



Roles of Necl-5/Poliovirus Receptor and Rho-associated Kinase (ROCK) in the Regulation of Transformation of Integrin $\alpha v \beta 3$ -based Focal Complexes into Focal Adhesions

永松, 裕一

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2012-07-11

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙3190

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003190>

※ 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。



(論文博士関係)

学位論文の内容要旨

Roles of Nectin-5/Poliovirus Receptor and Rho-associated Kinase (ROCK) in the Regulation of Transformation of Integrin $\alpha_v\beta_3$ -based Focal Complexes into Focal Adhesions

インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 陽性フォーカルコンプレックスからフォーカルアドヒージョンへの移行の制御における Nectin-5 と Rho キナーゼの役割

指導教員 神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

生化学・分子生物学講座分子細胞生物学分野 高井義美 教授

永松 裕一

細胞の運動は生理的には発生や免疫応答などにおいて、病的には血管新生やがんの転移などにおいて重要な役割を果たしている。運動している細胞の先端端にはフィロポディアやラメリポディア、ラッフル、フォーカルコンプレックス (FX)、フォーカルアドヒージョン (FA) などの特徴的な構造が空間的・時間的に形成される。細胞運動の維持には、これらの運動先端端構造が連続的に形成と消失を繰り返すことが必要と考えられている。FX はインテグリンと細胞外基質が緩やかに結合した小さな接着構造である。FX が形成されると細胞内蛋白質がインテグリンの細胞内領域へリクルートされて細胞骨格のリモデリングが起こり、より大きく安定した接着構造である FA が形成される。FX の形成には Rho ファミリー低分子量 G タンパク質である Rac1 や Cdc42 の活性化が関与していることが知られている。一方、FX から FA への移行には Rho や Rho のエフェクターの一つである Rho kinase (ROCK) の活性化が関与していることが知られている。しかし、FX から FA への移行を制御する分子メカニズムはまだ十分には解明されていない。そこで今回、私は FX から FA への移行における免疫グロブリン様接着分子であるネクチン様分子-5 (Nectin-5) と ROCK 経路の役割について検討した。

最初に野生型 NIH3T3 細胞をインテグリン $\alpha_v\beta_3$ の基質であるビトロネクチン上で培養し、Nectin-5 とインテグリン β_3 および FX と FA のマーカーであるリン酸化チロシンの三重免疫染色を行った。ラッフル直下に Nectin-5 とインテグリン β_3 およびリン酸化チロシンが共局在する小さなドット様構造が認められた。一方、運動先端端の後方にインテグリン β_3 とリン酸化チロシンが共局在して Nectin-5 が局在しない大きなドット様構造が認められた。インテグリン α_v の免疫染色もインテグリン β_3 と同様であり、前者の構造をインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 陽性の FX、後者の構造をインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 陽性の FA と定義した。Nectin-5 を安定発現させた Nectin-5-NIH3T3 細胞ではインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 陽性の FX の割合は増加し、インテグ

リン $\alpha_v\beta_3$ 陽性のFAはわずかに認めるのみであった。これらの結果はNec1-5がFXの形成、及びFXからFAへの移行を制御していることを示唆している。

この可能性を検討するために、Nec1-5がネクチン-3と細胞外領域でtransに結合するとエンドサイトーシスによって細胞表面からダウンレギュレーションされる特性を利用して、Nef-3 (ネクチン-3の細胞外領域とIgGのFc領域の融合蛋白質)の前処置により細胞表面のNec1-5をダウンレギュレーションさせた後に細胞を撒くと、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 陽性のFXとFAの形成はともに抑制された。Nef-3による効果はNec1-5の中和抗体を前処置してNef-3によるNec1-5のダウンレギュレーションを阻害すると抑制された。同様にsiRNAによりNec1-5をノックダウンするとインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 陽性のFXとFAの形成は共に阻害されたが、Nec1-5のsiRNA耐性変異体発現細胞ではsiRNAによる効果は抑制された。また、Nef-3やNec1-5 siRNAの前処置を行なっても、別のFAのマーカーであるピンキュリンのシグナルは観察された。これらの結果からFXの形成はFAの形成に必須であること、およびNec1-5はインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 陽性のFXとFAの形成に決定的に関与しており、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ の局在しないピンキュリン陽性のFAの形成には関与しないことが明らかになった。

次に、NIH3T3細胞を撒いて一度インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 陽性のFXとFAが形成された後にNef-3によりNec1-5をダウンレギュレーションさせると、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 陽性のFXからFAへの移行が促進された。この結果より、Nec1-5はインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 陽性のFXからFAへの移行を抑制している可能性が示された。

