



Title	Involvement of the Ras-Ras-activated Rab5 guanine nucleotide exchange factor RIN2-Rab5 pathway in the HGF-induced endocytosis of E-cadherin
Author(s)	木村, 敏啓
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46187
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について こちら 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 き 木 村 とし ひろ 敏 啓

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 20142 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 18 年 3 月 24 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

医学系研究科臓器制御医学専攻

学 位 論 文 名 Involvement of the Ras-Ras-activated Rab5 guanine nucleotide exchange factor RIN2-Rab5 pathway in the HGF-induced endocytosis of E-cadherin
(HGFによりおこる E-cadherin のエンドサイトーシスには Ras-RIN2 (Rasにより活性化される Rab5 の GDP-GTP exchange factor) -Rab5 の系が関与している。)

論 文 審 査 委 員 (主査)
教 授 村 田 雄 二

(副査)
教 授 中 村 敏 一 教 授 米 田 悦 啓

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

細胞の接着・離脱には、主要な接着分子であるカドヘリンが関与している。HGF などの増殖因子刺激による細胞の離脱の一つの機構として、カドヘリンのエンドサイトーシスが考えられている。本研究では、HGF 刺激によるカドヘリンのエンドサイトーシスの分子機構について E-カドヘリンのエンドサイトーシスの無細胞再構成実験系などを用いて検討した。

〔 方法ならびに結果 〕

HGF 刺激による E-カドヘリンのエンドサイトーシスの亢進

まず、ラットの肝臓より以前報告された方法にて Adherens Junction (AJ) membrane fraction を単離した。この AJ membrane fraction を用いて、E-カドヘリンのエンドサイトーシスの無細胞再構成実験系を用いてエンドサイトーシスされた E-カドヘリンの量を測定した。HGF 刺激を加えることにより、エンドサイトーシスされる E-カドヘリンの量は増加した。

HGF 刺激による Ras、Rab5 の関与

AJ membrane fraction を介し、HGF 刺激による Ras、Rab5 の 35S GTP γ S との結合 (GDP-GTP exchange) について測定したところ、Ras、Rab5 はともに HGF 刺激により、GTP との結合が増加し活性化された。また、RBD (Raf の Ras binding domain) および Ras 抗体を用いて Ras を block し、同様の検討を行ったところ、Rab5 の GTP の結合が抑制された。このことより、HGF 刺激により、AJ を介して Ras、Rab5 はともに活性化されることがわかった。さらにその Rab5 の活性化には Ras の活性化が必要であることがわかった。

E-カドヘリンのエンドサイトーシスにおける、Ras、Rab5 の関与

次に E-カドヘリンのエンドサイトーシスの無細胞再構成実験系を用いて、Ras、Rab5 の関与について調べた。AJ

membrane fraction を RabGDI とともに preincubation し、AJ membrane fraction に含まれる Rab を取り除いたところ、エンドサイトーシスされる E-カドヘリンは減少した。そこに Rab5 を加えることにより、エンドサイトーシスされる E-カドヘリンは再び増加した。また RBD (Raf の Ras binding domain) および Ras 抗体を用いて同様の検討を行った。Ras をブロックすることにより、HGF 刺激による E-カドヘリンのエンドサイトーシスは減少した。よって、HGF 刺激による E-カドヘリンのエンドサイトーシスにおいて Ras、Rab5 はともに関与していることがわかった。さらに Rab5 は Ras の下流にあることが確認された。

RIN2

Ras、Rab5 とをつなぐ分子として今回我々は RIN2 (Ras interaction 2) に注目した。RIN2 は Rab5 の GEF (GDP/GTP Exchange Factor) として以前に報告されている。まず、RIN2 と Ras との結合について検討した。RIN2 は GDP 結合型の Ras より GTP 結合型の Ras に特異的に結合することを確認した。さらに RIN2 の Rab5 に対する GEF 活性は、GTP 結合型の Ras 存在下で上昇した。E-カドヘリンのエンドサイトーシスの無細胞再構成実験系においても、RIN2 は GTP 結合型の Ras 存在下において E-カドヘリンのエンドサイトーシスを増加させた。また MDCK 細胞を用いた細胞染色において、RIN2 を強制発現させると、E-カドヘリンのエンドサイトーシスは増加した。RIN2 の double point mutant (dominant negative) を作成しそれを MDCK 細胞に強制発現させると E-カドヘリンのエンドサイトーシスは減少した。さらに RIN2 の siRNA を作成し MDCK 細胞を RNAi により RIN2 の knock-down を行ったところ HGF 刺激による E-カドヘリンのエンドサイトーシスは抑制された。

[総括]

HGF による細胞の離脱の一つの機構として、カドヘリンのエンドサイトーシスが考えられている。その分子機構を明らかにした。HGF 刺激によって活性化された Ras は RIN2 に結合して、Rab5 を活性化することにより、E-カドヘリンのエンドサイトーシスを促進していると考えられる。

論文審査の結果の要旨

上皮細胞の細胞間接着部において、増殖因子のひとつである HGF (hepatocyte growth factor) の刺激により細胞間接着は破壊され、細胞は scattering を起こす。このとき Adherens Junction (AJ) において、E-カドヘリンは細胞内に endocytosis を起こすことが明らかになっている。この endocytosis に低分子量 G 蛋白質 Rab5 が関与していることは、明らかになっていたが詳細な分子機構は未だ十分解明されていなかった。

本申請者は、本研究において、HGF 刺激による E-カドヘリンの endocytosis のシグナル伝達について検討した。

その結果、HGF 刺激により HGF のレセプターである c-Met を介して活性化された Ras が RIN2 と結合し、その複合体が Rab5 を活性化し、E-カドヘリンの endocytosis を起こすことを見出した。

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。