-Ras-RA-GEF-2-Rap1 Pathway Mediates Tumor Necrosis Factor-α-dependent Regulation of Integrin Activation in Splenocytes</p> <p>M-Ras-RA-GEF-2-Rap1 経路は、脾臓細胞において Tumor Necrosis Factor-α 依存性のインテグリン活性化を制御する</p>		
審査委員 Examiner	<p>主 査 横 崎 久 Chief Examiner</p> <p>副 査 衛 康 博 Vice-examiner</p> <p>副 査 古 瀬 幹 夫 Vice-examiner</p>		
審査終了日	平成 19 年 6 月 20 日		

(要旨は 1000字～2000字程度)

<p>Ras ファミリー低分子量 G 蛋白質 Rap1 はインテグリンを介した細胞接着、リンパ球の遊走、炎症反応や免疫応答に関与しており、その活性は GEF (グアニンヌクレオチド交換因子) によって制御されている。Rap1 には C3G、cAMP-GEF/Epac1/2、CalDAG-GEF/GRP1、MR-GEF、SmgGDS、ホスホリパーゼ Cϵ 等の多数の GEF の存在が確認されている。これらの Rap1-GEF は通常一個の細胞内に複数発現していることから、Rap1 の活性が複数の GEF によって細胞内で時間・空間特異的に制御されていることが予想される。すでに、新規の Rap1-GEF として同定された RA-GEF-2 は、哺乳動物培養細胞を用いた解析の結果、その RA (Ras/Rap-associating) ドメインを介して活性型である GTP 結合型の Ras ファミリー低分子量 G 蛋白質 M-Ras と結合して細胞質から形質膜に移行し、形質膜に局在する Rap1 のみを選択的に活性化することが示されている。本研究は、この調節機構の生理的意義を明らかにすることを目的とした。得られた結果は以下のごとくである。</p> <p>まず、LFA-1 (αLβ2-インテグリン)を発現させたプロ B 細胞株 BAF3 細胞を用いて、インテグリン依存性の細胞接着における M-Ras と RA-GEF-2 の関与を検討した。活性型 M-Ras 変異体(M-Ras(Q71L))を導入すると、この細胞株は BAF3 細胞膜に存在するリガンド ICAM-1 と LFA-1 との結合を介して強い細胞接着能を獲得した。この細胞接着は LFA-1 特異的抗体を添加することによって阻害されることから、活性型 M-Ras が LFA-1 依存性の細胞接着に関与することが示された。更に、この細胞株に RA-GEF-2 や Rap1 に特異的な siRNA を導入したところ、いずれの siRNA によっても活性型 M-Ras によって誘導される細胞接着が強く阻害された。また、活性型 M-Ras の共発現により、RA-GEF-2 は細胞質から形質膜に移行した。以上から、活性型 M-Ras からのシグナルは RA-GEF-2 及び Rap1 を介してインテグリン依存性の細胞接着を誘導することが示唆された。</p> <p>次に LFA-1 を発現させた BAF3 細胞に、野生型 M-Ras、H-Ras、Rap1 をそれぞれ導入した後、TNF-α 刺激を行ったところ、野生型 M-Ras を発現した細胞にのみ、選択的</p>
--

<p>に細胞接着が誘導された。この TNF-α 依存性の細胞接着は、RA-GEF-2 や Rap1 の siRNA 導入により阻害された。野生型 M-Ras 発現細胞膜では、TNF-α 依存性の M-Ras-GTP 量の上昇と Rap1-GTP 量の上昇が見られた。以上から、TNF-α は M-Ras-RA-GEF-2-Rap1 経路からインテグリンを介した細胞接着を誘導することが示された。</p>
<p>最後に、RA-GEF-2 遺伝子ノックアウトマウスは、外見上野生型と顕著な差がなかったが、体重比で野生型の約 1.4 倍の脾臓を有していた。RA-GEF-2 は胸腺、脾臓に高発現していることから、これらの細胞の接着能力を比較した。その結果、野生型マウスでは脾臓細胞と胸腺細胞両者が TNF-α 依存性の LFA-1-ICAM-1 相互作用を介した細胞接着を起こしたが、ノックアウトマウスでは、脾臓細胞の TNF-α 依存性接着能力が著明に低下していた。脾臓細胞を B 細胞と T 細胞に分離し、それぞれで TNF-α 依存性の細胞接着能力を調べたところ、B 細胞でのみ、TNF-α 依存性の LFA-1-ICAM-1 相互作用を介した細胞接着が起こり、ノックアウトマウスの B 細胞では著明に低下していた。更に、野生型脾臓細胞の TNF-α 依存性細胞接着は、M-Ras や RA-GEF-2 の siRNA この上昇はノックアウトマウスの脾臓細胞では起こらなかった。以上から、M-Ras-RA-GEF-2-Rap1 経路は、脾臓細胞（特に B 細胞）において TNF-α により誘導されるインテグリンを介した細胞接着を制御していることが個体レベルで示された。</p>
<p>本研究は新規の Rap1-GEF として同定された RA-GEF-2 の作用機構を解析したものであるが、従来殆ど明らかにされていなかった M-Ras-RA-GEF-2-Rap1 経路が、脾臓 B 細胞において TNF-α 依存性のインテグリンを介した細胞接着を制御していることをはじめて証明し、本シグナル伝達系が液性免疫を担う B 細胞の活性化や分化、炎症反応における TNF-α 依存性の細胞接着などの重要な生体现象の制御に関与している可能性を示したものとして価値ある集積と認める。よって、本研究者は博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。</p>