

Title	CD151のC末端はラメリポディアの形成にかかわる
Author(s)	木村, 裕美
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43917
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	木村裕美
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 17625 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学位論文名	CD151 の C 末端はラメリポディアの形成にかかわる
論文審査委員	(主査) 教授 川瀬 一郎 (副査) 教授 宮坂 昌之 教授 高井 義美

論文内容の要旨

〔目的〕

Tetraspanin のメンバーである CD151 は、主に $\alpha 3 \beta 1$ 、 $\alpha 6 \beta 1$ 、 $\alpha 7 \beta 1$ 、 $\alpha 6 \beta 4$ インテグリンと複合体を形成し、これらのインテグリンの機能に関わる。CD151 の C 末端の置換または欠失による mutant はインテグリンとの複合体形成に影響せず、内因性の CD151 に対してドミナントネガティブとして機能する。NIH3T3 細胞では、この mutant の発現細胞は、フィブロネクチン（主に $\alpha 5 \beta 1$ インテグリンのリガンド）上での spreading には影響は認めないが、ラミニン-1（主に $\alpha 6 \beta 1$ 、 $\alpha 3 \beta 1$ インテグリンのリガンド）上での spreading が著明に低下する (Zhang XA, 2002)。このことから、CD151 の C 末端はインテグリンを介した細胞骨格の再編にかかわると考えられる。本研究では、この C 末端の mutant を用いて CD151 の細胞骨格の再編への関与について検討した。

〔方法ならびに成績〕

本研究で用いた細胞は、mouse fibroblast の cell line、NIH3T3 への、ヒト CD151 の細胞内ドメインの C 末端配列 SLKLEHY に相当する部位を他の tetraspanin のメンバーである A15 の C 末端配列 FITANQYEMV に置換した mutant (CD151-c-A15) の stable transfectant、および、ヒト CD151 の wild-type (wt-CD151) の stable transfectant、そして、mock の stable transfectant の 3 種類の cell line を用いた (Zhang XA, 2002)。

ラミニン-1 のコーティング上、無血清条件下で、無添加、PDGF 存在下、PDBu 存在下、Bradykinin 存在下で 30 分後に細胞の spreading を観察した。Mock および wt-CD151 発現細胞では 70-80% が spreading した。CD151-c-A15 発現細胞では 15% と著明に低下し PDGF や Bradykinin の存在下でも回復は少なく、PDBu 存在下で 40% 程度が spreading した。F-actin の染色により観察すると、ラミニン-1 上で CD151-c-A15 発現細胞は mock および wt-CD151 発現細胞に比べラメリポディアの形成が抑制された。ヴィトロネクチン（主に $\alpha v \beta 3$ インテグリンのリガンド）上でも CD151-c-A15 発現細胞は spreading とラメリポディアの形成が抑制された。フィブロネクチン上ではどの細胞にもストレスファイバーの形成が誘導された。フィブロネクチン上でも部分的にラメリポディアの形成が観察されるが、CD151-c-A15 発現細胞では形成が抑制された。CD151 の細胞での分布を蛍光染色にて観察すると、wt-CD151 は細胞内およびラメリポディアを含む細胞周囲に分布するが、CD151-c-A15 ではラメリポディア部位への分布が欠如していた。PDBu で刺激すると wt-CD151 発現細胞では強いラップリングと wt-CD151 の同部位への分布を認めた。

CD151-c-A15 発現細胞でもラフリングは観察されるが抑制され、CD151-c-A15 のラフリング部分への分布は観察されなかった。

これらのことから、CD151 は、インテグリンだけでなく他の膜タンパクとの相互作用によりラメリポディア形成にかかわることが考えられる。CD44 はヒアルロン酸などの細胞外基質の膜貫通型レセプターであり、細胞骨格の制御にかかわり、ラメリポディアへの分布が報告されている。そこで、ガラスチャンバーを CD44 に対する mAb、IM7 でコーティングし spreading を観察した。Mock および wt-CD151 発現細胞では 70%以上の細胞が spreading しフィロポディアとラメリポディアの形成を認めたが、CD151-c-A15 発現細胞では著明な spreading の低下を認め、細胞周囲への CD151-c-A15 の分布は観察されず、フィロポディアとラメリポディアの形成も不良であった。CD44 との複合体形成を免疫沈降を行いウェスタンブロットで検討したところ、wt-CD151 では CD44 との複合体形成を認めたが、CD151-c-A15 では認めなかった。

〔総括〕

本研究では、CD151 の C 末端が細胞骨格の制御に関わることを示した。CD151-c-A15 発現細胞ではラメリポディア形成が抑制され、CD151-c-A15 の細胞周囲およびラメリポディア部位への分布が欠如していたことは、ラメリポディアの形成には CD151 が細胞膜先進部に正しくターゲティングされることが大切であり、また CD151 の C 末端が膜へのターゲティングや細胞内輸送に関わることを示唆する。CD151-c-A15 発現細胞では、immobilized 抗 CD44 抗体上での細胞骨格の再編が著明に抑制され、CD44 のかかわる細胞骨格の再編に、インテグリン-tetraspanin 複合体との相互作用が必要である可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

Tetraspanin のメンバーである CD151 は $\alpha 3 \beta 1$ 、 $\alpha 6 \beta 1$ インテグリンと複合体を形成する。CD151 の C 末端の 8 アミノ酸を、別のテトラスパニンである A15 の C 末端の 10 アミノ酸に置換した mutant、CD151-c-A15 はインテグリンとの結合能には影響せず、内因性の CD151 と競合し、CD151 の C 末端に関わるインテグリンの機能のドミナントネガティブとして作用する。本研究では、この C 末端の mutant を用いて CD151 の C 末端が細胞骨格の制御に関わることを示した。ラミニン-1 上で spreading 時に CD151-c-A15 発現細胞では JNK のリン酸化が抑制された。CD151-c-A15 発現細胞ではラメリポディア形成が抑制され、CD151-c-A15 の細胞周囲およびラメリポディア部位への分布が欠如していた。本研究によりラメリポディアの形成には CD151 が細胞膜先進部に位置することが重要であり、また CD151 の C 末端が細胞内輸送に関わることを示された。CD151-c-A15 発現細胞では、immobilized 抗 CD44 抗体上での、細胞骨格の再編が著明に抑制されたことから CD44 によるラメリポディア形成に CD151 の C 末端が重要な働きをしていることが示された。CD151 は、上皮細胞や血管内皮細胞に高発現しており、以上の結果は肺の形態維持や血管形成などの形態形成等において CD151 分子の C 末端が重要であることを示唆している。

よって本研究は、博士（医学）の学位授与に値するものと認める。