



|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Regulation of Cell-Cell Adhesion by Rac and Rho Small G Proteins in MDCK Cells                                                                                                                                                                                                                                                              |
| Author(s)    | 高石, 健司                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| Citation     | 大阪大学, 2000, 博士論文                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/42997">https://hdl.handle.net/11094/42997</a>                                                                                                                                                                                                                                                         |
| rights       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| Note         | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> >大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">&lt;/a&gt;</a> をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

|               |                                                                                                                                 |
|---------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名           | 高 石 健 司                                                                                                                         |
| 博士の専攻分野の名称    | 博 士 (医 学)                                                                                                                       |
| 学 位 記 番 号     | 第 1 5 0 7 2 号                                                                                                                   |
| 学 位 授 与 年 月 日 | 平 成 12 年 2 月 15 日                                                                                                               |
| 学 位 授 与 の 要 件 | 学位規則第 4 条第 2 項該当                                                                                                                |
| 学 位 論 文 名     | Regulation of Cell-Cell Adhesion by Rac and Rho Small G Proteins in MDCK Cells<br>(MDCK 細胞における Rac と Rho 低分子量 G 蛋白質による細胞間接着の制御) |
| 論 文 審 査 委 員   | (主査)<br>教 授 松澤 佑次<br>(副査)<br>教 授 高井 義美 教 授 宮坂 昌之                                                                                |

## 論 文 内 容 の 要 旨

### [目的]

Rho 低分子量 G 蛋白質ファミリーは、Rho、Rac、Cdc42 のサブファミリーからなっていて、アクチン細胞骨格を介して細胞の形態、接着、運動、細胞質分裂等の種々の細胞機能を制御していることが明らかにされている。Rho ファミリーの機能は、主に Swiss 3T3 マウス線維芽細胞を用いて検討されていて、Rho はストレスファイバーと接着斑の形成を、Rac はラメリポディアと細胞膜のラッフリングの形成を、Cdc42 はフィロポディアの形成をそれぞれ制御していることが明らかにされている。

一方、アクチン細胞骨格を介する重要な細胞機能のひとつに、細胞間接着がある。しかし、上皮細胞における細胞間接着が、Rho ファミリーによってどのように制御されているかについては明らかにされていない。そこで、本研究では、Rac と Rho による細胞間接着の制御機構を解明する目的で、イヌの腎上皮細胞である MDCK 細胞を用いて、活性型 Rac と不活性型 Rac および活性型 Rho を定常発現した細胞株を樹立し、Rac と Rho の細胞間接着に対する影響を検討した。

### [方法ならびに成績]

#### 1) 変異型 Rac および Rho によるアクチン細胞骨格の変化

活性型 Rac を発現している細胞では、野生型細胞に比して、細胞間接着部位における F-アクチンが著しく濃縮していた。また、濃縮部位の範囲も apical 側から基底膜に至るまで拡大していた。不活性型 Rac を発現している細胞では、細胞間接着部位における F-アクチンの濃縮度は野生型細胞に比して逆に低下していた。活性型 Rho を発現している細胞では、野生型細胞に比して、ストレスファイバーと接着斑の増強が認められたが、細胞間接着部位における F-アクチンの変化は認められなかった。この結果から、Rac は細胞間接着部位における F-アクチンの形成を、Rho はストレスファイバーと接着斑の形成を制御していることが明らかとなった。

#### 2) 変異型 Rac によるカドヘリンとカテニンの局在の変化

変異型 Rac を発現している細胞では細胞間接着部位における F-アクチンの局在が変化していることから、アドヘ

レンスジャンクション (AJ) の構成蛋白質である E-カドヘリンと  $\beta$ -カテニンの局在を検討した。F-アクチンの局在と同じく、活性型 Rac を発現している細胞では、野生型細胞に比して、細胞間接着部位における E-カドヘリン、 $\beta$ -カテニン共に著しく濃縮しており、逆に不活性型 Rac を発現している細胞では、細胞間接着部位におけるこれらの蛋白質の濃縮度は低下していた。これらの結果から、Rac は細胞間接着部位の F-アクチンの形成だけでなく、カドヘリン、カテニンの局在も制御していると考えられる。一方、タイトジャンクション (TJ) の構成蛋白質である ZO-1 はこれら三種類の細胞で差が認められなかった。この結果から Rac は TJ の形成には関与していないと考えられる。

### 3) 変異型 Rac による細胞間接着部位の形態変化

変異型 Rac を発現している細胞の細胞間接着部位の形態を電子顕微鏡で検討した。野生型細胞と不活性型 Rac を発現している細胞では、apical 側の一部が密に接着していたが、活性型 Rac を発現している細胞では、apical 側から基底膜に至るまで密に接着していて、しかも細胞間接着部位は著しく入り組んだ構造を呈していた。E-カドヘリンと  $\beta$ -カテニンの免疫電顕でも、野生型細胞と不活性型 Rac を発現している細胞では、apical 側にこれらの蛋白質は多く局在しているのに対して、活性型 Rac を発現している細胞では、これらの蛋白質は、apical 側から基底膜に至るまで認められ、しかも密に局在していた。これらの結果から、活性型 Rac を発現している細胞では、カドヘリンとカテニンの分布および密度が変化して強い接着形態を示していると考えられる。

### 4) C3 による細胞間接着の阻害

Rho を特異的に ADP リボシル化して Rho の機能を阻害する C3 を、MDCK 細胞にマイクロインジェクションして、細胞間接着に及ぼす影響を検討した。C3 をマイクロインジェクションすると部分的に AJ、TJ 共に破壊された。この結果から、細胞間接着の維持には Rho の活性が必要であることが明らかとなった。しかし、C3 による細胞間接着の破壊は、ストレスファイバーと接着斑の消失より明らかに遅れて認められることから、ストレスファイバーと接着斑の消失、細胞の round-up に伴う二次的な変化と考えられる。

### [総括]

本研究では、活性型 Rac と不活性型 Rac および活性型 Rho を定常発現した MDCK 細胞株を樹立し、Rac が AJ の形成を、Rho がストレスファイバーと接着斑の形成を制御していることを明らかにした。さらに C3 を用いて、Rho が間接的に AJ と TJ の形成を制御していることを明らかにした。Rac は、細胞間接着部位の F-アクチンの形成またはカドヘリンの裏打ち蛋白質に作用して、AJ の形成を制御していると考えられるが、その作用機序の解明が今後の課題であると考えられる。また私共は、Rac の活性が、ホルボールエステル 1 つである TPA によって引き起こされるラメリボディアと細胞膜のラフリングの形成にも必要であることも明らかにしている。Rac の作用が、非刺激時には細胞間接着の形成に働き、TPA 刺激時にはラメリボディアと細胞膜のラフリングの形成に働く機構も、今後の解明されるべき課題であると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

本申請者は、本研究により、Rac と Rho 低分子量 G 蛋白質による細胞間接着の制御について解析を試みた。活性型 Rac と不活性型 Rac および活性型 Rho を定常発現した MDCK 細胞株を樹立し、Rac がアドヘレンスジャンクションの形成を制御していることを世界で初めて明らかにした。さらに、Rho の機能を阻害する C3 を MDCK 細胞にマイクロインジェクションして、Rho が間接的にアドヘレンスジャンクションとタイトジャンクションの形成に関与していることを明らかにした。

本研究は、実験結果自体の意義もさることながら、今後の発展性にも期待できるものがあり、生命科学への貢献度が極めて高い研究であると言える。したがって、学位授与に十分値すると考えられる。