

[別紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 柏 辰 宇

本研究は細胞接着及び遊走において重要な役割を演じていると考えられる focal adhesion に局在する LIM タンパク質 ZRP1 の機能を明らかにするため、解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. Focal adhesion で ZRP1 の詳細な局在を調べるため、恒常的に ZRP1 を発現する細胞株を樹立し、ライブ観察を行った。その結果、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。ZRP1 が focal adhesion 形成の初期過程から focal adhesion に局在することを示された。

2. RNAi の手法を用い、HeLa 細胞内の ZRP1 の発現を抑制した。ZRP1 発現抑制細胞は細胞遊走刺激の有無に関係なく、高頻度に異常な偽足を伸展させることを示された。更に、ZRP1 発現抑制細胞に EGFP-actin を発現させ、ライブ観察を行った結果、細胞膜近傍だけではなく、細胞全体でアクチンの重合活性が亢進していることを示された。

3. 偽足やアクチンの重合を調節する Rho ファーミリ分子の Rac1 の活性を生化学的手法で測定し、Rac1 の活性が ZRP1 発現抑制細胞では上昇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。従って、ZRP1 は focal adhesion において、恐らく 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アクチン細胞骨格系の動態に影響を与えることを示された。

4. Focal adhesion マーカーの蛍光免疫染色を行った結果、ZRP1 発現抑制細胞では

focal adhesion が小さいことが分かった。更に、F-actin の蛍光免疫染色及び EGFP-actin のライブ観察で 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ことがわかった。一方、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。これらの結果から、ZRP1 発現抑制細胞では、Rac1 の活性が亢進し続けるため、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。

5. ZRP1 が focal adhesion のみならず、cell-cell contact に局在することを見出した。N-cadherin の蛍光免疫染色及び EGFP-actin のライブ観察で ZRP1 発現抑制細胞では N-cadherin を介する細胞間接着の形成が阻害されることを示された。更に、ZRP1 と N-cadherin/ β -catenin 複合体の共免疫沈降を行ったところ、ZRP1 が β -catenin と結合することを示された。従って、cell-cell adhesion を形成過程では ZRP1 が N-cadherin からのシグナルを受け、恐らく Rho GTPase ファミリーの活性の調節を介して cell-cell adhesion 形成時のアクチンの構築を制御する可能性を示唆された。

以上、本論文は focal adhesion に局在する LIM タンパク質 ZRP1 の解析から、ZRP1 が Rac1 活性を負に調節し、アクチン細胞骨格系の再構築することを通して、細胞接着及び遊走を制御することを明らかにした。本研究は細胞接着及び遊走を制御するメカニズムの解明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。