

学位論文題名

Signaling Adaptor Protein v-Crk Activates Rho and Regulates Cell Motility in 3Y1 Rat Fibroblast Cell Line

(ラット線維芽細胞3Y1におけるシグナル伝達アダプター分子
v-Crk による Rho の活性化と細胞運動制御機構)

学位論文内容の要旨

I. 緒言

ニワトリに肉腫を引き起こす CT10 (chicken tumor 10) ウイルスの癌遺伝子産物 Crk (CT10 regulated kinase) は、SH2 (src homology 2) 及び SH3 のみから構成され酵素活性を何ら有しないユニークな構造をとっている。Crk は増殖因子受容体近傍、及びインテグリン直下に形成される細胞接着斑に局在する事から、細胞増殖及び運動能の制御に関与する事が示唆されており、現在までに Crk-C3G-R-Ras-JNK 経路が増殖能亢進に、また Crk-DOCK180-Rac 経路が細胞運動に関与する事が報告されている。しかしながら、細胞運動という時間・空間的に複雑かつ連続的な細胞骨格再構築や細胞-基質間の脱着を必要とする現象を、現在までの知見だけで解釈するのは不十分である。本研究は、v-Crk 発現誘導ラット線維芽細胞を樹立し、Crk による細胞骨格及び細胞運動制御機構を解明することを目的とした。

II. 方法と結果

遺伝子発現制御 Tet-on システムを用いて、v-Crk 発現誘導ラット線維芽細胞株; 3Y1 21-2-1 を樹立した。v-Crk の発現量はドキシサイクリンによる誘導後 48 時間で最大に達し、Crk 発現細胞の特徴である p130^{Cas} や paxillin の著しいチロシンリン酸化が認められた。この細胞株を用いて、Crk による細胞骨格制御機構を解明する為にアクチン染色を試行した所、ストレスファイバーの強い構築が認められ、これらの末端部には、v-Crk、リン酸化p130^{Cas} 及び paxillin が共局在して細胞接着斑を形成している事が確認された。

ストレスファイバーの形成には、低分子量 G 蛋白質の Rho の関与が報告されている。そこで、Rho のエフェクターの一つである Rhotekin を用いて活性化 Rho の pull-down assay を行った所、v-Crk の誘導により 2 倍の Rho の活性化が認められた。更に Rho の関与を確認する為に、Rho の特異的阻害剤; C3 を細胞に処理するとストレスファイバーの形成阻害が認められた。また、Rho の下流因子の一つである ROCK (Rho-associated kinase) の特異的阻害剤 Y27632 処理でも同様にストレスファイバーの形成を阻害する事から、v-Crk は Rho/ROCK 依存的にアクチンストレスファイバーを誘導する事が明らかとなった。

ROCK はセリン/スレオニンキナーゼである為、次に v-Crk 誘導細胞でのセリンあるいはスレオニンのリン酸化量の変化を検討した所、3Y1 細胞特異的に 72 kDa 及び 78 kDa の二つの蛋白質のスレオニンリン酸化の亢進が認められた。このリン酸化は Y27632 処理によって抑制される事から、ROCK の下流でリン酸化を受けている蛋白質である事が確認された。

次に Crk 発現誘導細胞の運動能を 3 つの手法により検討した。Phagokinetic track assay では、v-Crk の誘導により運動能は有意に低下したが、Y27632 及び C3 処理によりこの低下は回復された。また、wound healing assay でも同様に Crk による運動能の低下が認められたが、フィブロネクチン刺激によりインテグリンからのシグナルを添加すると、この低下が回復された。また、トランスウェルチャンバーを用いた細胞走化性の検討では、v-Crk の誘導によりフィブロネクチンに対する走化性が亢進した。

細胞の運動能亢進には、接着分子 CD44 の切断が関与している事が報告されている。これは、運動細胞の後部ではマトリックスメタロプロテアーゼによる CD44 の N 末側切断により細胞-基質間の解離が促進され、細胞が動きやすくなるという考えに依存している。そこで、v-Crk 誘導細胞での CD44 切断量を検討した所、フィブロネクチン存在下で CD44 の切断が認められた。更に、フィブロネクチン存在下では Rho の活性化が更に亢進し、ストレスファイバーの構築やリン酸化 paxillin の局在には限局性が認められた。

