

氏名（本籍）	水谷晃輔（岐阜県）
学位の種類	博士（医学）
学位授与番号	甲第 720 号
学位授与日付	平成 19 年 7 月 18 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	Essential roles of ERK-mediated phosphorylation of vinexin in cell spreading, migration and anchorage-independent growth
審査委員	（主査）教授 出口 隆 （副査）教授 森 秀 樹 教授 中 島 茂

論文内容の要旨

背景と目的

Vinexin はアダプタータンパクファミリーの一つであり、N 末端側に SoHo(sorbin-homology)ドメイン、C 末端側に SH3(src-homology 3)ドメインを有している。Vinexin には 3 つの isoform が存在するがその内の vinexin β は、細胞骨格タンパクと相互作用する vinculin の結合タンパクとして発見された。その機能は細胞骨格の再編成や、細胞接着斑の形成に関与している。また、vinexin β は Ras-GEF, mSos, ERK や c-Raf と相互作用シグナル伝達の一部を担っていることも明らかになりつつある。特に、ERK が vinexin β の N 末端より 189 番目のセリンをリン酸化し活性化することも知られている。

しかしこのリン酸化が細胞内においてどのような役割や機能を有しているかは明らかになっていない。今回、分子細胞学的手法を使用しこの機能の一部を明らかにすることを目標とした。

方法

1. 細胞株：Vinexin β やそのリン酸化体の細胞内での局在には、REF52 細胞、NIH3T3 細胞、T24 細胞を、その機能の解析には LNCaP 細胞を使用した。
2. 遺伝子導入：Vinexin β 遺伝子の cDNA を PCR 法にて作成し、pRK5-Flag ベクターや pEGFP-C1 ベクターに組み込んだものをプラスミドとして使用した。Vinexin 遺伝子の mutation に関しては 189 番目のセリンをアラニン(vinexin β -SA)に変更したものとアスパラギン酸(vinexin β -SD)に変更したものをそれぞれ非リン酸化体、リン酸化体と考えられるプラスミドとして使用した。使用した遺伝子は塩基配列を決定して目的の遺伝子であることを確認した。細胞内への導入は Lipofectamine PLUS と Lipofectamine2000 を使用した。Stable clone 作成時には各遺伝子を導入後 G418 を添加して遺伝子発現細胞を selection した。
3. 抗体：抗 vinexin 抗体と抗 vinexin リン酸化抗体はそれぞれ vinexin β のタンパクとリン酸化ペプチドを抗原としてウサギにて作成した。2次抗体などは各会社より販売されているものを使用した。
4. 免疫細胞染色：細胞をカバースリップ上で培養、固定後に細胞染色を行い、蛍光顕微鏡にて観察した。
5. Western Blotting：細胞から蛋白を抽出し濃度測定を行い、10 μ g から 30 μ g の可溶化されたサンプルを SDS-PAGE で分離後、blotting し抗原抗体反応にて目的蛋白を同定した。

6. Cell-spreading assay : 細胞をトリプシンで処理し懸濁液を作成後にカバースリップ上に播種し、任意の時間で固定し、rhodamine phalloidinにて actin を染色し細胞数を計測した。細胞面積は Media Cybernetics 社の Image-Pro PLUS を使用した。
7. Migration assay : Becton Dickinson 社の 24 well inner chamber (8 μ m pore size) を使用した。
8. Colony formation assay : 0.3% 軟寒天ゲル内に細胞を播種し 2 週間後に colony が形成されたところで colony を固定、染色して colony 形成数を測定した。

結果と考察

Vinexin β は NIH3T3 細胞, REF52 細胞, T24 細胞において細胞辺縁, 接着班, 移動細胞の leading edge に集積していた。これは actin の再構成が活発な部位であり, 接着や細胞の移動に関係していることが示唆された。また, 活性化 ERK と vinexin β とが共局在しており ERK と vinexin β の相互作用が示唆された。Vinexin β -SA mutant と vinexin β -SD mutant は同様の部位に存在していたため, ERK によるリン酸化は vinexin β の細胞内の局在にはあまり影響を与えていない可能性が示唆された。しかし, リン酸化 vinexin β の発現は T24 細胞の接着初期に辺縁に高発現し, 接着後には発現が低下するという現象を示した。これは ERK の活性化と同様の発現様式であったため, ERK による vinexin β のリン酸化は細胞の接着に影響を与えている可能性が示唆された。

次に vinexin β を内在的に発現していない前立腺癌細胞株である LNCaP 細胞に wild type の vinexin β と vinexin β -SA mutant と SD mutant を導入し作成した clone を使用して細胞の接着能力と進展能力を検討したところ wild type と SD mutant の細胞接着能は低下しており, 前立腺癌細胞において vinexin β のリン酸化は細胞の接着と進展を抑制することが示唆された。

また, 足場非依存的増殖についても検討したところ, wild type と SA mutant の増殖能力が同様に低下していた。この結果は足場がない状態では vinexin β はリン酸化を受けにくく, 細胞の増殖能力が低下するというを示唆した。

以上のことから, vinexin β のリン酸化は前立腺癌細胞株において細胞接着や足場非依存的増殖に影響を与えていることが示唆された。この結果は vinexin β が, 将来において前立腺癌の転移の予測のマーカーや遺伝子治療の標的となりうることを示している。

論文審査の結果の要旨

申請者 水谷 晃輔は, 比較的新しい遺伝子である vinexin β のリン酸化が細胞接着や進展, 足場非依存的増殖に関係していることを明らかにした。この研究成果は, 今後の細胞の運動や増殖に関連する細胞生物学的研究に寄与するものと認められ, さらに実験に供した細胞が前立腺癌細胞であることから, vinexin β が前立腺癌の転移の予測や治療の新たな標的となるものと期待され, 泌尿器科学および腫瘍学の進歩に寄与するものと認められる。

[主論文公表誌]

Essential roles of ERK-mediated phosphorylation of vinexin in cell spreading, migration and anchorage-independent growth

Oncogene (in press).