

Title	Regulation of platelet-derived growth factor-induced Ras signaling by poliovirus receptor Necl-5 and negative growth regulator Sprouty2
Author(s)	梶田, 美穂子
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/47354">http://hdl.handle.net/11094/47354</a>
DOI	
rights	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

氏名	梶 田 美穂子
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 20909 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	Regulation of platelet-derived growth factor-induced Ras signaling by poliovirus receptor Necl-5 and negative growth regulator Sprouty2 (ポリオウィルス受容体 Necl-5 と増殖抑制因子 Sprouty2 による PDGF に誘導される Ras シグナルの制御)
論文審査委員	(主査) 教授 高井 義美  (副査) 教授 中村 敏一 教授 岡田 雅人

## 論文内容の要旨

### 〔 目 的 〕

正常細胞を培養すると、細胞はコンフルエントになるまで運動と増殖を続け、コンフルエントになると細胞間接着が形成され、細胞の運動と増殖は停止する。この現象は古くから接触阻害として知られているが、その分子機構の詳細は不明である。一方、がん細胞ではこの現象は消失している。ポリオウィルス受容体として知られている Necl-5 は細胞の運動や増殖を促進する。しかし、細胞同士の接触によって Necl-5 とネクチン-3 がトランス結合すると、細胞膜表面の Necl-5 はエンドサイトーシスによって減少し、その結果、細胞の運動と増殖が抑制される。以上のことから、Necl-5 は少なくとも接触阻害の制御因子の一つであることが明らかとなっている。これまでに、Necl-5 による増殖シグナルの促進は PDGF 受容体の下流、Ras の上流が作用点であることが明らかとなっていたが、この促進の分子機構は不明であった。一方、Necl-5 と同様の作用点をもつ Sprouty (Spry) という Ras シグナルを負に調節する新規の制御因子が同定されている。そこで私は、Necl-5 と Spry は相反する機能を持つが、その作用点が同じであることに着目し、Necl-5 と Spry の物理的・機能的相互作用による Ras シグナルの制御について解析し、Necl-5 による Ras シグナルの促進機構と接触阻害との関係について検討した。

### 〔 方法ならびに成績 〕

#### I. 細胞密度に依存した Ras シグナルの変化

NIH3T3 細胞を血清存在下で低密度 (スパース) または高密度 (コンフルエント) で培養し、Ras とその下流の ERK の活性化状態について解析した。その結果、低い細胞密度の方が高い細胞密度よりも Ras と ERK の活性化は共に強くなっていた。このことは、Necl-5 が高い細胞密度で減少することと一致していた。一方、低い細胞密度の時に RNA 干渉法で Necl-5 をノックダウンすると増殖が低下する。そこで、低い細胞密度で Necl-5 をノックダウンした時の Ras と ERK の活性化を検討した。その結果、Necl-5 のノックダウンによって Ras と ERK の活性化は抑制された。以上の結果から、細胞密度に依存した Necl-5 の量の変化が、細胞密度に依存した Ras シグナルと密接に関係していることが明らかとなった。

## II. Necl-5 と Spry2 の物理的相互作用

Spry は Spry1-4 のメンバーからなるファミリーを構成するが、NIH3T3 細胞では Spry2 が高発現している。そこで、NIH3T3 細胞を用いて Necl-5 と Spry2 が物理的に相互作用しているか検討した。Necl-5 は低い細胞密度の時、運動している細胞の先端端に濃縮する。免疫蛍光染色により内在性の Spry2 を染色した結果、Spry2 は先端端の Necl-5 と共局在していた。この共局在は、Necl-5 の過剰発現によって増強され、Necl-5 のノックダウンによって減弱した。次に、Necl-5 と Spry2 の結合を免疫沈降法で検討した。NIH3T3 細胞を低密度または高密度で培養し、内在性の Spry2 を抗 Spry 抗体で免疫沈降した。その結果、低密度、高密度ともに Spry2 は免疫沈降されたが、内在性の Necl-5 は低い細胞密度の時にしか共免疫沈降されなかった。以上の結果から、Necl-5 は細胞密度依存的に Spry2 と物理的に相互作用していることが明らかとなった。

