



Title	trans-Interactions of Nectins Induce Formation of Filopodia and Lamellipodia through the Respective Activation of Cdc42 and Rac Small G Proteins
Author(s)	川勝, 智生
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45431">https://hdl.handle.net/11094/45431</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">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">ご参照ください</a> 。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	川 勝 智 生
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 19264 号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	<i>trans</i> -Interactions of Nectins Induce Formation of Filopodia and Lamellipodia through the Respective Activation of Cdc42 and Rac Small G Proteins (ネクチンの相互作用は、低分子量 G タンパク質 Cdc42 と Rac の活性化を介して、フィロポディアとラメリポディアの形成をひき起こす。)
論文審査委員	(主査) 教授 高井 義美  (副査) 教授 松田 道行 教授 宮坂 昌之

### 論文内容の要旨

#### [ 目的 ]

上皮細胞の細胞間接着にはタイトジャンクションやアドヘレンスジャンクション (AJ) が存在する。AJ には接着分子であるカドヘリンとネクチンが局在し、細胞内でそれぞれカテニンとアファディンを結合している。ネクチンは免疫グロブリンスーパーファミリーに属する接着分子であり、アクチンフィラメント結合タンパク質アファディンを介してアクチン細胞骨格と連結している。ネクチンファミリーにはネクチン-1、-2、-3、-4 があり、ホモフィリックまたはファミリー間 (ネクチン-1 と -3、-2 と -3、-1 と -4) でヘテロフィリックな結合をする。低分子量 G タンパク質 Cdc42 と Rac は、AJ の形成に関係していると言われているが、その詳細は不明である。本研究では、ネクチンの融合タンパク質を用いて、AJ 形成におけるネクチンと低分子量 G タンパク質との関係について解析した。

#### [ 方法ならびに成績 ]

##### ネクチン同士の接着によるフィロポディアとラメリポディア形成の解析

ネクチン-1、-2、-3 の細胞外ドメインをヒト IgG Fc 領域に融合させたキメラタンパク質 (Nef-1、-2、-3) を作製した。更に、Nef-3 を抗ヒト Fc 抗体を用いてラテックスビーズに固相化した Nef-3 ビーズを作成した。ネクチン-1 と E-カドヘリンを共に発現させた L 細胞 (ネクチン-1-EL 細胞) を Nef-3 ビーズと培養すると、細胞とビーズの接着部位にフィロポディアとラメリポディアを形成した。Nef-3 をコートしたディッシュ上でネクチン-1-EL 細胞を培養すると、まずフィロポディアを形成し、その後ラメリポディアを形成した。ネクチン-1 を発現させた L 細胞 (ネクチン-1-L 細胞)、ネクチン-1 を発現させた MDCK 細胞 (ネクチン-1-MDCK 細胞) でも同様の結果が得られた。以上の結果から、ネクチン同士の接着によって、フィロポディアとラメリポディアが形成されることが明らかになった。

##### Nef-3 の作用における Cdc42 と Rac の働きの解析

ネクチンの相互作用によるフィロポディアとラメリポディアの形成における Cdc42 と Rac の関与について、Nef-3 を用いて検討した。NWASP-CRIB を発現させたネクチン-1-L 細胞を Nef-3 をコートしたディッシュ上で培養すると、

フィロポディアとラメリポディアの形成は減少した。Rac1 のドミナントネガティブ変異体を発現させた細胞では、ラメリポディアの形成が減少した。以上の結果から、Nef-3 によるフィロポディアとラメリポディアの形成は、それぞれ Cdc42 と Rac の活性化を介していることが明らかになった。

#### Nef-3 による Cdc42 と Rac の活性化の解析

GFP-Cdc42 または GFP-Rac1 を発現させたネクチン-1-L 細胞を Nef-3 ビーズと培養すると、細胞とビーズの接着部位にそれぞれ Cdc42 と Rac のシグナルが見られた。次に、Cdc42 と Rac の活性化を見るために、プルダウンアッセイを行った。ネクチン-1-MDCK 細胞に Nef-3 溶液を添加した。その後、GST・PAK・CRIB を含む可溶性溶液中で可溶化し、プルダウンアッセイした。Nef-3 溶液を添加後 30 分で、Cdc42 と Rac の活性化が見られた。これらの結果より、ネクチン同士の相互作用によって、Cdc42 と Rac の活性化が起こることが明らかになった。

#### [ 総括 ]

今回、ネクチン同士が接着すると、Cdc42 と Rac の活性化が起こり、それぞれフィロポディアとラメリポディアを形成することを見出した。これらの結果から、上皮細胞の AJ 形成の過程として次のようなモデルが考えられる。2つの上皮細胞が接触するとまず、ネクチン同士が結合し Cdc42 を活性化して、接着面を形成する。次にその接着面にカドヘリンがリクルートされ、Rac が活性化され、両者が協調的に AJ を形成することが考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

上皮細胞のアドヘレンスジャンクション (AJ) にはカドヘリン-カテニン系以外にネクチン-アファディン系が存在する。また、低分子量 G タンパク質 Cdc42 と Rac は、AJ の形成に関係していると言われていたが、その詳細は不明であった。

本申請者は、本研究において、ネクチン同士の結合により、フィロポディア、ラメリポディアが形成されることを見出した。また、ネクチン同士の結合によって、Cdc42 と Rac が活性化されることを見出した。以上の結果から、ネクチン同士が接着すると、Cdc42 と Rac の活性化が起こり、それぞれフィロポディアとラメリポディアを形成することを明らかにした。さらに、AJ の形成に関与することが示唆された。

本研究は、実験結果自体の意義もさることながら、今後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、学位に値すると考える。