

|              |  |
|--------------|--|
| Title        | Interaction and localization of Necl-5 and PDGF receptor $\beta$ at the leading edges of moving NIH3T3 cells : Implications for directional cell movement  |
| Author(s)    | 天野, 恭志   |
| Citation     | 大阪大学, 2009, 博士論文   |
| Version Type |  |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/49866">https://hdl.handle.net/11094/49866</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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 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

【3】

|            |   |
|------------|---|
| 氏名         | あまのひさゆき<br>天野 恭志  |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(医学)  |
| 学位記番号      | 第 22712 号   |
| 学位授与年月日    | 平成21年3月24日  |
| 学位授与の要件    | 学位規則第4条第1項該当<br>医学系研究科生体生理医学専攻  |
| 学位論文名      | Interaction and localization of Necl-5 and PDGF receptor $\beta$ at the leading edges of moving NIH3T3 cells : Implications for directional cell movement<br>(NIH3T3 細胞の運動先端端における Necl-5 と PDGF 受容体 $\beta$ の相互作用と局在 : 方向性を持った細胞運動への影響) |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 米田 悦啓<br>(副査)<br>教授 目加田英輔 教授 高倉 伸幸   |

#### 論文内容の要旨

#### 〔 目 的 〕

これまでに、増殖因子とその受容体によるシグナル伝達は主に細胞増殖を、細胞外マトリックスとインテグリンによるシグナル伝達は主に細胞運動を制御していると考えられてきた。しかし最近では、この両者のシグナルがお互いにクロストークすることでそれぞれのシグナルを増強し、細胞の運動や増殖を制御していると考えられている。その中でも、血小板由来増殖因子 (PDGF) 受容体はインテグリン  $\alpha v \beta 3$  と物理的、機能的に相互作用することでシグナルクロストークし、細胞運動を効率的に制御していることが知られている一方で、その分子機構については明らかではない。これまでに私どもは、ポリオウィルス受容

体として知られているNecl-5がインテグリン $\alpha v \beta 3$ と物理的、機能的に相互作用し、PDGFによって誘導された運動先端端で共局在することを見出している。また、この二者間の相互作用は、インテグリン $\alpha v \beta 3$ のクラスタリングとフォーカルコンプレックスの形成を促進し、その結果、細胞運動を促進させることを明らかにしている。そこで、本研究では、まだ解析されていなかったNecl-5とPDGF受容体の関係に着目し、その解析を行った。

〔 方法ならびに成績 〕

#### I. 運動先端端のペリフェラルラップルにおけるNecl-5、インテグリン $\alpha v \beta 3$ とPDGF受容体の共局在

これまでに私どもは、マウス線維芽細胞株NIH3T3細胞における運動先端端構造の形成には、PDGFによるPDGF受容体の活性化、ビトロネクチンによるインテグリン $\alpha v \beta 3$ の活性化、およびNecl-5の発現が必要であることを明らかにしている。一方で、運動している細胞のPDGF受容体の局在については不明であった。そこで、運動先端端におけるPDGF受容体の局在とその局在に対するNecl-5の影響を検討した。ビトロネクチン上で培養しているNIH3T3細胞を濃度勾配のついたPDGFで刺激し、先端端形成を誘導した。その結果、野生型ではPDGF受容体は先端端のペリフェラルラップルにNecl-5やインテグリン $\alpha v \beta 3$ と共局在した。Necl-5を過剰発現させた場合、PDGF受容体の局在はインテグリン $\alpha v \beta 3$ と共に増強された。いずれの場合も、Necl-5とインテグリン $\alpha v \beta 3$ はペリフェラルラップル直下のフォーカルコンプレックスで共局在していたが、この部位ではPDGF受容体は共局在していなかった。一方、Necl-5をRNA干渉法でノックダウンすると、先端端構造が形成されず、細胞辺縁部におけるPDGF受容体の局在化は認められなかった。なお、PDGF受容体のペリフェラルラップルへの局在化にはアクチン細胞骨格の再編成やそれを制御する低分子量Gタンパク質Racの活性化も必要だった。以上の結果より、PDGF受容体はNecl-5に依存して運動先端端のペリフェラルラップルに局在し、その部位でNecl-5やインテグリン $\alpha v \beta 3$ と共局在することが明らかとなった。