## III. Necl-5 と Spry2 の機能的相互作用

Necl-5 と Spry2 の機能的相互作用について、PDGF 刺激による Ras シグナル (Ras と ERK) の活性化を測定することで検討した。血清には多くの増殖因子が含まれているため、PDGF 刺激をするには細胞を血清飢餓状態にする必要がある。しかし、細胞を血清飢餓状態にすると内在性の Spry2 は速やかに分解された。そこで、Spry2 が分解されないように外来的に Spry2 を強制発現させ、細胞を低密度または高密度で培養し、血清飢餓状態にしてから PDGF 刺激を行った。高い細胞密度の時、外来性 Spry2 は Ras シグナルを抑制した。一方、低い細胞密度の時、外来性 Spry2 は Ras シグナルを抑制しなかった。Necl-5 は高い細胞密度で減少するが、Necl-5 を過剰発現させると、高い細胞密度での外来性 Spry による Ras シグナルの抑制が阻害された。また、Necl-5 をノックダウンすると、低い細胞密度でも外来性 Spry2 は Ras シグナルを抑制した。以上の結果から、Spry2 による Ras シグナルの抑制作用は Necl-5 の量に依存して阻害されることが明らかとなった。

## IV. Necl-5 による Spry2 のチロシンリン酸化の抑制

Spry2 による Ras シグナルの抑制は、増殖因子によって活性化された c-Src が Spry2 のチロシン残基をリン酸化することで起こる。そこで、III と同様の方法で PDGF 刺激を行い、外来性 Spry2 を免疫沈降し、外来性 Spry2 のチロシンリン酸化の状態を解析した。その結果、Ras シグナルの抑制が認められた高い細胞密度の NIH3T3 細胞および低い細胞密度の Necl-5 がノックダウンされた細胞の場合に、外来性 Spry2 のチロシンが強くリン酸化されていた。Necl-5 は相手の細胞のネクチン-3 との結合をきっかけとしたエンドサイトーシスによって減少するが、細胞をネクチン-3 の細胞外領域のリコンビナントタンパク質 (Nef-3) とインキュベートしても同様に Necl-5 は減少する。そこで、低い細胞密度の時に Nef-3 で Necl-5 のエンドサイトーシスを誘導し、PDGF 刺激による外来性 Spry2 のチロシンリン酸化を検討した。その結果、Nef-3 とインキュベートした細胞では、PDGF 刺激によって Spry2 のチロシンが強くリン酸化された。以上の結果から、Necl-5 と Spry2 が物理的に相互作用していると Spry2 のチロシンリン酸化は抑制され、Spry2 と Necl-5 が相互作用しなくなると Spry2 がチロシンリン酸化されることが明らかとなった。

### [ 総括 ]

細胞密度が低い時、Necl-5 は物理的に Spry2 と相互作用し、この相互作用は Spry2 による Ras シグナルの抑制作用を阻害した。Spry2 による Ras シグナルの抑制は増殖因子によって活性化された c-Src による Spry2 のチロシンリン酸化によって引き起こるが、Necl-5 は Spry2 との物理的相互作用によってこのチロシンリン酸化を抑制し、その結果、Ras シグナルの抑制作用を阻害すると考えられた。また、細胞密度が高い時、Necl-5 の減少によって Spry2 と Necl-5 の相互作用はなくなり、Spry2 はチロシンリン酸化され、その結果、Ras シグナルを抑制すると考えられた。したがって、Necl-5 による Ras シグナルの促進は、Necl-5 が Ras シグナルの抑制制御因子 Spry の機能を阻害することが一つの要因であると考えられた。また、細胞密度に依存して Necl-5 が減少し、それに伴って Spry2 による Ras シグナルの抑制作用が発揮されることから、両者の物理的、機能的相互作用が細胞の増殖の接触阻害の制御機構の一つであると考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

Necl-5 は、PDGF（血小板由来増殖因子）によって誘導される Ras-Raf-MEK-ERK シグナル（Ras シグナル）を促進する。その作用点は PDGF 受容体の下流、Ras の上流であるが、その分子機構は明らかではない。本申請者は、Necl-5 と同じ作用点で Ras シグナルを抑制する因子 Sprouty2 に着目し、Necl-5 と Sprouty2 の相互作用による Ras シグナルの制御について解析した。その結果、Necl-5 と Sprouty2 が物理的に相互作用し、この相互作用が Sprouty2 の Ras シグナルの抑制作用を阻害していることを明らかにした。また、Necl-5 は細胞密度に依存して細胞表面から減少するが、この減少によって両者の相互作用はなくなり、Sprouty2 は活性化され、Ras シグナルを抑制することを明らかにした。この細胞密度に依存した Ras シグナルの制御は、細胞の増殖の接触阻害の一因になっていると考えられた。

本研究は、細胞増殖の制御機構を解明する上で重要であり、実験結果自体の意義だけでなく、今後、細胞増殖の接触阻害の研究への発展性も期待できる。したがって、博士（医学）の学位授与に値する。