

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Functional analysis of ZRP1, a focal adhesion LIM protein

和訳 Focal adhesion に局在する LIM 蛋白質 ZRP1 の機能解析

指導教員 山本 雅教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 14 年 4 月 入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 柏 辰宇

Focal adhesion は細胞外基質が actin 細胞骨格とリンクする特別な場所である。更に、focal adhesion は integrin からの様々なシグナル伝達、例えば、actin 細胞骨格の調節にも関わっている。Focal adhesion に局在する多くの分子、Fak、Src ファーミリキナーゼ、scaffold 蛋白質 p130Cas、paxillin 等が integrin を介するシグナル伝達を担っており、これらの分子が最終的に RhoGTPase ファーミリの RhoA、cdc42 及び Rac1 を制御することが actin 細胞骨格の調節に重要である。

Integrin による刺激後、まず Fak が Tyr-397 の自己リン酸化が起こり活性化される。続いて c-Src や p130Cas が Fak と結合し、更に、c-Src あるいは Fak による p130Cas のリン酸化が起こる。リン酸化された p130Cas は Crk と複合体を形成し、Crk を focal adhesion に recruit する。更に p130Cas-Crk 複合体が guanine nucleotide exchange factor (GEF) である DOCK180-ELMO と結合して、Rac1 の活性化を引き起こす。一方、integrin 刺激後、paxillin もリン酸化され、RhoGTPase-activating protein (GAP) ドメインを持つアダプタータンパク質である PKL や GEF である PIX との複合体形を通し、Rac1 を活性化させる。従って、Focal adhesion 分子 p130Cas と paxillin のリン酸化は RhoGTPase の調節に密接に関連している。

RhoA、cdc42 及び Rac1 は GEF により活性化され、それぞれ actin ストレスファイバー、葉状偽足、糸状偽足の形成を引き起こす。様々な種類の細胞で RhoA と Rac1 が互いの活性を抑制的に制御することが報告されており、両分子の活性の切り替えが細胞運動時の actin 骨格系の制御に重要であることが示唆されている。細胞が運動す

る時、まず Rac が活性化することにより、細胞は進行方向に偽足を出す。これらの偽足には integrin や focal adhesion 分子を含む focal complex が形成されるが、その形成にも Rac の活性が必要である。その後、Rho が活性化されることにより、focal complex が focal adhesion に成熟し、actin ストレスファイバーが成熟した focal adhesion にアンカーされ、細胞の後方が収縮し、細胞全体が前に運動する。

LIM 蛋白質である Zyxin は focal adhesion に局在する分子であり、integrin からのシグナル伝達系への関与が推測されている。Zyxin は focal adhesion に局在する様々な分子、例えば、actin 細胞骨格を制御する Ena/VASP ファーミリの分子、actin をクロスリンクする α -actinin 及び RhoGTPase の GEF である Vav と結合することが報告されている。細胞分裂期を制御し、腫瘍抑制能をもつセリン/スレオニンキナーゼである LATS1 との結合も報告されているが、最近 LATS1 ファミリー分子も細胞骨格系の制御に関与することが示唆されている。

一方、我々の研究室では zyxin ファーミリに属している ZRP1/TRIP6 が yeast two-hybrid スクリーニングにより LATS1 のファーミリ分子である LATS2 に結合する分子として同定された。ZRP1 は Zyxin 同様に focal adhesion への局在が報告されており、更に繊維芽細胞においては p130Cas との結合が報告されている。

我々は ZRP1 が Zyxin と類似した蛋白質構造、すなわちプロリンに富む領域や核外移行シグナル (NLS) を含む N 端領域と、3 つの LIM ドメインから成る C 端領域を持つことから、機能的にも類似していると考え、本研究において ZRP1 の局在及び機能の解析を行った。

まず、ZRP1 に対する特異的な抗体を作成した。この抗体を用いて蛍光免疫染色を行い ZRP1 の細胞内局在を調べたところ、ZRP1 が focal adhesion に局在し、特に vinculin と高い共局在性を示すことがわかった。次に、恒常的に EGFP-ZRP1 を発現する細胞株を樹立し、ライブ観察を行った結果、EGFP-ZRP1 は常に運動する細胞の leading edge の先端に局在することを見出した。これらの結果から ZRP1 が細胞運動に何らかの役割を果たしていることが示唆された。