#### II. Necl-5、PDGF受容体、およびインテグリン $\alpha v \beta 3$ の物理的相互作用

これまでに私どもは、Necl-5がインテグリン $\alpha v \beta 3$ と物理的に相互作用することを明らかにしている。そこで、Necl-5とPDGF受容体の物理的相互作用について検討した。HEK293細胞に外来性にNecl-5とPDGF受容体を発現させ、Necl-5を免疫沈降するとPDGF受容体が共沈された。一方、NIH3T3細胞から内在性のインテグリン $\alpha v$ を免疫沈降すると、内在性のNecl-5が共沈されることがわかっていったが、同様に内在性のPDGF受容体も共沈された。また、インテグリン $\alpha v \beta 3$ とPDGF受容体の相互作用について、HEK293細胞における外来性発現系で検討したところ、以前の報告通り両者は相互作用した。以上の結果より、Necl-5、インテグリン $\alpha v \beta 3$ 、PDGF受容体はそれぞれが二者間で相互作用することが明らかとなった。

#### III. Necl-5によるPDGF受容体とインテグリン $\alpha v \beta 3$ の相互作用の制御

前述のように、NIH3T3細胞においてインテグリン $\alpha v$ を免疫沈降すると、PDGF受容体が共沈するが、PDGF刺激するとその共沈する量が減少した。一方で、Necl-5の過剰発現はPDGF受容体の共沈量の減少を抑制し、Necl-5のノックダウンはその減少を促進した。以上の結果から、Necl-5とPDGF受容体の相互作用は、PDGF刺激後のPDGF受容体とインテグリン $\alpha v \beta 3$ の相互作用を安定化させることが明らかとなった。

#### IV. Necl-5による細胞運動の促進

前述のようにNecl-5はPDGF受容体とインテグリン $\alpha v \beta 3$ の相互作用を安定化させるが、この作用が細胞運動にどのように影響するのか検討した。Boyden chamber法を用いて、PDGFで誘導されるビトロネクチン上の運動能を測定した。野生型NIH3T3細胞と比較して、Necl-5の過剰発現は運動を促進し、Necl-5のノックダウンは運動を抑制した。以上の結果から、Necl-5はPDGF受容体とインテグリン $\alpha v \beta 3$ の相互作用を制御することで運動を促進させることが明らかとなった。

〔 総 括 〕

Necl-5、インテグリン $\alpha v \beta 3$ 、PDGF受容体はそれぞれがお互いに物理的相互作用することで複合体を形成し、運動先端端のペリフェラルラップルに共局在していた。この局在は、Necl-5に依存し、アクチン細胞骨格やRacの活性化にも依存していた。さらに、Necl-5はPDGF刺激時のPDGF受容体とインテグリン $\alpha v \beta 3$ の相互作用を安定化させることによって、先端端構造を形成・維持し、細胞運動を促進させた。以上のことより、細胞運動におけるインテグリン $\alpha v \beta 3$ とPDGF受容体の相互作用の分子機構が解明された。

#### 論文審査の結果の要旨

血小板由来増殖因子 (PDGF) 受容体はインテグリン $\alpha v \beta 3$ と物理的、機能的に相互作用することで細胞運動を促進する。最近、ポリオウィルス受容体であるNecl-5がインテグリン $\alpha v \beta 3$ と相互作用し、細胞の運動先端端においてインテグリン $\alpha v \beta 3$ のクラスタリングを増強することにより、focal complexの形成を増加させることが細胞運動の促進に重要であることが明らかにされた。

本申請者は、Necl-5がさらにPDGF受容体とも相互作用するかどうか、また、この相互作用が細胞運動をどのように制御するか検討した。PDGFで刺激し、運動先端端を形成させたNIH3T3細胞において、Necl-5は運動先端端のラップル部位で、インテグリン $\alpha v \beta 3$ と共にPDGF受容体とも相互作用した。これら3分子の相互作用には、ビトロネクチンによるインテグリン $\alpha v \beta 3$ の活性化、PDGFによる低分子量Gタンパク質Racの活性化、およびアクチン細胞骨格の再構成を必要とした。また、Necl-5とインテグリン $\alpha v \beta 3$ 、PDGF受容体との相互作用は、PDGF刺激方向への細胞運動を制御していた。以上の結果から、Necl-5はインテグリン $\alpha v \beta 3$ やPDGF受容体と相互作用し、方向性を持った細胞運動を制御することが明らかとなった。

本研究は、方向性を持った細胞運動の分子メカニズムを解明する上で重要であり、実験自体の意義だけでなく、今後の研究への発展も期待できる。したがって、博士 (医学) の学位授与に値する。