

学 位 論 文 題 名

Adaptor Protein Crk Is Required for
Ephrin-B1-induced Membrane Ruffling and
Focal Complex Assembly of Human Aortic Endothelial Cells

(ヒト大動脈血管内皮細胞における Ephrin-B1 刺激依存性の細胞膜伸展と
先端接着斑の形成にはアダプター蛋白 Crk が必要である)

学位論文内容の要旨

血管内皮細胞の遊走は血管発生・血管新生における重要な要素であり、受容体型チロシンキナーゼを介した調節系は、その中心的な役割を担っていると考えられている。これらには VEGF などの増殖因子のほかに、細胞膜上に発現するリガンドである ephrin とその受容体にあたる Eph 受容体などがある。これまで Eph/ ephrin に関しては、リガンド(ephin) と対応する受容体(Eph)が動脈と静脈の内皮細胞それぞれに発現することにより、互いの認識による反発を介して動静脈の分離した発生にかかわっているとされていた。しかし、一部の Eph 受容体は動静脈両者に発現が認められているなど Eph-ephin と細胞遊走にかかわる細胞内の下流分子についてはいまだ十分な検討がなされていない。本研究では Eph 受容体を介した血管内皮細胞の遊走における細胞内情報伝達系について、ヒト大動脈内皮細胞(HAEC)を用いて検討した。

はじめに免疫沈降法 (IP) よって HAEC に EphB1 受容体が発現していることを確認した。また可溶性の ephrinB1 を用いて ephrinB1 刺激依存性に EphB1 受容体がリン酸化されることも同様に IP で確認した。また、GFP(蛍光蛋白)を導入して蛍光ラベルした HAEC を蛍光顕微鏡下で観察し、ephrinB1 刺激依存性に HAEC の遊走が惹起されることを確認した。

次に Eph 受容体の下流分子を検討するにあたって、細胞の遊走や接着に関与することが示唆されているアダプター蛋白である Crk に着目して研究をすすめた。この CrkI の ephrin 刺激に依存した細胞内での局在変化をリアルタイムに観察するため、DsRed 蛍光タンパクの Tag をつけた CrkI (DsRed-CrkI) と、細胞骨格と細胞接着に関する重要な分子である actin に GFP-Tag をつけたもの (GFP-actin) とを HAEC に co-transfect し蛍光顕微鏡下で観察した。その結果、刺激前には主に focal adhesion (actin 線維の両端) に局在していた CrkI が ephrinB1 刺激依存性に focal adhesion よりもずっと小さな focal complex (先端接着斑) に移動することが観察された。

この ephrinB1 刺激による CrkI の局在変化に関与する分子を検討するため、細胞接着の場で CrkI と結合することが知られている蛋白 p130Cas と Paxillin を蛍光ラベルし(GFP-

Cas, GFP-Paxillin)、DsRed-CrkI とともに HAEC に co-transfect して、それぞれの細胞を ephrinB1 によって刺激し観察した。その結果 CrkI は同様に刺激依存性に細胞先端 (focal complex) に移動した。また Paxillin は刺激後に細胞先端には移動せず、CrkI とは離れて局在していた。一方、Cas は CrkI と同様に focal complex に移動し CrkI と co-localize することが確認された。このことから CrkI が ephrinB1 刺激依存性に p130Cas とともに focal complex に移動することがわかった。

この、新たな focal complex の形成は細胞膜の伸展、すなわち membrane ruffling に伴うものである。HAEC において ephrinB1 刺激による前後での細胞のサイズを比較したところ、刺激後に有意にサイズが増大していたことで刺激依存性の membrane ruffling の誘導が定量的に確認できた。ところが、このとき HAEC に Crk の dominant negative mutant を co-transfect した場合や、CrkI の siRNA を HAEC に導入して細胞内の CrkI の発現を抑えた場合には刺激依存性の細胞サイズの変化(増大)は観察されなかった。membrane ruffling は細胞の遊走に先行することが知られており、この結果、HAEC における ephrinB1 刺激による細胞遊走に Crk を介したシグナルが関与していることが示唆された。

細胞内情報伝達系におけるアダプター蛋白として知られる Crk は低分子量 GTP 結合蛋白のグアニンヌクレオチド交換因子 (GEF) である C3G や DOCK180 などの蛋白と結合してエフェクターである低分子量 GTP 結合蛋白の Rap1 や Rac1 にシグナルを伝えるとされている。そこで HAEC においてこれらエフェクター分子の働きを抑制した場合の CrkI の細胞内での局在の変化を観察した。Rac1 の機能を抑制した細胞では ephrinB1 刺激依存性の membrane ruffling はみられず CrkI の focal complex への移動も認められなかった。また刺激後の細胞サイズの変化も認められなかった。同様に Rap1 を抑制した細胞においても刺激依存性の CrkI の局在変化は認められず、細胞サイズも増大しなかった。しかしこの細胞では、細胞辺縁において細かい membrane ruffling が認められた。この細胞を詳細に観察すると細胞先端がいったん広がってはすぐに縮んでしまうことが観察されたが、このとき広がっていきこうとする細胞先端への Crk の移動が観察されず、この Crk を含む focal complex 形成不全のために membrane が足場を失い細胞が広がれないのではないかと考えた。

