

Title	Interaction of Integrin $\alpha v \beta 3$ with Nectin INPLICATION IN CROSS-TALK BETWEEN CELL-MATRIX AND CELL-CELL JUNCTIONS
Author(s)	坂本, 泰久
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/47349
DOI	
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名	坂本 泰久
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 20910 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 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	Interaction of Integrin $\alpha_v\beta_3$ with Nectin : <i>IMPLICATION IN CROSS-TALK BETWEEN CELL-MATRIX AND CELL-CELL JUNCTIONS</i> (インテグリン $\alpha_v\beta_3$ とネクチンの相互作用を介した細胞-基質間接着と細胞間接着のクロストーク)
論文審査委員	(主査) 教授 高井 義美 (副査) 教授 宮坂 昌之 教授 米田 悦啓

論文内容の要旨

[目 的]

細胞間接着装置のアドヘレンスジャンクション (Adherens junction : AJ) における主要な細胞間接着分子としてカドヘリンとネクチンが存在する。ネクチンは免疫グロブリン様の細胞間接着分子で、4つのメンバーからファミリーを形成し、細胞内ではアフアディンを介してアクチン細胞骨格と連結している。これまでにネクチンがトランス結合すると c-Src を介して低分子量 G タンパク質 Rac、Cdc42 が活性化され、アクチン細胞骨格の再編成により細胞間接着の形成を促進することが明らかになっている。一方、細胞の分化、増殖、運動の制御において細胞-基質間接着と細胞間接着のクロストークは重要である。しかしこのクロストーク機構は十分に解明されていない。そこで本研究では細胞-基質間接着を担うインテグリンと細胞間接着分子ネクチンに焦点をあて、細胞間接着の形成における両者のクロストークの分子メカニズムについて検討した。

[方法ならびに成績]

ネクチンとインテグリン $\alpha_v\beta_3$ の物理的相互作用の解析

マウス線維芽細胞の NIH3T3 細胞の AJ において、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ とネクチン-3 が共局在した。イヌ腎上皮細胞である MDCK 細胞でも同様の現象が観察された。ネクチン-1 の細胞外領域と IgG Fc 領域の融合タンパク質 Nef-1 でコートしたビーズを NIH3T3 細胞と共培養すると、NIH3T3 細胞表面のネクチン-3 は Nef-1 と結合し、細胞-ビーズ接着部位に集積した。この時、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ も細胞-ビーズ接着部位に集積したことからインテグリン $\alpha_v\beta_3$ とネクチン間の物理的相互作用が示唆された。NIH3T3 細胞を用いて免疫沈降実験を行ったところ、ネクチン-3 とインテグリン $\alpha_v\beta_3$ が共沈降し両者は in vivo で複合体を形成していた。組換えタンパク質を用いた in vitro 結合実験の結果、ネクチン-3 とインテグリン $\alpha_v\beta_3$ は細胞外領域を介して直接結合していた。ところで、インテグリン $\alpha_v\beta_3$ は基質との親和性の高い活性化型と親和性の低い不活性化型に変化することが知られている。インテグリン $\alpha_v\beta_3$ の構造変異体を用いて免疫沈降実験を行ったところ、ネクチン-3 は活性化型と不活性化型両方のインテグリン $\alpha_v\beta_3$ と結合した。以上の結果からネクチンとインテグリン $\alpha_v\beta_3$ は AJ で共局在し直接結合していることが明

らかになった。

ネクチンとインテグリン $\alpha v \beta 3$ の機能的相互作用の解析

ネクチンと直接結合しているインテグリン $\alpha v \beta 3$ がネクチンのシグナル伝達と AJ 形成にどのように関与しているのか検討した。インテグリン $\alpha v \beta 3$ 阻害薬の存在下ではネクチンによる c-Src、Rac、Cdc42 の活性化が抑制された。また、恒常的活性化型変異体のインテグリン $\alpha v \beta 3$ を NIH3T3 細胞に発現させるとネクチンによる Rac、Cdc42 の活性化は促進された。一方、RNA 干渉法によりインテグリン $\beta 3$ をノックダウンした場合、またはインテグリン $\alpha v \beta 3$ の細胞内シグナル分子 FAK のドミナントネガティブ変異体を細胞に発現させた場合、ネクチンによる c-Src、Cdc42、Rac の活性化は抑制された。活性化型のインテグリン $\alpha v \beta 3$ を認識する抗体を用いて免疫染色を行った結果、AJ 形成過程における初期の細胞間接着部位でネクチン-3 と活性化型のインテグリン $\alpha v \beta 3$ は共局在した。AJ 形成後にはインテグリン $\alpha v \beta 3$ は不活性化型へと変化するもののネクチン-3 と共局在したままであった。さらに、インテグリン $\alpha v \beta 3$ 阻害薬の存在下ではネクチンによる AJ 形成は抑制された。以上の結果からネクチンによる細胞内シグナル分子の活性化および AJ 形成にはインテグリン $\alpha v \beta 3$ の活性化が必要であることが明らかになった。

[総 括]

今回の結果から、インテグリン $\alpha v \beta 3$ とネクチンは以下のように AJ 形成に関与していると考えられる。AJ 形成の初期ではネクチン-3 は活性化型インテグリン $\alpha v \beta 3$ と共局在し両者は物理的に相互作用する。ネクチンによる c-Src、Rac、Cdc42 の活性化と AJ 形成にはインテグリン $\alpha v \beta 3$ と FAK の活性化が必要である。しかし、いったん AJ が形成されるとインテグリン $\alpha v \beta 3$ は何らかの機構によって不活性化され、ネクチンによるシグナル分子の活性化も抑制される。このようにインテグリン $\alpha v \beta 3$ とネクチンは細胞-基質間接着と細胞間接着のクロストークにおいて重要な役割を果たしている。

論文審査の結果の要旨

細胞間接着を担う接着装置の一つにアドヘレンスジャンクション (AJ) がある。AJ は、まず接着分子ネクチンが細胞間接着を形成し、その部位にカドヘリンをリクルートして形成される。一方でこれまでに細胞間接着の形成には細胞-基質間接着が関与しているとの報告があるが、その分子メカニズムについてはよく分かっていない。

申請者は本研究において細胞間接着の形成におけるインテグリンとネクチンのクロストークについて検討した。インテグリン $\alpha v \beta 3$ はネクチン-3 と AJ において複合体を形成しており、ネクチンによる AJ 形成にはインテグリン $\alpha v \beta 3$ の活性化が必要であることを見出した。さらに、AJ でネクチン-3 と共局在するインテグリン $\alpha v \beta 3$ は AJ 形成の初期では活性化状態であったが、AJ 形成後には不活性化状態に変化することを見出した。

本研究は細胞-基質間接着と細胞間接着のクロストークについての全く新しいモデルを提示し、細胞運動と細胞間接着の密接な相互関係を解き明かす鍵となる研究であった。よって申請者は博士 (医学) の学位授与に値する。