次に、FXからFAへの移行におけるROCKの役割を明らかにするためにNIH3T3細胞にROCK阻害剤のY-27632を前処置すると、血小板由来増殖因子(PDGF)刺激による細胞運動におけるインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 陽性のFXからFAへの移行が抑制された。反対に、野生型およびNec1-5-NIH3T3細胞に恒常活性化型のROCK1を一過性に発現させるとインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 陽性のFXからFAへの移行は促進された。またEGFP標識インテグリン β_3 を一過性に発現させた野生型

NIH3T3細胞を用いて、PDGF刺激に対するEGFP標識インテグリン β_3 の細胞内動態を共焦点顕微鏡にてリアルタイムに観察した。その結果、野生型NIH3T3細胞ではPDGF刺激に応答してEGFP標識インテグリン β_3 の小さな集積であるFXが認められ、細胞運動に伴ってより大きな集積であるFAへと成熟した。一方、Y-27632によってROCKを阻害すると、FXが辺縁領域において連続的に認められるものの、早期に消失してしまい、FAは形成されなかった。以上の結果から、ROCKはインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 陽性のFXからFAへの移行を促進させていることが明らかになった。

ここまでの結果より、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 陽性のFXからFAへの移行には、FXにおけるNec1-5とインテグリン $\alpha_v\beta_3$ の結合の解離がROCKによって促進されている可能性が考えられた。そこでNec1-5とインテグリン $\alpha_v\beta_3$ の相互作用におけるROCKおよびROCKの下流で引き起こされるミオシン軽鎖のリン酸化やアクチン重合の役割を解析するため、HEK293細胞にNec1-5とインテグリン $\alpha_v\beta_3$ を共発現させて、各種阻害剤を用いて両者の結合を共免疫沈降法にて検討した。その結果、Nec1-5とインテグリン $\alpha_v\beta_3$ の結合はY-27632やミオシンATPase阻害剤、アクチン重合阻害剤により増強し、ミオシンホスファターゼ阻害剤により減弱した。一方、Y-27632によるNec1-5とインテグリン $\alpha_v\beta_3$ の結合増強作用はNec1-5の細胞内領域欠損変異体を用いても同様に認められた。これらの結果から、Nec1-5とインテグリン $\alpha_v\beta_3$ は細胞外領域で相互作用しており、ROCKおよびその下流のミオシン軽鎖のリン酸化やアクチン重合の促進によって解離することが明らかになった。

インテグリン β_3 の747番目のチロシン(Tyr⁷⁴⁷)のリン酸化は、FAの形成に重要であると報告されている。Nec1-5の過剰発現により同部位のリン酸化は減弱した。さらにHEK293細胞を用いた一過性発現系において、Nec1-5とインテグリン $\alpha_v\beta_3$ の結合はインテグリン β_3 のTyr⁷⁴⁷をアラニンに置換した変異体では増強された。しかし、この変異体ではNec1-5とインテグリン $\alpha_v\beta_3$ の結合はY-27632

によってさらに増強されることはなかった。これらの結果から、ROCK 経路の活性化によるインテグリン β_3 の Tyr⁷⁴⁷ のリン酸化が Necl-5 とインテグリン $\alpha_v\beta_3$ の解離に重要であることが示された。

このように、本研究によりインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 陽性の FX から FA への移行は Necl-5 により抑制的に、ROCK により促進的に制御されていること、FX から FA への移行時の Necl-5 とインテグリン $\alpha_v\beta_3$ の結合は ROCK を介したアクチン-ミオシンの収縮によって調節されていること、その結果、連続的な運動先端端の形成と細胞運動がダイナミックに制御されていることが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

受付番号	乙 第2106号	氏 名	永松 裕一
論文題目 Title of Dissertation	Roles of Necl-5/Poliovirus Receptor and Rho-associated Kinase (ROCK) in the Regulation of Transformation of Integrin $\alpha_v\beta_3$ -based Focal Complexes into Focal Adhesions インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 陽性フォーカルコンプレックスからフォーカルア ドヒージョンへの移行の制御における Necl-5 と Rho キナーゼの役割		
審査委員 Examiner	主 査 的 崎 尚 Chief Examiner 副 査 栗 健 Vice-examiner 副 査 衛 康博 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

細胞の運動は生理的には発生や免疫応答などにおいて、病的にはがんの浸潤や転移などにおいて重要な役割を果たす。運動している細胞の先端端には接着分子であるインテグリンが細胞外基質と緩やかに接着した構造であるフォーカルコンプレックス (FX) が形成され、形成された FX は細胞骨格のリモデリングによって、より大きく安定した接着構造であるフォーカルアドヒージョン (FA) へと移行する。FX の形成や FX から FA への移行において Rho ファミリー低分子量 G タンパク質とその下流のシグナル伝達経路の関与が指摘されているものの、詳細な分子機構はまだ十分には解明されていない。本研究では免疫グロブリン様接着分子のネクチンに構造上類似するネクチン様分子の一つである Necl-5 と Rho のエフェクター分子の1つである Rho キナーゼ (ROCK) に着目して、FX から FA への移行の制御機構を解析した。