最後に実際に ruffling している membrane での Rap1 の活性を、そのモニター蛋白である Raichu-Rap1 を用いて検討した。その結果 ephrinB1 刺激によって ruffling 部での Rap1 の活性化が観察されたが、このとき Crk の dominant negative mutant を co-transfect するとその活性は観察されなかった。このことから ephrinB1 刺激依存性の HAEC の membrane ruffling における CrkI と Rap1 の関係がダイナミックに示された。

以上、HAEC を用いた検討から血管内皮細胞の遊走において Eph-ephrin を介したシグナルの下流で Crk-Rap1, Rac1 などさまざまな蛋白が関与していることが示唆された。今後は C3G や DOCK180 等の GEF の局在の変化や Crk 以外の細胞接着分子の動向等も検討できればと考えている。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 石 橋 輝 雄
副 査 教 授 北 畠 顕
副 査 教 授 守 内 哲 也

学 位 論 文 題 名

Adaptor Protein Crk Is Required for Ephrin-B1-induced Membrane Ruffling and Focal Complex Assembly of Human Aortic Endothelial Cells

(ヒト大動脈血管内皮細胞における Ephrin-B1 刺激依存性の細胞膜伸展と
先端接着斑の形成にはアダプター蛋白 Crk が必要である)

血管内皮細胞の遊走は血管発生・血管新生における重要な要素であり、受容体型チロシンキナーゼを介した調節系は、その中心的な役割を担っていると考えられている。このうち Eph 受容体は、動静脈の分離した発生にかかわっているとされていたが、細胞内の下流分子については不明の点が多い。本研究では Eph 受容体を介した血管内皮細胞の遊走における細胞内情報伝達系について、ヒト大動脈内皮細胞(HAEC)を用いて検討した。

免疫沈降法(IP)と可溶性のリガンドを用いた実験によって、HAEC において刺激依存性に EphB1 受容体がリン酸化されることを確認した。また、GFP(蛍光蛋白)で蛍光ラベルした HAEC を蛍光顕微鏡下で観察し、ephrinB1 刺激で HAEC の遊走が惹起されることを確認した。

次にアダプター蛋白である Crk に着目し Eph 受容体の下流分子を検討した。蛍光タンパク Tag をつけた CrkI (DsRed-CrkI) と、actin (GFP-actin) を HAEC に co-transfect し、蛍光顕微鏡下で観察したところ刺激前には主に focal adhesion に局在していた CrkI が刺激後あらたな focal complex に移動することが観察された。

次に p130Cas と Paxillin に着目して Crk の focal complex での共存分子について検討した。その結果 CrkI は ephrinB1 刺激依存性に p130Cas とともに focal complex に移動することがわかった。

また Crk の dominant negative mutant や siRNA を用いた実験から HAEC にお

ける ephrinB1 刺激による細胞遊走に Crk を介した系の関与が示唆された。

Crk は低分子量 GTP 結合蛋白の Rap1 や Rac1 にシグナルを伝えるとされている。Rac1 の機能を抑制した細胞では ephrinB1 刺激依存性の membrane ruffling や CrkI の focal complex への移動も認められなかった。同様に Rap1 を不活化により刺激依存性の CrkI の局在変化は認められなかった。しかし、細胞辺縁において細かい membrane ruffling が認められたが、このとき広がっていきこうとする細胞先端への Crk の移動が観察されず、この Crk を含む focal complex 形成不全のために membrane が足場を失い細胞が広がれないのではないかと考えた。

最後にモニター蛋白である Raichu-Rap1 を用いて実際に ruffling している membrane での Rap1 の活性を確認した。

以上、血管内皮細胞の遊走において Eph-ephrin を介したシグナルの下流で Crk-Rap1, Rac1 などさまざまな蛋白が関与していることが示唆された。

口頭発表に際し、副査の北畠教授から血管新生における細胞遊走の極性決定と Eph 受容体機能との関連について、血管内皮細胞と神経細胞における Eph 受容体の機能の差異についての質問がなされた。次いで副査の守内教授から CrkI と CrkII の細胞内発現量のバランス、今回の研究の臨床的意義、可溶性のリガンドを利用した治療の可能性について質問がなされた。最後に主査の石橋教授から dominant negative mutant を使用した場合と siRNA を使用した場合の刺激後の変化の差、Rap1 と Rac1 の活性の量的な差について質問がなされた。いずれの質問に対しても、申請者は研究結果に基づいて、あるいは文献的知識により、概ね適切な回答を行った。この論文は、血管内皮細胞における Eph 受容体の下流シグナルの一部を明らかにしたものとして意義のあるものと評価され、審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（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。