我々は RNAi の手法を用い、HeLa 細胞内の ZRP1 の発現を抑制した。Wound healing アッセイなど運動誘発刺激を与えた場合、与えなかった場合のどちらにおいても、ZRP1 発現抑制細胞はコントロール細胞に比べ、高頻度に異常な偽足を伸展させることを見いだした。更に Paxillin の蛍光免疫染色を行った結果、ZRP1 発現抑制細胞ではコントロール細胞に比べて、paxillin のシグナル斑が小さいことが分かった。

次に actin 骨格系への影響を調べる目的で、ZRP1 発現抑制細胞に EGFP-actin を発現させ、ライブ観察を行った。まず、ZRP1 発現抑制細胞では actin ストレスファイバーが観察されない、又は数が非常に減少していた。更に、コントロール細胞では見られない、細胞の中央部分全体からの激しいアクチンの重合が起こっていた。このアクチンの重合は生じた場所から細胞周囲へ向かって波及し、常に異常な偽足の伸展を伴っている様子が観察された。

これらの結果から、我々は ZRP1 発現抑制細胞では Rac1 の活性が上昇しているのではないかと考えた。Rac1 の活性を生化学的手法で測定した結果、Rac1 の活性が ZRP1 発現抑制細胞では増加していることがわかった。更に、ZRP1 発現抑制細胞で見られるアクチンの異常重合や偽足の伸展が Rac1 の dominant negative 変異体を発現させることにより抑制された。以上の結果から、ZRP1 は focal adhesion において integrin からのシグナルを受け、通常は Rac1 の活性を適切に抑制するために必要な分子であり、ZRP1 の欠損は Rac1 の異常な活性化を引き起こし actin 細胞骨格系の動態に影響を与えると考えられる。また、ZRP1 発現抑制細胞では focal contact から focal adhesion への成熟の阻害と考えられる focal adhesion 局在タンパク質のシグナルの減弱や actin ストレスファイバーの消失が引き起こされることから、RhoA の活性の低下が起きている可能性が考えられた。実際、ZRP1 発現抑制細胞で見られるアクチンの異常重合や偽足の伸展が野生型 RhoA を発現させることによっても抑制され、更にストレスファイバーも多く観察されるようになった。しかし、RhoA の活性を生化学的手法で測定した結果、大きな変化は認められなかった。従って、ZRP1 発現抑制細胞では、focal adhesion 近傍における局所的な RhoA の活性抑制が起こっている可能性が示唆された。

一方、我々は ZRP1 が focal adhesion のみならず、cell-cell contact を形成する過程の、特に初期の段階で強く cell-cell contact に局在することを見出した。ZRP1 発現抑制細胞では、隣接する細胞との接着が正常に形成されず、N-cadherin の局在の乱れが観察された。更に、ZRP1 発現抑制細胞に EGFP-actin を発現させてライブ観察を行ったところ、コントロール細胞では cell-cell contact 形成時に隣接する細胞間をつなぐように複数の actin ファイバーが生じるが、ZRP1 発現抑制細胞ではそのような actin ファイバーの形成が見られなかった。更に、ZRP1 発現抑制細胞は隣の細胞に触れた後、cell-cell contact を形成する、あるいは運動の方向を転換するのではなく、隣接した細胞を乗り越える、あるいは下方に潜り込んで運動の進行を進める様子がしばしば観察された。

以上の結果は ZRP1 が Rac1 活性を負に調節することを通して actin 細胞骨格系の再構築、細胞の focal adhesion、細胞の運動、更には cell-cell contact の形成を制御する役割を果たしていることを示唆する。

現在、我々は ZRP1 が Rac1 を調節する分子メカニズムについて調べている。現在までに、ZRP1 が p130Cas のリン酸化レベルを調節し、p130Cas-Crk-Rac1 に対する GEF の複合体の形成に影響を与えることによって、Rac1 の活性を調節する可能性を示唆する結果を得ており、更に解析を進めることにより、integrin から Rac1 の活性制御につながる既知のシグナル伝達系における ZRP1 の位置づけを明らかにしたい。また、ZRP1 発現抑制細胞内で起きている RhoA の局所的活性化と Rac1 の細胞全体における活性化、および actin の異常重合との関連を明らかにすることで、Integrin 刺激による actin 骨格系制御機構の新たな一面を解明したいと考えている。