

Title	Plexin-B1による細胞骨格の制御とその分子機構の解析
Author(s)	小林, 千恵
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46398
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	こ ばやし ち え 小 林 千 恵
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学位記番号	第 20204 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 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学位論文名	Plexin-B1による細胞骨格の制御とその分子機構の解析
論文審査委員	(主査) 教 授 古 郷 幹 彦 (副査) 教 授 吉 田 篤 助 教 授 村 上 秀 明 講 師 和 田 孝 一 郎

論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】 Plexin は、神経回路形成過程において軸索の成長円錐の反発性ガイダンス因子として同定された semaphorin の作用を伝達する、細胞膜貫通型のタンパク質である。近年、semaphorin と plexin を介したシグナルが、神経系のみならず、血管系や上皮系において、細胞骨格に影響するシグナルを伝達し、器官形成、脈管形成、腫瘍の侵襲性増殖等に関与していることが示唆され始めている。これらの細胞機能の制御に関わるシグナル伝達機構の詳細は不明であるが、低分子 G タンパク質のいくつかは、plexin-B1 を介したシグナル伝達に関与しているといわれている。最近、インテグリン、チロシンキナーゼ型受容体である Met (肝細胞成長因子受容体) と ErbB-2 (上皮成長因子受容体) が、plexin-B1 と相互作用していることが明らかになった。Plexin-B1 と相互作用する分子は数多く存在し、これらがシグナル伝達を行う複合体を形成し、Sema4D-plexin-B1 による様々な物理学的機能に必要であることが示唆されている。そこで、本研究では、アクチン細胞骨格に変化を引き起こす Sema4D-plexin-B1 シグナルに着目し、低分子 G タンパク質や他の分子との関連を含めて、細胞内シグナル伝達機構および細胞形態の制御機構について解析を行った。

【方法】 野生型 plexin-B1 (B1wt) より、細胞内領域を欠損させた変異体 B1 Δ cd、B1 Δ cd2、細胞外領域を欠損させた B1 Δ ex 変異体を作製し、非神経細胞の HEK293 細胞に遺伝子導入して強制発現させ、以下の実験に使用した。細胞の形態変化は、免疫組織学的染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡下にて割合を算出、数値化した。Sema4D は、1 nM の濃度で使用した。低分子 G タンパク質の阻害には、不活性型との共発現あるいは、阻害剤を反応させた。細胞の接着実験と遊走実験には、CHO 細胞を使用した。

【結果と考察】 B1wt は、丸く大きく伸展したラメリポディア (タイプ1-ラメリポディア) と、ラメリポディアを形成した複数の突起をもつもの (タイプ2-ラメリポディア) の2種のラメリポディア形成と血清依存性の細胞の縮小化を誘導したが、B1 Δ cd はタイプ2-ラメリポディアのみを誘導し、B1 Δ cd2 および B1 Δ ex はいずれも誘導しなかった。Sema4D は、B1wt 発現細胞においてのみ、細胞の縮小化を促進した。ラメリポディア形成には Rac1 と RhoA の両方が必要であることを明らかにし、さらに、RhoA のエフェクターとして、ROCK が必要であることを示した。また、plexin-B1 の C 末端へ PDZ-RhoGEF/LARG が結合し、その下流で RhoA が活性化することが、タイプ1-ラメリポディア形成に必要であることを示した。タイプ2-ラメリポディア形成には、B1 Δ cd の領域が必要であり、主に Rac1 が関与していることが示唆された。Sema4D-plexin-B1 による細胞の縮小化作用には、Rac1 は必要ではなく、

plexin-B1/RhoGEF を介した RhoA 活性が必要であった。Plexin-B1 発現によってマイルドな RhoA 活性化と Rac1 活性が生じると、ラメリポディア形成が誘導されるが、Sema4D によって RhoA 活性が増強すると、細胞の縮小化へシグナルがシフトすることが示唆された。ラメリポディアは、細胞運動の極性構築に重要な構造であり、運動する細胞の leading edge を構成するものであるが、ラメリポディアを形成する B1wt、B1 Δ cd 発現細胞の遊走能は低下していた。タイプ1、タイプ2-ラメリポディアの両者は、FAK 発現を欠くラメリポディアであり、plexin-B1 シグナルがインテグリンシグナルあるいは接着斑形成を抑制した結果、細胞極性が構築できず、細胞運動が低下したと考えられた。さらに、インテグリンの活性化により plexin-B1 に誘導されるラメリポディア形成が抑制され、plexin-B1 とインテグリンの両者のシグナルが、相互に抑制的に作用していることが示唆された。さらに、タイプ1-ラメリポディア形成に ErbB-2 が関与していることが明らかとなり、ErbB-2 は、RhoA 活性化に関与することによって、plexin-B1 に誘導されるラメリポディア形成を制御していると考えられた。

【結語】 Plexin-B1 は、低分子 G タンパク質を介してアクチン細胞骨格系にシグナルを伝達し、ラメリポディア形成と血清依存性の細胞の縮小化を誘導することが明らかとなった。ラメリポディア形成には Rac1 と RhoA の両方が必要であり、インテグリンと ErbB-2 の関与が示され、細胞の縮小化には RhoA のみに関与していた。Plexin-B1 によって誘導されるラメリポディアは、運動能が低下していた。

論文審査の結果の要旨

本研究は、アクチン細胞骨格に影響を及ぼす Sema4D-plexin-B1 の細胞内シグナル伝達機構の解析を行ったものである。その結果、plexin-B1 は、低分子 G タンパク質の Rac1 と RhoA の両方を介してラメリポディア形成を誘導し、また、血清依存性の細胞の縮小化を誘導することが明らかとなった。本研究は、博士（歯学）の学位申請に値することを認めるものである。