III. 考察

現在まで、Crk による細胞運動制御機構に関しては、Crk-DOCK180-Rac 経路が細胞膜のラッピング及び運動能亢進に関与する事が報告されていたが、Crk が Rho を介してアクチン細胞骨格を制御するメカニズムに関して報告は皆無であった。本研究では、v-Crk が Rho を活性化し、その結果誘導されたアクチンストレスファイバーと接着斑が強固な assembly を形成することにより細胞運動能を低下させることを見出した。Crk による Rho の活性化機構について詳細は未だ不明であるが、私は、上記の研究後、Crk が Rho-GDI/ERM family (Ezrin, Radixin, Moesin) と結合することにより細胞の微絨毛を誘導する現象を見出している。この事から考察すると、Rho-GDI が Crk と結合する事によって間接的に Rho が活性化され、ストレスファイバーを形成させるものと示唆される。

また、今回の研究では、v-Crk の誘導により 72 及び 78 kDa の蛋白質がスレオニンリン酸化を受けることが明らかとなった。このリン酸化は、v-Src による形質変換細胞では認められず、またマウス線維芽細胞 NIH3T3 や CT10 ウイルス感染ニワトリ線維芽細胞でも誘導されないことから、3Y1 細胞特異的に機能し Rho/ROCK の下流で細胞骨格制御に関与している蛋白質である可能性が示唆される。

一方、v-Crk 誘導細胞では細胞外基質フィブロネクチン存在下で CD44 の切断が促進され、細胞運動能が亢進することが明らかとなったが、私は CD44 の主要リガンドであるヒアルロン酸上でも CD44 が切断を受けて運動能が亢進し、この時 Rho に加えて Rac の活性化が亢進している事を見出している。従来、CD44 は PI3 キナーゼ、Rac の下流で転写活性化された膜型のマトリックスメタロプロテアーゼ (MT1-MMP) により切断を受けることが報告されている。従って、Crk 誘導細胞での CD44 の切断にも MT1-MMP の活性化が関与しているものと推察される。同時に、細胞運動に伴って Rho の活性化が時間・空間的に適切に制御され、アクチン細胞骨格の再構築や接着斑形成を制御しているものと考えられる。

このように、Crk は多数のシグナル伝達分子と協調して機能し、細胞骨格再構築や接着斑形成、細胞-基質間の解離に深く関与し、統合的に細胞運動能を制御している事が示唆された。更に、タイムラプス顕微鏡を用いた研究により、PC12 褐色細胞腫に Crk を過剰発現させると、細胞運動が停止する細胞と、逆に著しく伸張する突起の先端部に Crk が局在する細胞の両局面の現象を確認している。従って、今後は Crk による運動能制御の on / off メカニズムについて更なる検討を行い、これらの研究を発展させてヒト腫瘍細胞の運動能 (転移・浸潤能) 制御機構の解明や神経欠損疾患の治療法確立へ向けて研究を推進していきたいと考えている。

学位論文審査の要旨

主査 教授 田中 一馬
副査 教授 三輪 聡一
副査 教授 長嶋 和郎

学位論文題名

Signaling Adaptor Protein v-Crk Activates Rho and Regulates Cell Motility in 3Y1 Rat Fibroblast Cell Line

(ラット線維芽細胞3Y1におけるシグナル伝達アダプター分子
v-CrkによるRhoの活性化と細胞運動制御機構)

現在の分子細胞生物学研究において、細胞運動制御機構の解明は、従来までの2次元の見地での研究から時間的・空間的要素を含めた多次元的研究であることから学問的重要性が高く、多くの研究者の興味を駆り立てている研究分野である。学位申請者 津田真寿美は、この研究の流れの中において、シグナル伝達アダプター分子CrkがRho family低分子量G蛋白質の活性を制御することにより、細胞骨格の再構築や接着斑形成、及び細胞-基質間の接着-解離機構に深く関与し、統合的に細胞運動能を制御している事を明らかにした。

