

論文の内容の要旨

論文題目 インテグリン活性化における R-Ras の役割

指導教官 花岡 一雄 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成8年4月入学

医学博士課程

外科学選考

氏名 渡辺 慎一

インテグリンは、 α 鎖と β 鎖からなるヘテロダイマーの膜貫通型糖タンパク質で非共有結合により会合して細胞表面に存在しており、細胞外マトリックス蛋白や細胞同士の接着を制御して、細胞の増殖、分化、移動などの細胞生物学的効果をもたらす。臨床学的には、炎症時白血球による炎症局所への血管外遊走、受傷時に血小板凝集から端を発しての止血血栓形成、創傷治癒過程や癌細胞の転移などに重要な役割を果たす。

インテグリンの接着は、発現量変化と分子の質的变化（リガンド親和性変化や細胞表面上の再分布）とで調節される。血小板や白血球に発現しているインテグリンは通常不活性型であるが、細胞外因子により細胞内伝達シグナルによって質的变化を伴って活性型に変換される (inside-out signaling)。

この inside-out signaling の伝達経路は未だ十分に解明されていないが、関与する分子群には、PI3Kinase、PLC γ 、PKC や幾つかの small GTPase などが報告されている。その small GTPase 中 R-Ras はインテグリンを活性化させる報告がなされ、同じ Ras ファミリー蛋白の中でも特異な機能を具有している。

R-Ras は Ras サブファミリーに属し、一次構造上 Ras と約 55%の相同性を帯び、Ras サブファミリー蛋白に共通のエフェクター結合領域を持ち、N末端側に 26 アミノ酸残基が伸長している点が特徴的であるが、この配列の役割については不明である。

インテグリンの inside-out signaling を受ける細胞内領域は、約 40 アミノ酸残基と短く、カタリティック部位を持たず、細胞骨格系蛋白が結合することが判明しているが、そのシグナルを受ける際に両鎖細胞内領域の各役割分担は

不明である。

以上より、独自にインテグリン活性化を及ぼす R-Ras の構造や機能解析することが、インテグリン活性化機構の解明につながると思っていた。

そこで今回、R-Ras 特異的にフィブロネクチン(FN)への接着亢進に関して、再現性が得られたヒトリンパ芽球T白血病の株化細胞である Molt 4 とマウス proB リンパ球 BaF3 とを用いて、R-Ras がインテグリンを活性化するシグナル伝達経路に関して解析し、興味ある結果を得た。

[材料・方法]

構成的活性型 R-Ras 38V、これを背景としたエフェクター結合領域点変異体 [R-Ras(38V, 61S)・R-Ras(38V, 63G)・R-Ras(38V, 64E)・R-Ras(38V, 66C)]、N末端側 26 アミノ酸欠失型とその部分欠失型の各種 cDNA はマウス preB リンパ球 70Z/3 由来の cDNA を元に PCR 部位特異的変異導入法により作製した。これらを哺乳動物発現ベクターに組み込み、ヒトリンパ芽球T細胞株 Molt 4 に電気穿孔法を用いて遺伝子導入した。薬剤選択下で培養して、単一クローンの安定発現株を樹立した。ヒト新鮮凍結血漿から精製分離した FN を 96 穴平底プレート上に敷いて固相化し、BCECF で蛍光標識した各種細胞株を蒔いて、洗浄前後の蛍光度を測定して接着率を算出した。この接着試験を行う際に、標的細胞表面上のインテグリン発現量をフローサイトメトリーでその都度測定した。

細胞内分布は、各種 R-Ras の Molt 4 安定発現株とサル腎上皮細胞由来の COS 7 一過性発現株を、パラフォルムアルデヒドで固定後、TritonX-100 で細胞膜穿孔し R-Ras 抗体を用いて免疫蛍光染色し、共焦点レーザー走査顕微鏡下で観察した。

インテグリンキメラ ($\alpha 5/L$) 分子はヒト型インテグリン $\alpha 5$ 鎖野生型 cDNA より膜直下部にある *HindIII* 認識部位以下を切り出して、同制限酵素消化処理されたヒト型インテグリン αL 鎖野生型 cDNA 細胞内領域とライゲーションして作製した。その際、ヒト型インテグリン αL 鎖野生型 cDNA 膜直下部に、PCR 点変異導入法を用いて *HindIII* 認識部位を作製した。作製したキメラ遺伝子をマウス proB 細胞 BaF3 に電気穿孔法で導入し、薬剤選択下で継代培養して安定発現株を得た。更に、R-Ras 38V を遺伝子導入して同様にサブクローニングを行い、二つの遺伝子共安定発現株を樹立した。また全長型 $\alpha 5$ 鎖と R-Ras 38V との二つの遺伝子共安定発現株もサブクローニング後、樹立した。これらの細胞株を用いて α -キモトリプシン消化処理で得られた固相化 120 kDa FN 断片への細胞接着性を調べた。また、BaF3 が固相化 120 kDa FN に接着する際、外来性インテグリンの関与を知る為に、抗マウス $\alpha 5$ 阻害抗体を標本と 10 分間混和して FN に蒔いて接着試験を行った。

[結果と解釈]