最初に NIH3T3 細胞をインテグリン $\alpha_v\beta_3$ の基質であるビトロネクチン上で培養し、Necl-5 とインテグリン β_3 の二重免疫染色を行った。ラッフル直下に Necl-5 とインテグリン β_3 が共局在する小さなドット様構造であるインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 陽性の FX が認められた。一方、運動先端端の後方にインテグリン β_3 が共局在して Necl-5 が局在しない大きなドット様構造であるインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 陽性の FA が認められた。

Necl-5 がネクチン-3 と細胞外領域で trans に結合するとエンドサイトーシスによって細胞表面からダウンレギュレーションされる特性を利用して、Nef3 (ネクチン-3 の細胞外領域と IgG の Fc 領域の融合蛋白質) の前処置により細胞表面の Necl-5 をダウンレギュレーションさせた後に細胞を撤くと、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 陽性の FX と FA の形成はともに抑制された。Nef3 による効果は Necl-5 の中和抗体を前処置して Nef3 による Necl-5 のダウンレギュレーションを阻害すると抑制された。また、Nef3 の前処置を行なっても、別の FA のマーカーであるビンキュリンのシグナルは観察された。これらの結果から FX の形成は FA の形成に必須であること、および Necl-5 はインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 陽性の FX と FA の形成に決定的に関与しており、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ の局在しないビンキュリン陽性の FA の形成には関与しないことが明らかになった。

次に、NIH3T3 細胞をビトロネクチン上で培養して、一度インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 陽性の FX と FA が形成された後に Nef3 により Necl-5 をダウンレギュレーションさせると、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 陽性の FX から FA への移行が促進された。この結果より、Necl-5 はインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 陽性の FX から FA への移行を抑制していることが示された。

次に、FX から FA への移行における ROCK の役割を明らかにするために NIH3T3 細胞に ROCK 阻害剤の Y-27632 を前処置すると、血小板由来増殖因子 (PDGF) 刺激による細胞運動におけるインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 陽性の FX から FA への移行が抑制された。反対に、NIH3T3 細胞に恒常活性化型の ROCK1 を一過性に発現させるとインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 陽性の FX から FA への移行は促進された。また EGFP 標識インテグリン β_3 を一過性に発現させた NIH3T3 細胞を用いて、PDGF 刺激に対する EGFP 標識インテグリン β_3 の細胞内動態を共焦点顕微鏡にて経時的に観察すると、PDGF 刺激に反応して EGFP 標識インテグリン β_3 の小さな集

積である FX が認められ、細胞運動に伴ってより大きな集積である FA へと成熟した。一方、Y-27632 によって ROCK を阻害すると、FX が辺縁領域において連続的に認められるものの、早期に消失してしまい、FA は形成されなかった。以上の結果から、ROCK はインテグリン $\alpha_v\beta_3$ 陽性の FX から FA への移行を促進させていることが明らかになった。

以上の結果より、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 陽性の FX から FA への移行には、FX における Necl-5 とインテグリン $\alpha_v\beta_3$ の結合の解離が ROCK によって促進されている可能性が考えられた。そこで Necl-5 とインテグリン $\alpha_v\beta_3$ の相互作用における ROCK および ROCK の下流で引き起こされるミオシン軽鎖のリン酸化やアクチン重合の役割を解析するため、HEK293 細胞に Necl-5 とインテグリン $\alpha_v\beta_3$ を共発現させて、各種阻害剤を用いて両者の結合を共免疫沈降法にて検討した。その結果、Necl-5 とインテグリン $\alpha_v\beta_3$ の結合は Y-27632 やミオシン ATPase 阻害剤、アクチン重合阻害剤により増強した。これらの結果から ROCK、ミオシン ATPase の活性化、アクチン重合へと至るシグナル伝達経路が Necl-5 とインテグリン $\alpha_v\beta_3$ の結合を制御していることが明らかになった。

このように、本研究により、①インテグリン $\alpha_v\beta_3$ 陽性の FX から FA への移行は Necl-5 により抑制的に、ROCK により促進的に制御されていること、②FX から FA への移行時の Necl-5 とインテグリン $\alpha_v\beta_3$ の結合は ROCK を介したアクチン・ミオシンの収縮によって調節されていること、③その結果、連続的な運動先導端の形成と細胞運動がダイナミックに制御されていることが明らかとなった。

本研究は、これまで明らかでなかった FX から FA への移行を制御する分子機構を Necl-5 と ROCK に着目して解明しており、細胞運動の制御機構において重要な知見を得たものとして価値ある業績と認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格を有すると認める。