本研究により、Crkはインテグリン非刺激下でRho-ROCK依存的にアクチンストレスファイバーを形成し細胞運動能を低下させる事、ROCKの下流で72/78 kDaの蛋白質がスレオニンリン酸化される事が明らかとなった。一方、フィブロネクチンによるインテグリン刺激下ではRhoの活性化亢進により細胞骨格再構築、接着斑のターンオーバー、及びCD44の切断が認められ、細胞運動能が亢進することを報告した。

この発表に対し、副査三輪聡一教授より、1) インテグリン非刺激下と刺激下でのシグナル伝達の相違、2) ROCK依存的にスレオニンリン酸化される72及び78 kDaの蛋白質の同定の有無、3) CrkによるRho活性化機序におけるRho-GDI以外の関与の可能性、また4) Rhoの活性化と細胞骨格再構築、運動能亢進との関連性について質問があった。これらの質問に対し、申請者は、1) インテグリン刺激下では、Crkの過剰発現により発生するinside-outシグナルとインテグリン刺激によるoutside-inシグナルのクロストークあるいは相乗作用を考慮する必要性がある事を指摘した。具体的には、インテグリン刺激下ではSrc、FAKの活性化によりp130Cas/Crk複合体が形成され、この下

流でSos/Ras/MAPK経路によるMMPの上昇、あるいはDOCK180/Rac経路によるラメリポディアやラップリングの形成が誘導され、これらのシグナルの影響によりRhoの活性化状態がconstitutive activeの状態から、GDP型とGTP型を回転するように変化している可能性がある」と返答した。2)に関しては、現在同定中であると返答した。3)のCrkによるRho活性化機序については、Rho-GDIの関与、Dock180/Racの下流でのRho活性化、Rho-GEFによる活性化の3つの可能性を指摘した。また、4)に関しては、インテグリン非刺激下では恒常的なRhoの活性化によりストレスファイバーと接着斑の強固なassemblyが形成され細胞運動能が低下する事、一方インテグリン刺激下では、1)で述べたoutside-inのシグナルの影響により、Rhoの活性化が細胞内で時間・空間的に適切かつ連続的に制御されることにより、細胞骨格再構築、及び運動能の亢進を引き起こしている可能性がある」と解答した。

続いて副査長嶋和郎教授により、1) Crkの機能の細胞特異性、及び2) 細胞運動の方向性におけるfrontとrearの発生機序について質問があった。これらに対しては、1) Crkを異なる細胞に過剰発現させた場合、運動能や細胞形態パターンに差異が認められる事から、細胞種によってCrkの下流シグナルが異なる可能性が考えられ、Crkは様々なシグナル分子と協調しながら多彩な機能に関与している分子である可能性が示唆された。2)に関しては、本研究においては運動方向性を規定する刺激を加えていない為にCrkはランダムな動きを示すが、培養ディッシュの一侧にのみ細胞外基質を塗布したり、培養液の一侧から走化性因子を入れることにより運動に方向性をもたせる実験も可能であると返答した。

主査である田中一馬教授からは、1) Rho-GDIとCrkの結合様式、さらにこの複合体におけるRhoの結合の有無について、また2) ROCK依存的にスレオニンリン酸化を受けている蛋白質の予測と想定される機能について質問があり、特にシグナル伝達において恒常的に高リン酸化を受けている蛋白質の特異性について指摘を受けた。これらに対しては、1) Rho/Rho-GDIの結合と比較して、Crk/Rho-GDIの結合の方が高親和性であると考えられる事、またCrk/Rho-GDI複合体へのRhoの結合の有無については未確認だが、確認する必要がある」と返答した。2)については、田中教授の指摘に基づいてこれらの蛋白質を再検討する必要があるが、現在はROCKの下流で活性化されミオシンの収縮やアクトミトシンの形成に関与する蛋白質である可能性を考えている。

申請者が明らかにしたCrkの細胞運動制御機能は、基礎分子細胞生物学の研究分野に留まらず、ヒト腫瘍細胞の運動能（転移・浸潤能）制御機構や神経欠損疾患の解明及び治療に繋がるものであり、臨床的見地からも非常に学問的価値が高いと考えられ、今後の更なる研究の発展が期待される。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。