1. Molt 4 においても構成的活性型である R-Ras 38V を発現させることで、インテグリンによる細胞接着亢進が認められた。H-Ras の構成的活性型発現株では、接着亢進が見られなかった。報告されている幾つかの R-Ras 下流シグナル伝達経路に対して、阻害剤 (wartmannin や PD98059) を用いた限りの接着試験では、R-Ras によるインテグリンを介した細胞接着亢進現象を R-Ras からの MEKK-MEK-MAPKinase 系や PI3Kinase の活性化からでは説明できないことがわかった。

2. Molt 4 の場合や過去の報告も踏まえて、Ras ファミリー分子中で R-Ras がインテグリンを活性化するという、特異的細胞現象と、一次構造上 R-Ras 固有の N 末端側 26 アミノ酸残基伸長部との関連性を調べた。

その結果 N 末端側 26 アミノ酸配列欠失変異体発現株は、細胞接着性が抑えられ、この伸長部はインテグリンを効率良く活性化するのに重要な部分であることがわかった。

更に、26 アミノ酸配列を 3 分画に分け、その中の最重要分画を同定しようとしたが、分画数依存的に細胞接着亢進して特定できなかった。

以上、N 末端側 26 アミノ酸残基中にはインテグリンの接着亢進に関与する特異的なエフェクター分子との会合に必要な不可欠な領域が含まれていると解釈するより、26 アミノ酸配列が一塊となってインテグリン活性化に重要な部分を構成している可能性が高いと思われる。

3. また N 末端側 26 アミノ酸配列が R-Ras 分子の細胞内局在に及ぼす影響を調べた。この際、COS 腎上皮細胞だけでなく R-Ras の浮遊細胞 (Molt 4) 内分布を初めて免疫細胞染色法で観察した。

その結果、R-Ras は両細胞で細胞膜優位に局在していた。併せて N 末端側 26 アミノ酸残基欠失型も観察したが、どちらの細胞にも充分膜移行性が認められたので、少なくとも N 末端側 26 アミノ酸配列は膜移行性を決定付ける部分では無いことが判った。

以上より R-Ras の N 末端側 26 アミノ酸配列は一団となって、細胞膜移行能と別の機序で、インテグリンを活性化させる細胞内シグナル伝達に重要な部分であることがわかった。

4. H-Ras のエフェクター結合領域点変異体に関する分析報告と同様に、R-Ras 38V のエフェクター結合領域に点変異を挿入して、R-Ras から下流に伝わる複数のエフェクター経路の分離を試みた。

その結果、R-Ras (38V, 64E) の発現株は殆ど接着が見られず、一方 R-Ras (38V, 63G) 発現株の接着性は R-Ras 38V による亢進した細胞接着性と同程度であった。また R-Ras (38V, 61S) や R-Ras (38V, 66C) は R-Ras 38V の細胞接

着亢進に部分的抑制をかけることがわかった。

5. BaF3 細胞で外来性野生型 $\alpha 5$ 安定発現株とキメラ型 $\alpha 5/L$ 安定発現株について、それぞれの細胞表面発現量が同程度の発現株が得られた。これらの細胞株に更に R-Ras 38V を遺伝子導入することで、 $\alpha 5$ 、 $\alpha 5/L$ 発現株共に固相化 120 kDa FN に対する細胞接着性が顕著に亢進した。また内在性 $\alpha 5$ 阻害抗体で予めブロッキングすることで、この接着は専ら外来性インテグリンを介していることが示された。

以上より、R-Ras が VLA-5 を活性化させるシグナル伝達経路の末路は、 α 鎖の細胞内領域より β 鎖の細胞内領域に至る可能性が高いことが示唆された。

[結論]

R-Ras が他の Ras ファミリー分子と比べて、特異的にインテグリンを活性化して細胞接着性を亢進させるシグナル伝達経路を解析した。

インテグリン活性化を及ぼす様な R-Ras から下流シグナルは、親和性を亢進させると報告されている PI3Kinase とは別のエフェクター分子の存在が考えられ、その分子は R-Ras (38V, 63G) と強く会合し、R-Ras (38V, 64E) とは会合しないものである。R-Ras の一次構造に特徴的な N 末端側 26 アミノ酸残基は、インテグリン活性化に重要な箇所であることがわかったが、欠失しても膜移行性を保ち、さらにその中に最重要な分画は同定されず、恐らく 26 アミノ酸残基が一体となってエフェクター分子との会合の効率性（細胞膜上での会合場所や時機など）を制御するものと思われる。また、R-Ras からのインテグリン活性化シグナルは VLA-5 の α 鎖でなく β 鎖に最終的に伝達されると思われ、恐らく β 鎖を細胞骨格の拘束から解放して細胞膜表面上の移動度を上げることにより、クラスター形成をして avidity を上げることで細胞接着性を亢進するものと予想される。

今後、あらたなエフェクター分子が見つかることで、インテグリン活性化の機構がより解明されると期待される。その際に、今回行った R-Ras のエフェクター結合領域点変異体を用いて yeast two-hybrid 法の bait にして、R-Ras からのインテグリンを介した細胞接着性を亢進させる下流エフェクター分子のクローニングに積極的に利用できるものと思われる。