

## 審査の結果の要旨

渡辺慎一

本研究はインテグリン活性化シグナル伝達において重要な役割を演じていると思われる R-Ras に関して、シグナルを伝えるエフェクター分子や終着点の解析、R-Ras の構造分析と細胞内局在を調べたものであり、他の Ras ファミリー蛋白と特異的にインテグリンによる細胞接着性亢進を示した Molt 4 細胞（ヒトリンパ芽球 T 細胞株）を主に用いて下記の結果を得ている。

- 1) Molt 4 細胞において、構成的活性型 R-Ras 38V を強制発現させることで、VLA-4 の発現量を増やさずに固相化 FN に対して細胞接着性亢進をもたらすことが出来た。  
この接着性亢進は PI3kinase 阻害剤のワートマンニンや MAPKkinase 阻害剤 PD98059 では抑制できなかった。
- 2) 構成的活性型 R-Ras 38V のエフェクター結合領域に点変異を入れることで、R-Ras から下流に伝わる複数のシグナル経路を分別して、各点変異体発現株による FN の接着変化を調べた。R-Ras(38V,61S)と R-Ras(38V,66C)の発現株は R-Ras 38V 発現株の接着亢進が部分的に抑制されたのに対し、R-Ras(38V,63G)は R-Ras 38V とほぼ同じ程度に接着亢進が保たれた。また、R-Ras(38V,64E) 発現株は接着能を喪失した。
- 3) R-Ras と同じ Ras サブファミリーに属し共通のエフェクター結合領域をもつ H-Ras や Rap 1 と異なり、R-Ras の構成的活性型だけが Molt 4 細胞での安定発現株に対して固相化 FN への接着性を亢進させた。これより、一次構造上 R-Ras 特有部分である、N 末端側 26 アミノ酸残基に着目し、R-Ras 38V からこの部分を欠失させた変異体発現株を樹立して初めて細胞接着の解析を試みた。その結果、中等度の発現量だと FN への接着性がほぼ完全に抑えられたが、過剰発現すると接着性が回復した。

- 4) R-Ras のN末端側 26 アミノ酸残基をほぼ均等に3分画に分け、そのうちの幾つかの分画を欠落させて再構成した R-Ras 38V の変異体安定発現株を初めて樹立して、細胞接着効果を解析・検討した。その結果、プロリンに富んだ第3分画を初めとして、接着性亢進をもたらす様な特異的分画は特定されず、26 アミノ酸が一塊となって接着亢進をもたらす重要な部分であることがわかった。
- 5) 今回初めて浮遊細胞に R-Ras を遺伝子導入後、免疫蛍光染色法により細胞内局在を調べた。また、N末端側 26 アミノ酸残基欠失型 R-Ras の細胞内分布も調べたところ、この部分を欠失しても R-Ras の細胞膜移行性を妨げないことがわかった。また、腎上皮由来の COS7 細胞に一過性発現させた場合も、同様の観察所見が得られた。
- 6) 外来性野生型  $\alpha 5$  鎖とその細胞内領域を  $\alpha L$  鎖で置換したキメラ型  $\alpha$  鎖発現株をそれぞれ BaF3 細胞(マウス proB リンパ球)にて樹立し、更に R-Ras 38V を遺伝子導入して R-Ras のインテグリン活性化シグナル伝達経路の終着点を初めて調べた。その結果、どちらの  $\alpha$  鎖細胞内領域に対しても遜色なく、R-Ras はインサイドアウトシグナルを伝えてインテグリンによる細胞接着亢進を誘導した。

以上、本論文でわかったことは R-Ras がインテグリンを活性化させる為には、PI3kinase や MEKK→MEK→MAPKinase 以外のシグナル伝達を介して、また R-Ras(38V,64E)では伝わらず R-Ras(38V,63G)で伝えられるシグナル伝達を介していること。更には細胞膜移行とは別の機序で R-Ras 固有のN末端側 26 アミノ酸残基を絡めていること。シグナルの終着点として VLA-5 の  $\beta$  鎖細胞内領域に作用している可能性が高いことの以上である。本研究は未解明のインテグリン活性化機構の枢要分子と思われる R-Ras の解析に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。